

Даний винахід стосується вдосконалених методів проведення реакцій карбодіімідної конденсації. Зокрема, він стосується з'єднання сахаридів та протеїнів з використанням карбодіімідної конденсації. Він також стосується імуногенних композицій, які можуть містити сахарид-протеїнові кон'югати за даним винаходом.

Бактеріальні капсулярні полісахариди широко використовувались протягом багатьох років для попередження бактеріальних захворювань. Однак, проблемою такого використання є Т-незалежна природа імунного відгуку. Ці антигени є слабкоімуногенними у немовлят. Ця проблема може бути вирішена шляхом кон'югації полісахаридних антигенів до протеїну-носія (джерело Т-хелперних епітопів) який потім може бути використаний для виклику Т-залежного імунного відгуку навіть на першому році життя.

Різноманітні методи кон'югації відомі з рівня техніки. Кон'югати можуть бути отримані прямим відновлюючим амінуванням, як описано в US 4365170 (Jennings) та US 4673574 (Anderson). Інші методи описані в EP-0-161-188, EP-208375 та EP-0-477508. Метод кон'югації може альтернативно ґрунтуватися на активації гідроксильних груп сахариду 1-ціано-4-диметиламінопіридиній тетрафтороборатом (CDAP) з утворенням ціанатного ефіру. Активованій сахарид може бути приєднаний безпосередньо, або через спейсерну (лінкерну) групу, до аміногрупи протеїну-носія. Наприклад, ціанатний ефір може бути з'єднаний з гександіаміном або дигідразидом адипінової кислоти (АН або АДН) та амінопохідне сахариду приєднано до протеїну-носія, за допомогою конденсації з використанням карбодііміду (наприклад, EDAC або EDC), через карбоксильну групу протеїну-носія. Такі кон'югати описані в опублікованій РСТ заявці WO 93/15760 Uniformed Services University, а також WO 95/08348 та WO 96/29094. Також це видно в публікації Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256.

Взагалі, наступні типи хімічних груп протеїну-носія можуть бути використані для конденсації/кон'югації:

А) Карбоксил (наприклад, аспарагінової та глютамінової кислот), який може бути кон'югований до натуральних або модифікованих аміногруп сахаридних фрагментів з використанням карбодіімідних методів;

В) Аміногрупа (наприклад, лізину), яка може бути кон'югована до натуральних або модифікованих карбоксильних груп сахаридних фрагментів з використанням карбодіімідних методів;

С) Сульфогідрил (наприклад, цистеїну);

Д) Гідроксильна група (наприклад, тірозину);

Е) Імідазолільна група (наприклад, гістидину);

Ф) Гуанідильна група (наприклад, аргініну); та

О) Індолийна група (наприклад, триптофану).

Взагалі, в сахариді наступні групи можуть бути використані для конденсації: OH, COOH or NH₂. Альдегідні групи можуть бути генеровані різними видами обробок, відомих з рівня техніки, таких, як: періодат, кислотний гідроліз, перекис водню тощо.

Методи прямої конденсації:

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний ефір + NH₂-NH₂ → кон'югат

Сахарид-Альдегід + NH₂-Прот → Основа Шифа + NaCNBH₃ → кон'югат

Сахарид-COOH + NH₂-Прот + EDAC → кон'югат Сахарид-NH₂ + COOH-Прот + EDAC → кон'югат

Методи прямої непрямої конденсації через спейсер (лінкер)

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний ефір + NH₂-NH₂ → сахарид—NH₂ + COOH-Прот + EDAC → кон'югат

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний ефір + NH₂-SH → сахарид—SH + SH-Прот (нативний Протеїн з незахищеним цистеїном або отриманий після модифікації аміногруп протеїну, наприклад, SPDP) → сахарид-S-S-Прот

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний ефір + NH₂-SH → сахарид—SH + малеїмід-Прот (модифікація аміногруп) → кон'югат

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂-NH₂ → сахарид-----NH₂ + EDAC + COOH-Прот → кон'югат

Сахарид-COOH + EDAC+ NH₂-SH → сахарид—SH + SH-Прот (нативний Протеїн з незахищеним цистеїном або отриманий після модифікації аміногруп протеїну, наприклад, SPDP) → сахарид-S-S-Прот

Сахарид-COOH + EDAC+ NH₂-SH → сахарид—SH + малеїмід-Прот (модифікація аміногруп) → кон'югат

Сахарид-Альдегід + NH₂-NH₂ → сахарид--NH₂ + EDAC + COOH-Прот → кон'югат

Як може бути видно, карбодіімідні методи (наприклад, використання EDAC) є дуже зручні для реакцій кон'югації, оскільки вони використовують групи сахариду та або протеїну, які можуть бути натурально присутніми або легко вводяться модифікацією. Також зручно зв'язувати компоненти через пептидний зв'язок.

Карбодііміди (RN=C=NR') є ненасиченими сполуками з аленовою структурою (Nakajima and Ikada 1995 Bioconjugate Chem. 6 :123-130; Hoare and Koshland 1967 JBC 242:2447-2453). Цей реагент відносно нестабільний при власному реакційному рН (4.5-6.5), однак, в даній галузі існує тенденція додавати разом всі компоненти реакції сахарид/протеїн/карбодіімідної кон'югації.

Авторами винаходу було знайдено, що в залежності від природи сахариду та протеїну, що вводяться в кон'югацію, кращі властивості кінцевого кон'югату для застосування вакцини можуть бути досягнуті шляхом повільного додавання певної компоненти реакції до суміші. В цих діях одне або більше переваг/вдосконалень може бути реалізоване так, як: переробка сахариду в кон'югат, здатність кон'югату до стерильного фільтрування, кращий контроль кон'югації, більш легка відтворюваність та/або попередження внутрішнього перехресного зв'язування.

Відповідно, в одному з втілень що стосується методу кон'югації сахариду з протеїном-носієм з використанням методу карбодіімідної конденсації, в якому сахарид містить (наприклад, як частина фрагменту, що повторюється), або містить в результаті модифікації, аміно та/або карбоксильні групи, і в якому протеїн-носії містить, або містить в результаті модифікації, аміно та/або карбоксильні групи, що включає наступні варіанти:

І) - якщо протеїн-носії містить як аміно, так і карбоксильні групи і сахарид містить або аміно або карбоксильні групи:

а) змішування сахариду та аліквоти карбодііміду, необхідної для проведення кон'югації, та
б) додавання аліквоти протейну-носія проводять протягом періоду від 35 секунд до 6 годин;
11) - якщо сахарид містить як аміно, так і карбоксильні групи і протейн-носії містить або аміно або карбоксильні групи:

а) змішування протейну-носія та аліквоти карбодііміду, необхідної для проведення кон'югації, та
б) додавання аліквоти сахариду проводять протягом періоду від 35 секунд до 6 годин;
III) - якщо протейн-носії містить як аміно, так і карбоксильні групи і сахарид містить як аміно, так і карбоксильні групи:

а) змішування протейну-носія і сахариду, та
б) додавання аліквоти карбодііміду, необхідного для проведення кон'югації проводять протягом періоду від 35 секунд до 6 годин.

Будь-який підходящий карбодіімід може бути використаний за умови, що він здатний конденсувати сахариди та протейни у водному середовищі. В одному з втілень даного винаходу в якості карбодііміду може виступати EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропил)карбодіімід) [також відомий як EDC] або це може бути інший карбодіімід, ніж EDAC.

Термін "сахарид" по всьому тексту опису може означати полісахарид або олігосахарид та включає обидва значення. Він може також означати ліпополісахарид (LPS) або ліпоолігосахарид (LOS). До того, як використати полісахариди (такі як бактеріальні полісахариди) можуть бути виділені з вихідного штаму (наприклад, бактерії) чи виділені з вихідного штаму та фракціоновані до певного ступеню відомими методами (дивися, наприклад, EP497524 та EP497525; Shousun Chen Szu et al. - Carbohydrate Research Vol 152 p7-20 (1986)) наприклад, мікрофлюїдизацією. Полісахариди можуть бути фракціоновані для того, щоб понизити в'язкість в полісахаридних зразках та/або покращити здатність до фільтрування кон'югованих продуктів. Олігосахариди мають низьке число фрагментів, що повторюються (зазвичай 5-30 фрагментів, що повторюються) та є типовими гідролізованими полісахаридами.

Значення терміну "протейн-носії" охоплює як малі, так і великі поліпептиди (>10 kDa). Очевидно, що більші ймовірно для великих поліпептидів є те, що вони містять реакційно здатні як аміно, так і карбоксильні групи без будь-якої модифікації.

Згідно з суттю винаходу, термін "нативний полісахарид" відноситься до сахариду, що не був підданий процесам, метою яких є зменшення розміру сахариду. Полісахарид може стати злегка меншим в розмірі під час нормальних процедур очистки. Такий сахарид залишається нативним. Тільки, якщо полісахарид був підданий процесам фракціонування, то такий полісахарид не буде розглядатися як нативний.

Згідно з суттю винаходу, вираз "фракціонування з коефіцієнтом до x^2 " означає, що сахарид піддають прогнозованому процесу скорочення розміру сахариду але підтримують розмір більше ніж половину розміру нативного полісахариду. x^3 , x^4 і т.д. інтерпретують таким же чином, тобто сахарид піддають прогнозованому процесу скорочення розміру сахариду але підтримують розмір більше ніж третина, чверть і т.д. розміру нативного полісахариду.

Період часу від 35 секунд до 6 годин в стадії b) методу для додавання повної аліквоти кінцевої компоненти може становити від 50 секунд до 5 годин, від 1 хвилини до 4 годин, від 2 хвилин до 3 годин, від 3 хвилин до 2 годин, від 4 до 60 хвилин, від 5 до 50 хвилин, від 6 до 40 хвилин, від 7 до 30 хвилин або від 8 до 20 хвилин. Він також може бути від 1 хвилини до 5 годин, від 10 хвилин до 4 годин, від 20 хвилин до 3 годин, від 30 хвилин до 2 годин, від 40 до 90 хвилин, або від 50 до 70 хвилин. Цей час можна регулювати відповідно до конкретних сахариду та протейну, що вводяться в конденсацію.

В одному з втілень аліквоту кінцевої компоненти (наприклад, карбодіімід, сахарид чи протейн) додають до реакційної суміші при постійній швидкості протягом певного періоду часу (це легко досягається, з використанням насоса, що працює при постійній швидкості). Альтернативно вона може бути додана декількома порціями протягом певного періоду часу. Хоча це може бути зроблено багатьма шляхами, в основних частинах аліквоту слід добавляти протягом всього періоду. Наприклад, принаймні одна чверть аліквоти може додаватися протягом першої половини періоду, та що найменш одна чверть аліквоти протягом другої половини періоду. Загальна кількість відміряної аліквоти 'a', наприклад, в мл чи мг може додаватися в 4-100 етапів ('s') через період, в одному з втілень стадії систематизують так що рівні кількості (a/s) вводять на всіх стадіях. В одному з втілень стадії рівномірно розташовують з проміжками через період 'p' (в секундах). Таким чином, якщо одна стадія відбувається а час ноль з періодом 'p', тоді кожна наступна стадія могла б відбуватися в час, який дорівнює $p/(s-1)$. Об'єм аліквоти кінцевої компоненти доданої на стадії b) може регулюватись зручністю додавання аліквоти до реакції з бажаним періодом часу. Карбодіімід може додаватись як водний розчин (зазвичай буферизований при pH 7.5 перед додаванням до реакції) або як твердий порошок (EDAC, наприклад, є високорозчинним у водному середовищі). Звичайно, якщо карбодіімід - це остання компонента, що додається до реакції (варіант III стадія b)), повільне розчинення карбодііміду може бути використане, так що повна аліквота порошку додається до реакції всіх одночасно, але він розчиняється зі швидкістю, що узгоджується з бажаним періодом, понад який аліквота стає доступною до реакції.

Якщо протейн та/чи сахарид не містить аміно або карбоксильну групи (чи тільки одну з них), він може бути модифікований, щоб ввести її в нього (чи ввести іншу, якщо він не містив її). Наприклад, тільки для сахариду, що містить реакційно здатні гідроксильні групи (наприклад, менінгококова серогрупа A капсулярного сахариду), така група була б використана для модифікації на аміно чи карбоксильній групах, настільки, що може відбутися EDAC конденсація.

Це може відбуватися в субодиницях, що повторюються, або може бути групою присутньою тільки на кінці молекули сахариду.

Як було б зазначено, що де відбувається модифікація, там може бути корисним тільки частково модифікований половинні. Для сахаридів з субодиницями, що повторюються, епітоп мішені може бути присутнім в кожному повторенні. Тому, якщо відбувається часткова модифікація (для цього маєтись на увазі 0.5-20, 1-15, 3-12, чи 5-10% реакційноздатної групи мішені є фактично модифікованою), то це може мати перевагу в

зберіганні більшості епітопів та значному запобіганні перехресного зшивання.

Якщо сахарид чи протеїн вже мають тільки аміно чи карбоксильну (наприклад, Vi сахарид з *Salmonella typhi* який природньо містить карбоксильну, але не аміно групи), модифікування може відбуватися, щоб надати їй інший тип групи (тобто аміно групи для Vi). Зазначалося, однак, що як модифікування може бути частковим цієї дії може змінити переважаючу реакцію винаходу з типу I на тип III. Наприклад, якщо Vi сахарид є кон'югованим до протеїну-носія, який включає як аміно так і карбоксильну групи, варіант I додає повільно аліквоту протеїну в стадії b). Якщо карбоксильна група Vi сахариду частково модифікована аміно групами, то він буде містити як карбоксильну так і аміно групи, таким чином, варіант III, повільне додавання аліквоти карбодііміду в стадії b), стає найбільш важливим.

Модифікація може відбуватися через додавання гетеро- чи гомо-біфункціонального лінкеру. Це може проходити за подібними хімічними процесами, як описано вище для стадії кон'югації сахарид-протеїн (наприклад, карбодіімідним або CDAP методом). Лінкер може містити від 4 до 20, 4 до 12, чи 5 до 10 атомів вуглецю, він може містити дві реакційноздатні аміно групи, дві реакційноздатні карбоксильні групи, чи одна з кожної (наприклад, гександіамін, 6-амінокапронова кислота, або гідрозид адипінової кислоти). Як правило, модифікація відбувається через реагування великого надлишку лінкеру з сахаридом та/або протеїном-носієм, щоб бути модифікованим. Це дозволяє модифікації протікати з мінімальним внутрішнім перехресним зшиванням (що може бути можливим, якщо, наприклад, карбоксильна група на сахариді модифікується аміно групами, використовуючи карбодіімідну конденсацію). Надлишковий лінкер легко видаляється з використанням методики такої, як діалізація.

В одному з втілень сахарид включає реакційноздатну гідроксильну групу як частину його фрагменту, що повторюється, яка є частково модифікованою через аміно групу на лінкері (наприклад, методом CDAP). В іншому втіленні сахарид включає реакційноздатну аміно групу як частину його фрагменту, що повторюється, яка є частково модифікованою через карбоксильну групу на лінкері (наприклад, карбодіімідним методом). В подальших втіленнях сахарид включає реакційноздатну карбоксильну групу як частину його фрагменту, що повторюється, яка є частково модифікованою через аміно групу на лінкері (наприклад, карбодіімідним методом).

Аліквота карбодііміду, щоб виконати кон'югацію (присутню в стадії або а) або б) реакції винаходу) складала від 0.01 до 3,4), 0.05 до 2, чи 0.09 до 1 мг карбодііміду/мг сахариду.

Хоча ці кількості розраховували по відношенню до EDAC будучи карбодіімідом, ці кількості можуть регулюватись, якщо будь-який інший карбодіімід використовується множенням кількості в ряду: (молекулярна маса іншого карбодііміду)/(молекулярна маса EDAC).

Взагалі, сахарид може бути присутнім в методах винаходу з кінцевою концентрацією 0.5-50 мг/мл в стадії b). Це буде залежати від розміру та природи сахариду, та степеню будь-якої модифікації. Наприклад, для олігосахаридів буде необхідною велика концентрація, але для великих полісахаридів буде більш прийнятною набагато менша концентрація. Якщо він має великий кінець частково модифікований аміно чи карбоксильними групами, то менша концентрація може бути прийнятною, щоб зменшити можливість будь-якого перехресного зшивання. Протеїн-носії може бути присутній з кінцевою концентрацією 1-50 мг/мл в стадії b).

Початкове співвідношення протеїну-носія до сахариду в способах за винаходом може складати 5:1 до 1:5, 4:1 до 1:1, чи 3:1 до 2:1 (м/м). Крім того, це буде залежати від розміру та природи сахариду та степеню будь-якої модифікації.

Сольові умови (наприклад, NaCl) також можуть змінюватись в залежності від природи сахариду/протеїну. Зазвичай близько 0.2M NaCl може знаходитись в стадії b) способів за винаходом, але може складати 0-2, 0.1-1 чи 0.2-0.5 M.

В межах pH в стадії b) способів за винаходом, pH реакції може складати будь-який pH, де карбодіімід є активованим - наприклад, pH 4.5-6.5, 4.7-6.0, чи 5-5.5. Цей pH, зазвичай, утримується протягом реакції додаванням кислоти/основи за потребою. EDAC, як правило, є стабільним при pH 7.5, хоча, якщо кон'югація вимагає проведення при вищих pH, то, як відомо, існують сполуки, що зберігають реакційне середовище стабільним (такі як N-гідроксисукцинімід), які також можуть бути присутніми в стадії b), в цих випадках pH реакції в стадії b) може утримуватись при pH 4.5-7.5.

Температура реакції протягом стадії b) способів за винаходом може складати 4-37, 10-32, 17-30, чи 22-27°C, та як правило, утримується протягом реакції.

В способах за винаходом, повна аліквота додається одноразово в стадії b) реакція, як правило підтримується протягом подальших від 10 хвилин до 72 годин, 20 хвилин до 48 годин, 30 хвилин до 24 годин, 40 хвилин до 12 годин, 50 хвилин до 6 годин, або 1-3 години. Іноді реакція завершується, pH регулюється до 7.5-9 (якщо присутній N-гідроксисукцинімід, то до вищого його кінця), щоб вернутися до діапазону pH, в якому карбодіімід стабільний.

Іноді кон'югований, сахарид-протеїн кон'югат може бути очищений від: непрореагувавших компонентів, вільного сахариду, і т.д. вприскуванням його в a size exclusion chromatography column (наприклад, Сефакрил S400HR, Pharmacia). Як правило, це виконується при 2-8 °C. Кон'югат стерильно фільтрувати, потім зберігають. Наприкінці, ефективна доза (наприклад, 1-20, 2-15, чи 3-10 мкг сахарид /доза) кон'югату сахарид-протейн може розроблюватись з фармацевтично прийнятним наповнювачем (наприклад, сіллю або допоміжною речовиною) для виготовлення імуногенної композиції або вакцини.

В термінах сахариди даного винаходу, будь-який сахарид вірусного, трубкового, бактеріального чи еукаріотного походження може бути кон'югований, використовуючи способи винаходу. Це може бути Vi сахарид з *Salmonella typhi*, чи інший сахарид ніж Vi. Це може бути капсулярний сахарид Hib з *H. influenzae* тип b, або може бути сахарид інший ніж Hib. В одному з втілень сахарид є бактеріальним капсулярним сахаридом, наприклад, виділений з бактерії, відібраної зі списку, що складається з: *N. meningitidis* serogroup A (MenA), B (MenB), C (MenC), W135 (MenW) або Y (MenY), *Streptococcus pneumoniae* серотипи 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F чи 33F, Група B Стрептококова група Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, або VII, *Staphylococcus aureus* тип 5, *Staphylococcus aureus* тип 8, *Salmonella typhi* (Vi сахарид),

Vibrio cholerae, або *H. influenzae* тип b.

Середньозважена молекулярна маса сахариду може складати 1000-2000000, 5000-1000000, 10000-500000, 50000-400000, 75000-300000, або 100000-200000. Молекулярна маса або середня молекулярна маса сахариду тут приписується до середньозваженої молекулярної маси (Mw) сахариду, виміряної перед кон'югацією і, яка вимірюється методом MALLS. Методика MALLS добре відома фахівцям та, як правило, виконується як описано в прикладі 2. Для MALLS аналізу сахаридів, можуть використовувати в комбінації дві колонки (TSKG6000 та 5000PWx) та елюють сахариди водою. Сахариди детектують, використовуючи детектор розсію чого світла (наприклад, Wyatt Dawn DSP устаткований 10мВт аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм) та interferometric рефрактометр (наприклад, Wyatt Otilab DSP устаткований P100 коміркою та червоним фільтром з довжиною хвилі 498нм). У втіленні, полідисперсність сахариду складає 1-1.5, 1-1.3, 1-1.2, 1-1.1 або 1-1.05 та після кон'югації до носію протеїну, полідисперсність кон'югату складає 1.0-2.5, 1.0-2.0. 1.0-1.5, 1.0-1.2, 1.5-2.5, 1.7-2.2 або 1.5-2.0. Всі вимірювання полідисперсності зроблені методом MALLS.

Сахарид може бути або нативним полісахаридом або може бути фракціонованим з фактором не більше ніж 2, 4, 6, 8, 10 чи 20 кратно (наприклад, мікрофлюїдизацією [наприклад, на приборі Emulsiflex C-50] чи за іншою відомою методикою [наприклад, методами нагрівання, хімічними, окиснюючими, обробки ультразвуком]). Олігосахариди, в значній мірі, можуть бути фракціоновані долі [наприклад, відомими методами нагрівання, хімічними або окиснюючими].

Структури більшості з цих сахаридів є відомими (та тому або вони природньо містять будь-яку аміно чи карбоксильну групи для карбодіімідної методики, або будь-яку іншу реакційноздатну групу, яку можна модифікувати аміно чи карбоксильними групами (дивись таблицю нижче).

	Природня NH ₂ група	Природня COOH група	Інша реакційн. група
<i>S aureus</i>			
PS5	Hi	Так	ОН
PS8	Hi	Так	ОН
<i>N meningitidis</i>			
MenA	Hi	Hi	ОН
MenC	Hi	Так	ОН
MenW135	Hi	Так	ОН
MenY	Hi	Так	ОН
MenB	Hi (може бути генерованим, якщо де-N-ацетильований)	Так	ОН / N-пропил
<i>Gp. B Streptococcus</i>			
Ia, Ib	Hi	Так	ОН
II	Hi	Так	ОН
III	Hi	Так	ОН
IV	Hi	Так	ОН
V	Hi	Так	ОН
VI	Hi	Так	ОН
VII	Hi	Так	ОН
<i>S typhi</i>			
Vi	Hi	Так	Hi
<i>S. pneumoniae</i>			
PS1	Так	Так	ОН
PS3,4,5,8,9, 12F	Hi	Так	ОН
<i>Vibrio cholerae</i>			
Capsular Сахарид	Так	Hi	ОН
<i>H.influenzae B Hib</i>	Hi	Hi	ОН
LOS			
Nmen/ Meat/ Hi	Так на PEA	Так на KDO	ОН

Сахарид може бути бактеріальним ліпоолігосахаридом або ліпополісахаридом (дивись таблицю вище), наприклад, виділеним з бактерії, відібраної зі списку, що складається з: *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Salmonella* або *M. catarrhalis*. LOS може бути менінгококовим імунотипом L2, L3 чи L10. Він може бути детоксифікованим лужною обробкою його Ліпідної А частини.

У втіленні, MenA капсулярний сахарид, є що найменш частково О-ацетильованим таким чином, що, як мінімум 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% чи 98% фрагментів, що повторюються, є О-ацетильованими, щонайменш в одне положення. О-ацетилування, наприклад, присутнє, як мінімум, в 0-3 положення принаймні 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% або 98% фрагментів, що повторюються. У втіленні, MenC капсулярний сахарид, є що найменш частково О-ацетильованим таким чином, що, як мінімум 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

95% або 98% з ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-зв'язаних NeuNAc фрагментів, що повторюються є О-ацетилюваними щонайменш в одне або два положення. О-ацетилювання, наприклад, присутнє, при 0-7 та/або 0-8 положенні принаймні 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% або 98% фрагментів, що повторюються. У втіленні, MenW капсулярний сахарид, є що найменш частково О-ацетилюваним таким чином, що, як мінімум 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% чи 98% фрагментів, що повторюються, є О- ацетилюваними, щонайменш в одне або два положення. О- ацетилювання наприклад, присутнє, при 0-7 та/або 0-9 положення як мінімум у 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% або 98% фрагментів, що повторюються. У втіленні, MenY капсулярний сахарид, є що найменш частково О-ацетилюваним таким чином, що, як мінімум 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% чи 98% фрагментів, що повторюються є О- ацетилюваними, щонайменш в одне або два положення. О- ацетилювання присутнє в 7 та/або 9 положення, як мінімум у 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% або 98% фрагментів, що повторюються. Відсоток О- ацетилювання відносять до відсотку фрагментів, що повторюються, які містять О- ацетилювання. Це може бути виміряно в сахариді до кон'югату та/або після кон'югації.

Протеїн-носії може бути будь-яким пептидом або протеїном. Він може містити один або більше Т-допоміжних епітопи. В одному з втілень винаходу протеїн-носії відбирають з групи, яка складається з: TT, DT, CRM197, фрагменту С з TT, протеїну D з *H. influenzae*, пневмококового PhtD, та пневмококового Pneumolysin. Носій протеїну може бути провцевим анатоксином (TT), фрагментом С правцевого анатоксину, нетоксичними мутантами правцевого анатоксину [як вважається, всі такі варіанти TT є однаковим типом носію протеїну за суттю цього винаходу], дифтерійний анатоксин (DT), CRM197, інші нетоксичні мутанти дифтерійного анатоксину [такі як CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844. 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 та CRM107 та інші мутанти, описані Nicholls та Youle в Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maescl Dekker Inc. 1992; делеція чи мутація Glu-148 до Asp, Gin до Ser та/або Ala 158 до Gly та інші мутації розкриті в US 4709017 або US 4950740; мутації, як мінімум, одного чи більше залишків Lys 516, Lys 526, Phe 530 та/або Lys 534 та інші мутації розкриті в US 5917017 чи US 6455673; або фрагмент розкритий в US 5843711] (як вважається, всі такі варіанти DT є однаковим типом джерела протеїну за суттю цього винаходу), пневмококовий пневмолізін (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), OMPC (менінгококовий поверхнево мембранний протеїн - зазвичай виділений з *N. meningitidis* serogroup B - EP0372501), синтетичні пептиди (EP0378881, EP0427347), протеїни теплового удару (WO 93/17712, WO 94/03208), коклюшеві протеїни (WO 98/58668, EP0471177), цитокіни, лімфокіни, фактори росту гормони (WO 91/01146), неприродні протеїни, що включають багатократні CD4+ Т клітинні епітопи людини з різних патогенних похідних антигенів (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) таких як N19 протеїн (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) пневмококовий поверхневий протеїн PspA (WO 02/091998), протеїни, що вводять залізо (WO 01/72337), токсини А або В з *C difficile* (WO 00/61761), *H. influenzae* Протеїн D (EP594610 та WO 00/56360), пневмококовий PhtA (WO 98/18930, також переданий на розгляд до Sp36), пневмококовий PhtD (розкритий в WO 00/37105, та також переданий на розгляд до Sp036D), пневмококовий PhtB (розкритий в WO 00/37105, та також переданий на розгляд до Sp036B), або PhtE (розкритий в WO00/30299 та переданий на розгляд до як BVH-3).

В подальших підходах винаходу обумовлюється кон'югат сахарид-протеїн носій (або імуногенна композиція чи вакцина), що може бути отримана, або отримана за способами винаходу.

Використання імуногенної композиції чи вакцини винаходу у виробництві медикаменту для попередження чи лікування хвороби, та методу запобігання чи лікування хвороби, включаючи стадії регулювання ефективної дози імуногенної композиції чи вакцини винаходу на пацієнта, в необхідності цього далі передбачається. Використання чи метод може бути таким, що захворювання є випадком відібраної бактерії зі списку, що складається з: *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *M. catarrhalis*. Група В *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, та *H. influenzae*.

Імуногенні композиції винаходу можуть також містити DTPa або DTPw вакцину (наприклад, одну включаючи DT, TT, та або вакцина цілих клітин коклюшу (Pw) vaccine або вакцина без клітинного коклюшу (Pa) (включаючи, наприклад, анатоксин коклюшу, FHA, пертактин, та, по вибору агглютиногени 2 та 3). Такі комбінації можуть також включати вакцини проти гепатиту В (наприклад, вони можуть містити поверхневий антиген гепатиту В) [HerB], необов'язково сорбований на фосфаті алюмінію). В одному з втілень імуногенна композиція винаходу включає Hib, MenA та MenC кон'югати сахариду, чи Hib та MenC кон'югати сахариду, чи Hib, MenC та MenY кон'югати сахариду, чи MenA, MenC, MenW та MenY кон'югати сахариду, в яких, щонайменш один, два або всі кон'югати сахариду, отримані відповідно до способу за винаходом.

Імуногенні композиції винаходу необов'язково включають додаткові вірусні антигени, що надають захист від або проти хвороби, спричиненої кором та/або свинкою та/або краснухою та/або вітряною оспю. Наприклад, імуногенна композиція винаходу містить антигени кору, свинки та краснухи (MMR) або кору, свинки, краснухи та вітряної оспи (MMRV). У втіленні, ці вірусні антигени необов'язково присутні в такому ж вмісті, як присутні в композиції менінгококовий та/або Hib кон'югат(и) сахариду. В одному з втілень ці вірусні антигени є ліофілізованими.

В одному з втілень імуногенна композиція винаходу подальше включає антиген з *N. meningitidis* серогрупи В. Антиген є необов'язково з зовнішньої мембрани везикули приготовлений з *N. meningitidis* серогрупи В, як описано в EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 та WO 04/14419. В основному, імуногенна композиція винаходу може включати дозу кожного кон'югату сахариду між 0.1 та 20 мкг, 2 та 10 мкг, 2 та 6 мкг або 4 та 7 мкг сахариду.

"Біля" або "близько" визначається з 10% більше а бо менше даної фігури за метою винаходу.

В одному з втілень, імуногенна композиція винаходу підтримується або буфером при, або підтримується в межах pH 7.0 та 8.0, pH 7.2 та 7.6 або близько або точно pH 7.4.

Імуногенна композиція або вакцини винаходу є необов'язково ліофілізованою в присутності стабілізуючого агенту, наприклад, поліолу такого як сахароза або трегалоза.

Необов'язково, імуногенна композиція або вакцина за винаходом містить кількість ад'юванту достатню,

щоб посилити імунний відгук на імуноген. Підходящий ад'ювант включає, але не обмежений, солі алюмінію (алюміній фосфат або алюміній гідроксид), скваленова суміш (SAF-1), мурамипептид, похідні сапоніну, препарати клітинних стінок мікобактерій, монофосфоліпід А, похідні нікотової кислоти, неіонізовані блок-сополімерні поверхнево-активні речовини (ПАР), Quil A, В субодинація токсину холери, поліфосфазен та його похідні, та імуностимулюючі комплекси (ISCOMs), такі як ті, що описані Takahashi et al. (1990) Nature 344:873-875.

Для N. meningitidis або HibMen комбінацій, може бути прийнятним не використовувати ніякої солі алюмінію як ад'юванту або жодного ад'юванту.

Як зі всіма імуногенними композиціями чи вакцинами, імунологічно ефективні кількості імуногенів повинні визначатися емпірично. Фактори, як зазначалося, включають імуногенність, необов'язково імуноген буде скомплексованим з чи ковалентно прикріпленим до ад'юванту або до протеїну-носія, або до іншого носія, спосіб введення та число імунізуючих доз, що вводяться.

Активний агент може бути присутнім в різних концентраціях в фармацевтичній композиції чи вакцині винаходу. Як правило, мінімальна концентрація речовини є необхідною кількістю, щоб досягти його призначеного використання, в той час як, максимальна концентрація - це максимальна кількість, що буде залишатися в розчині або гомогенно суспендуватися з початковою сумішшю. Наприклад, мінімальна кількість фармацевтичного агенту є необов'язково однією, яка забезпечить єдину терапевтично ефективну дозу. Для біоактивних речовин мінімальна концентрація - це необхідна кількість для виявлення біоактивності, а максимальна концентрація є в точці, в якій суспензія не бути втримана гомогенною. У випадку одно-дозованих одиниць, кількість є такою ж, як для одноразового терапевтичного примінення. Взагалі, очікується, що кожна доза включатиме 1-100мкг протеїнового антигену, необов'язково 5-50мкг або 5-25мкг. Наприклад, дози бактеріальних сахаридів становлять 10-20 мкг, 5-10 мкг, 2.5-5 мкг чи 1-2.5 мкг сахариду в кон'югаті.

Вакцинні препарати за даним винаходом можуть бути використані для захисту та лікування ссавців (наприклад, людей) чутливих до інфекцій, методом введення згаданої вакцини системно або через слизову оболонку. Пацієнти- люди- необов'язково немовлята (до 12 місяців), діти, що починають ходити (12-24, 12-16 чи 12-14 місяців), діти (2-10, 3-8 чи 3-5 років) юнаки (12-21, 14-20 чи 15-19 років) чи дорослі. Ці введення можуть включати введення внутрішньом'язово, інтраперитонеально, інтрадермально або підшкірно; або шляхом введення через слизову оболонку - оральний/аліментарний, респіраторний, сечостатевої тракти. Інтраназальному введенню вакцини для лікування пневмонії чи отиту надається перевага (як назофаренгальний носій пневмококів може бути більш ефективно попереджена, відповідно ослаблена інфекція на самій ранній стадії). Хоча вакцина за винаходом може вводиться як одноразова доза, компоненти з цього можуть також вводиться разом в один і той же час або в різні часи (наприклад, якщо сахариди присутні в вакцині, вони можуть вводиться окремо в один і той же час або 1-2 тижні після введення вакцини бактеріального протеїну для оптимальної координації імуного відгуку з відповідністю один до одного). На додаток до одноразового шляху введення, можуть бути використані 2 різні шляхи введення. Наприклад, вірусні антигени можуть вводиться ID (інтрадермально), доки бактеріальні протеїни можуть вводиться IM (внутрішньом'язово) чи IN (інтраназально). Якщо сахариди присутні, вони можуть вводиться IM (або ID) та бактеріальні протеїни можуть вводиться IN (або ID). На додаток, вакцини за винаходом можуть вводиться IM для примуваючих доз та IN для ревакцинуючих доз.

Приготування вакцини, в основному, описано в Vaccine Design ("The sub-unit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Інкапсуляція з ліпосомами описана Fullerton, US Patent 4,235,877.

Подальший аспект винаходу - це процес виготовлення імуногенної композиції чи вакцини за винаходом, що включає стадію змішування MenA та MenC сахаридів за винаходом, виготовлених способом за винаходом, з MenW та MenY, що не вироблялись відповідно до винаходу, та з фармацевтично прийнятним ексципієнтом.

Під термінами "що містить", "містити" та "містить" заявник має на увазі необов'язкове заміщення на терміни "що складається з", "складатися з" та "складається з", відповідно, в кожному прикладі.

Всі посилки або патентні заявки, цитовані в цьому описі винаходу об'єднані посилкою тут.

Винахід ілюструється прикладами, що додаються. Приклади, наведені нижче, виконували, використовуючи стандартні методики, які добре відомі та знайомі фахівцям, виключення описані в деталях. Приклади ілюструють але не обмежують винахід.

Приклади

Приклад 1 - приготування полісахаридних кон'югатів

Приклад 1a - приготування менингококового MenA та MenC капсулярного полісахаридного кон'югату відповідно до винаходу

MenC -ТТ кон'югати були вироблені, використовуючи нативні полісахариди (понад 150kDa як виміряно за MALLS) або злегка мікрофлюїдизовані. MenA-ТТ кон'югати були вироблені, використовуючи або нативний полісахарид або злегка мікрофлюїдизований полісахарид понад 60kDa як виміряно за методом MALLS прикладу 2. Фракціонування було здійснене мікрофлюїдизацією, з використанням гомогенізатору Emulsiflex C-50. Потім полісахариди фільтрували через фільтр 0.2мкм.

Для того, щоб кон'югувати MenA капсулярного полісахариду до правцевого анатоксину через спайсер, використовували наступний метод. Ковалентне зв'язування полісахариду та спайсера (ADH) виконували хімічним сполученням, за яким полісахариди активують при контрольованих умовах ціануючим агентом, 1-ціано-4-диметиламіно-піридину тетрафтороборатом (CDAP). Спайсер реагує з ціанованим PS через його гідрозгрупи, утворюючи стабільний ізосочинний зв'язок між спайсером та полісахаридом.

10мг/мл розчин MenA (pH 6.0) [3.5 г] був оброблений свіжо приготовленим 100мг/мл розчином CDAP в суміші ацетонітрил/вода (50/50 (о/о)) для отримання співвідношення CDAP/MenA 0.75 (м/м). Після 1.5 хвилин, pH підняли до 10.0. Три хвилини потому, додали ADH, щоб отримати співвідношення ADH/MenA 8.9. pH розчину понизили до 8.75 та реакція продовжувалась 2 години підтримуючи цей pH (з утриманням температури 25 °C).

PSA_{АН} розчин концентрували до чверті початкового об'єму та потім діалізували з 30 об'ємами 0.2M розчину NaCl, використовуючи мембрану Filtron Omega з порами 10kDa, та фільтрували ретентат.

Перед реакцією кон'югації (карбоїмідна конденсація), очищений ТТ розчин та PSA_{АН} розчин розвели до досягнення концентрації 10 мг/мл для PSA_{АН} та 10 мг/мл для ТТ. EDAC (і-етил-3-(3-диметиламінопропил)карбодіімід) додали до розчину PSA_{АН} (2г сахариду) з метою досягти кінцевого співвідношення 0.9 мг EDAC/мг PSA_{АН}. pH довели до 5.0. Очищений правцевий анатоксин додали за допомогою перистатичного насоса (через 60 хвилин) для досягнення 2 мг ТТ/мг PSA_{АН}. Розчин, що одержали в результаті, залишили на 60 хв при +25°C зі струшуванням, щоб кінцевий сумарний час склав 120 хв. Розчин нейтралізували додаванням 1M розчину Tris-HCl pH 7.5 (1/10 кінцевого об'єму) та залишили на 30 хвилин при +25°C, а потім на ніч при температурі від +2°C до +8°C.

Кон'югат робили прозорим, використовуючи фільтр з порами 10мкм, та очищували на колонці Сефакрил S400HR (Pharmacia, Sweden). Колонку збалансували в 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.075 M NaCl розчинах та кон'югат (близько 660мл) загрузили в колонку (+2°C до +8°C). Пулелювання вибирали за значенням оптичної густини при 280 нм. Збирання почали, коли поглинання зросло до 0.05. Збір продовжували до досягнення Kd 0.30. Кон'югат фільтрували стерилізованим при +20°C, потім зберігали від +2°C до +8°C. Кон'югат, що отримали в результаті, мав співвідношення полісахарид:протеїн 1:2-1:4 (м/м).

Для того, щоб кон'югувати MenC капсулярного полісахариду до правцевого анатоксину через спайсер, використали наступний метод. Ковалентне зв'язування полісахариду та спайсера (ADH) виконують хімічним сполученням, за яким полісахарид активують при контрольованих умовах ціануюлющим агентом, 1-ціано-4-диметиламіно-піридину тетрафтороборатом (CDAP). Спайсер реагує з ціанованим PS через його гідрозгрупи, утворюючи стабільний ізосечовинний зв'язок між спайсером та полісахаридом.

20мг/мл розчин MenC (pH6.0) (3.5 г) обробили свіжо приготовленим 100мг/мл розчином CDAP в суміші ацетонітрил/вода (50/50 (о/о)) для отримання співвідношення CDAP/MenC 1.5 (м/м). Після 1.5 хвилин, pH підвищили до 10.0. При активації pH додали 5M розчин NaCl, щоб досягти кінцевої концентрації розчину NaCl 2M. Три хвилини потому, додали ADH для отримання співвідношення ADH/MenC 8.9. pH розчину понизили до 8.75 та реакцію продовжувалась ще 2 години (утримана при 25 °C).

Розчин PSC_{АН} був концентрований щонайменше до 150 мл, а потім діалізований з 30 об'ємами 0.2M розчину NaCl, використовуючи мембрану Filtron Omega з порами 10kDa, ретентат фільтрували.

Перед реакцією сполучення, очищений розчин ТТ та PSC_{АН} розчин (2г шкала) розводили в 0.2M розчині NaCl до досягнення концентрації 15 мг/мл для PSC_{АН} та 20 мг/мл для ТТ.

Очищений правцевий анатоксин додали до розчину PSC_{АН} з метою досягти 2 мг ТТ/мг PSC_{АН}. pH доводять до 5.0. EDAC (16.7 мг/мл в Tris 0.1 M pH 7.5) додали за допомогою перистальтичного насоса (через 10 хвилин), щоб досягти кінцеве співвідношення 0.5 мг EDAC/мг PSC_{АН}. Розчин, що отримали в результаті, залишали на 110 хв при +25°C зі струшуванням та pH регулюванням для одержання кінцевого сумарного часу 120 хв. Потім розчин нейтралізували, додаючи 1M розчин Tris-HCl pH 9.0 (1/10 кінцевого об'єму) та залишили на 30 хвилин при +25°C, а потім на всю ніч від +2°C до +8°C. Кон'югат робили прозорим, використовуючи фільтр з порами 10мкм, та очищували на колонці Сефакрил S400HR (Pharmacia, Sweden). Колонку збалансували в 10 mM розчині Tris-HCl (pH 7.0), 0.075 M NaCl та кон'югат (близько 460мл) загрузили в колонку (від +2°C до +8°C). Пул елювання вибирали за значенням оптичної густини при 280 нм. Збирання почали, коли поглинання зросло до 0.05. Збір продовжували до досягнення Kd 0.20. Кон'югат фільтрували стерилізованим при +20°C, потім зберігали від +2°C до +8°C. Кон'югат, що отримали в результаті мав співвідношення полісахарид:протеїн 1 :2-1:4 (м/м).

Виконані різноманітні експерименти додавання EDAC понад 10-45 хвилин - в кожному випадку була отримана гарна якість MenC кон'югатів. Якщо, однак ТТ носій повільно додавали останнім до суміші MenC-ADH + EDAC, це призводило до гель - кон'югату, що не могло бути очищеним.

Експерименти також виконували, додаючи EDAC всі одразу в реакцію але кінцеве співвідношення ТТ/PS (2.7/1) (м/м) кон'югату було нижче ніж для кон'югату, отриманому через реакцію де EDAC додавали понад 10 хвилин (3.3/1); до того ж обидві αТТ та αPS були нижче ніж, ті що виміряні відносно кон'югату отриманого реакцією де EDAC додавали понад 10 хвилин.

Зазначте приблизну % Модифікації полісахаридів

MenCAN: після CDAP обробки з ADH близько 3.47% гідроксильних груп були модифікованими з ADH (з розрахунку дві доступні гідроксильні групи на субодиницю, що повторюється). Для MenA: близько 11.5% гідроксильних груп модифікованих з ADH (приймаючи до уваги наявність тільки однієї доступної гідроксильної групи на одиницю, що повторюється).

Приклад 1b - приготування пневмококового капсулярного PS 3 полісахаридного кон'югату

1) PS03-ТТ_{АН} процес : PS03-ТТ_{АН}208

Фракціонування на Emulsiflex

PS зважували, ґрунтуючись на 10% теоретичному вмісті води. Нативний PS розчиняли протягом ночі в 2M розчині NaCl до початкової концентрації 3 мг/мл. Перед фракціонуванням розчин нативного PS очищували на фільтрі з порами 5 мкм.

Гомогенізатор EMULSIFLEX C-50 використовували для зменшення молекулярної маси та в'язкості полісахариду перед стадією активації. Ефективність фракціонування залежить від циркулюючого тиску, тиску питательного плунжера та загальної кількості циклів. З метою покращити ефективність фракціонування (а отже скоротити загальну кількість циклів), клітини, що гомогенізують, Emulsiflex були замінені клітинами фіксованої геометрії (Microfluidics F20Y-0.75 мкм камера для взаємодії). Мета фракціонування полягає у скороченні молекулярної маси та в'язкості PS без критичного зниження його антигенності.

Розмір скорочення робили при 6000 ± 500 psi (фунтів на квадратний дюйм) та наступним вимірюванням в'язкості в процесі. Фракціонування зупиняли, коли досягалась 2.0 ± 0.2 ер.

Фільтрація фракціонованих PS на 0.22 мкм

Фракціоновані PS фільтрували на мембрані Millipack 40 (пора 0.22 мм) зі швидкістю потоку 10 мл/хв.

ТТ модифікування

Стадію модифікування проводили при 25°C з постійним струшуванням у водяній бані з контролем Т° температури. ТТ розводили в 0.2М розчині NaCl, щоб отримати кінцеву концентрацію ТТ 25 мг/мл. ADH додавали в твердій формі до розчину ТТ, щоб досягти кінцевої концентрації 0.2М. Після повного розчинення ADH, pH розчину встановлювали на 6.2 $\pm$ 0.1, використовуючи розчин HCl.

Потім EDAC додали до розчину ТТ/ADH, щоб досягти кінцевої концентрації 0.02М. pH встановлювали на 6.2 $\pm$ 0.1 використовуючи розчин HCl та утримували регулюючи pH протягом 1 години.

Після стадії модифікування, pH підвищили до pH 9.5 використовуючи розчин NaOH для зупинення реакції. Розчин залишали на 2 години при регулюванні pH перед стадією діалізації.

Діалізація

ТТ_{АН} похідну діалізували з метою видалення непрореагувавших ADH та EDAC сопродуктів. Діалізацію виконували на мембрані CENTRAMATE (0.09 м², з порами 10 kDa). Розчин діалізували на фоні 20 об'ємів 0.2М розчину NaCl.

Наступну за стадією діалізації виконували кількісним аналізом ADH (TNBS аналіз) в проникненні після 5, 10, 15 та 20 об'ємів діалізації.

Фільтрація на 0.22 мкм

В заключення ТТ_{АН} фільтрували на мембрані (Millipack 40) з порами 0.22 зі швидкістю потоку 10 мл/хв. Потім відфільтрований ТТ_{АН} зберігали при -70°C.

PS3-ТТ_{АН} кон'югат

Умови процесу були наступними:

Початкова концентрація PS3 2 мг/мл в 2 М розчині NaCl, початкове ТТ_{АН}/PS3 співвідношення 1.5/1 (м/м), EDAC концентрація 0.5 мг/мг PS, та ТТ концентрація 10 мг/мл в 0.15М розчині NaCl.

50мг PS3 розводили в 2М розчині NaCl, щоб отримати кінцеву концентрацію PS 2мг/мл. Очищений ТТ_{АН} розчин розбавили в 0.2М розчині NaCl, щоб досягти концентрацію 10 мг/мл. pH розчину PS3 доводили до 5, використовуючи розчин HCl.

EDAC додали в твердому стані до розчину PS3 з метою досягти кінцевої концентрації 0.5 мг EDAC/ мг PS. pH довели до 5.0 $\pm$ 0.05 за допомогою розчину HCl та ТТ_{АН} додали вручну через 11 хвилин (аліквота/хв). Розчин, що отримали в результаті, інкубували 109 хв при + 25°C зі струшуванням та регулюванням pH, щоб отримати кінцевий сумарний час 120 хв. Потім розчин нейтралізували додаванням 1М розчину Tris-HCl pH 7.5 та залишили на 30 хв при +25°C. Кон'югат заключно очищували (робили прозорим) на мембрані з порами 5мкм та вприскували в колонку Сефакрил S400HR.

2) PS03-ТТ_{АН} процес : PS03АН-ТТ215

Фракціонування на Emulsiflex

Як зазначено вище.

Фільтрація фракціонованих PS на 0.22 мкм

Як зазначено вище. PS3 модифікування

Стадію модифікування проводили при 25°C з постійним струшуванням у водяній бані з контролем Т° температури. PS3 розводили в NaCl розчині 2М щоб отримати кінцеву концентрацію PS 3 мг/мл. pH розчину PS встановлювали на 6.0 перед додаванням CDAP (0.25 мг/мг PS, розчинення до 100 мг/мл в суміші ацетонітрил/WFI). pH підвищили до 9.5, використовуючи NaOH перед додаванням ADH (8.9 мг ADH/мг PS, розчинення до 100 мг/мл в 0.2М розчині NaCl). pH утримували на 9.5 та регулювали протягом 60 хвилин. Відсоток модифікування відповідав 2.4% (2.4 мг ADH/100 мг PS). Це може бути виміряно по відомій методиці: TNBS для оцінки ADH; та DMAB чи резорцин (Monsigny et al (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530) для кількісного аналізу PS. У цьому випадку, TNBS дозування було 228 мкг/мл та PS дозування: 5250 мкг/мл.

Поданий Mw ADH становить 174.2, та Mw фрагменту, що повторюється, PS3 становить 338.27 (маючи 1 COOH та 4 OH групи), це становить 1.3 мкмоль ADH /15.52 мкмоль фрагменту, що повторюється, або 1,3 мкмоль ADH / 62.08 мкмоль реакційно здатної гідроксильної групи. 2.09% PS3 гідроксильних груп були ADH модифікованими гідроксильними групами.

Діалізація

PS3_{АН} похідні діалізували з метою видалення непрореагувавших ADH та CDAP сопродуктів. Діалізацію проводили на мембрані UFP-30-C-H24LA (42 см², з порами 30 kDa). Розчин діалізували на фоні 20 об'ємів 0.2М розчину NaCl.

Наступна за стадією діалізації була виконана кількісним аналізом ADH (TNBS аналіз) в проникненні після 5, 10, 15 та 20 об'ємів діалізації.

Фільтрація на 0.22 мкм

PS_{АН} заключно фільтрували на мембрані (Millipack 40) з порами 0.22 мкм зі швидкістю потоку 10 мл/хв. Потім відфільтрований PS3_{АН} зберігали при 4°C.

PS3_{АН}-ТТ кон'югат

Умови процесу були наступними:

Початкова концентрація PS3 2 мг/мл в 2 М розчині NaCl, початкове ТТ/PS3_{АН} співвідношення 1.5/1 (м/м), EDAC концентрація 0.5 мг/мг PS, та ТТ концентрація 10 мг/мл в 0.15М розчині NaCl.

50мг of PS3_{АН} розводили в 0.2М розчині NaCl, щоб отримати кінцеву концентрацію PS 2 мг/мл. Очищений ТТ розчин розбавили в 0.2М розчині NaCl, щоб досягти концентрацію 10 мг/мл. PS3_{АН} розчин доводили до pH 5, використовуючи розчин HCl. EDAC додали і твердому стані до PS3_{АН} розчину з метою досягти кінцевої концентрації 0.5 мг EDAC/ мг PS. pH довели до 5.0 $\pm$ 0.05 за допомогою розчину HCl та через 10 хвилин додали ТТ, використовуючи перистальтичний насос. Розчин, що отримали в результаті, інкубували 110 хв при + 25°C зі струшуванням та регулюванням pH, щоб отримати кінцевий сумарний час 120 хв. Потім розчин нейтралізували додаванням 1М розчину Tris-HCl pH 7.5 та залишили на 30 хв при +25°C. Кон'югат заключно очищували (робили прозорим) на мембрані з порами 5мкм та вприскували в колонку Сефакрил S400HR.

3) PS03_{АН}-ТТ процес : PS3_{АН}-ТТ217

Фракціонування на Emulsiflex

Як зазначено вище.

Фільтрація фракціонованих PS на 0.22 мкм

Як зазначено вище. PS3 модифікування

Як для 215 кон'югату.

Діафільтрація

Як для 215 кон'югату.

Фільтрація на 0.22 мкм

Як для 215 кон'югату.

PS3_{АН}-ТТ кон'югат

Умови процесу були наступними:

Початкова концентрація PS3 2 мг/мл в 2 М розчині NaCl, початкове ТТ/PS3_{АН} співвідношення 1.5/1 (м/м), EDAC концентрація 0.5 мг/мг PS, та ТТ концентрація 10 мг/мл в 0.15М розчині NaCl.

50мг of PS3_{АН} розводили в 0.2М розчині NaCl, щоб отримати кінцеву концентрацію PS 2 мг/мл. Очищений ТТ розчин розбавили в 0.2М розчині NaCl, щоб досягти концентрацію 10 мг/мл. PS3_{АН} та ТТ розчини змішали та довели рН до 5 використовуючи розчин HCl. EDAC розчинили в Tris 1М буфері рН 7.5. 40мкл EDAC додавали кожної хвилини (10 хвилин, щоб досягти співвідношення EDAC/PS (0.5мг EDAC/мг PS)). Розчин, що отримали в результаті, інкубували 110 хв при + 25°C зі струшуванням та регулюванням рН, щоб отримати кінцевий сумарний час 120 хв. Потім розчин нейтралізували додаванням 1М розчину Tris-HCl рН 7.5 та залишили на 30 хв при +25°C. Кон'югат заключно очищували (робили прозорим) на мембрані з порами 5мкм та вприскували в колонку Сефакрил S400HR.

4) PS03_{АН}-ТТ процес : PS3_{АН}-ТТ218

Фракціонування на Emulsiflex

Як зазначено вище.

Фільтрація фракціонованих PS на 0.22 мкм

Як зазначено вище.

PS3 модифікування

Стадію модифікування проводили при 25°C з постійним струшуванням у водяній бані з контролем температури. PS3 розводили в NaCl розчині 2М щоб отримати кінцеву концентрацію PS 3 мг/мл. EDAC додавали в твердому стані, щоб досягти співвідношення EDAC/ PS 0.1мг/мг PS. Після повного розчинення, рН розчину встановлювали на 5. Потім через 44 хвилини додали ADH (8.9мг ADH/мг PS, розчинення до 100мг/мл в 0.2М розчині NaCl), використовуючи перистальтичний насос (не зважаючи на присутність по суті надмірності ADH, пряме додавання також було б добрим ОК). рН утримували 5.0+/-0.1 та регулювали протягом 120 хвилин (44' + 76'). Реакцію зупиняли підвищуючи рН до 7.5 використовуючи гідроксид натрію. Відсоток модифікування відповідав 3.7% (мг ADH/ мг PS). TNBS дозування було 220 мкг/мл та PS дозування - 5902 мкг/мл, таким чином 1.26 мкмоль ADH / 17.44 мкмоль фрагменту, що повторюється (=мкмоль реакційноздатної COOH групи). Таким чином, 7.22% PS3 карбоксильних груп були ADH модифікованими COOH групами.

Діафільтрація

PS3_{АН} похідні діафільтрували з метою видалення непрореагувавших ADH та EDAC сопродуктів. Діафільтрацію проводили на мембрані UFP-30-C-H24LA (42 см², з порами 30 kDa). Розчин діалізували на фоні 23 об'ємів 0.2М розчину NaCl. Наступна за стадією діафільтрацією була виконана кількісним аналізом ADH (TNBS аналіз) в проникненні після 5,10,15 та 20 об'ємів діафільтрації.

Фільтрація на 0.22 мкм

PS_{АН} заключно фільтрували на мембрані з порами 0.22 мкм (Millipack 40) зі швидкістю потоку 10 мл/хв. Потім відфільтрований PS3_{АН} зберігали при 4°C.

PS3_{АН}-ТТ кон'югат

Умови процесу були наступними:

Початкова концентрація PS3_{АН} 2 мг/мл в 2 М розчині NaCl, початкове ТТ/PS3_{АН} співвідношення 1.5/1 (м/м), EDAC концентрація 0.5 мг/мг PS, та ТТ концентрація 10 мг/мл в 0.15М розчині NaCl.

50мг PS3_{АН} розбавили 0.2М розчином NaCl, щоб отримати кінцеву концентрацію PS 2 мг/мл. Очищений ТТ розчин розбавили в 0.2М розчині NaCl, щоб досягти концентрацію 10 мг/мл. PS3_{АН} та ТТ розчини змішали разом.

рН довели до 5.0 ± 0.05 за допомогою розчину HCl та EDAC добавили вручну через 10 хвилин (рівні частини-аліквоти додавали кожну хвилину). Розчин, що отримали в результаті, інкубували 110 хв при + 25°C зі струшуванням та регулюванням рН, щоб отримати кінцевий сумарний час 120 хв. Потім розчин нейтралізували додаванням 1М розчину Tris-HCl рН 7.5 та залишили на 30 хв при +25°C. Кон'югат заключно очищували (робили прозорим) на мембрані з порами 5мкм та вприскували в колонку Сефакрил S400HR.

Висновки:

Різні кон'югати були отримані з використанням карбодіімідних методів на стадії кон'югації. Останній доданий до реакційного розчину компонент може бути або ТТ протеїном або EDAC реагентом. Час додавання може впливати на результуючі кон'югати.

PS3_{АН}ТТ215 & 217 кон'югати:

Одинакові компоненти та умови використовували для приготування обох кон'югатів.

Спосіб, в якому додавали останній компонент, був інший. PS3_{АН}ТТ217 кон'югат призвів до продукту, який відповідав критеріям in-vitro. Він був зроблений додаванням EDAC через 10 хвилин.

PS3_{АН}ТТ215 кон'югат, однак, не міг бути відфільтрований на стерильній мембрані. Для нього, останній доданий до реакційного середовища компонент був ТТ (через 10 хвилин).

Кінцеві ТТ/PS співвідношення були дуже різними для обох кон'югатів. (0.98/1 проти 0.50/1). Якщо EDAC додають першим до PS_{АН} (маючи обидві реакційно здатні аміно та карбоксильну групи), то це може призвести до внутрішнього перехресного зшивання гідрозину та карбоксильної груп, присутніх на полісахариді, а таким

чином, могло б призвести до більшого перехресно зшитого кон'югату зі слабшим кінцевим співвідношенням після додавання ТТ через 10 хвилин.

Цей ефект не спостерігається для PS₃ADH-ТТ217 кон'югату. ТТ об'єднання відбувалося краще при додаванні EDAC через 10 хвилин, можливо завдяки меншому внутрішньому перехресному зшиванню, та кращому зовнішньому перехресному зшиванню між гідрозгрупами PS₃ADH та карбоксильними групами протейну.

У випадку 218 кон'югату, як PS₃ EDAC модифікація тільки частково модифікованого полісахариду (зберегти більшість полісахаридних епітопів незрушеними), проти присутніх як реакційно здатних аміно так і карбоксильних груп, звідси повільне додавання EDAC на кінцевій стадії сполучення є також сприятливим.

Повільне додавання ТТ на кінцевій стадії сполучення було корисним (однак) для 208 кон'югату, де ТТ був модифікованим ADH (та включає аміно і карбоксильну групи), оскільки PS₃ залишали з його нативними реакційноздатними -OH та -COOH групами як частиною його субфрагменту, що повторюється. Додавання EDAC до PS₃ не мало вищезгаданого ефекту перехресного зшивання, а повільне додавання модифікованого ТТ призвело до кон'югату з гарними in-vitro характеристиками - дивись нижче.

Характеристики in-vitro:

Кон'югат.	Модифікування/Метод	Кон'югація/ Метод	Додавання кінц. компоненту
208	ТТ/ADH → EDAC	PS-ТТ _{ADH} → EDAC	ТТ _{ADH} доданий через 11
215	PS ₃ /ADH → CDAP	PS _{ADH} -ТТ → EDAC	ТТ доданий через 10
217	PS ₃ /ADH → CDAP	PS _{ADH} -ТТ → EDAC	EDAC доданий через 10 хвилин
218	PS ₃ /ADH → EDAC	PS _{ADH} -ТТ → EDAC	EDAC доданий через 10 хвилин

Кон'юга т.	PS	[PS] (мг/мл)	[ТТ] (мг/мл)	In.ТТ/PS співвід	[EDAC] (мг/мл)	Сумар.час (хв.)
208	C6E02	2.0	10 (ТТ _{ADH}), HACOC	1.5/1	0.5/1	120
215	3 _{ADH} 001 (CDAP)	2.0	10 насос	1.5/1	0.5/1	120
217	3 _{ADH} 001 (CDAP)	2.0	10	1.5/1	0.5/1 (Фракції)	120
218	3 _{ADH} 002 (EDAC)	2.0	10	1.5/1	0.5/1 (Фракції)	120

Кон'югат.	F.ТТ/PS співвідн. (м/м)	Вихід PS (%)	Фільтр, вихід (%)	Вільний PS	aPS/ aPS (%) Антигенність	aТТ/aPS (%) Антигенність
208	1.84/1	69	95	10.2	99	103 100'
215	0.50/1	17	27	-	-	-
217	0.98/1	66	100	0.7	17	103 100*
218	0.88/1	74	101	11.0	34	222 216*

"Відносно до 208 кон'югату

Приклад 1с - приготування S. typhi Vi полісахаридного кон'югату за винаходом Фракціонування на Emulsiflex

PS зважували, ґрунтуючись на 15% теоретичному вмісті води. Нативний PS розчиняли протягом ночі в WFI до початкової концентрації 7 мг/мл. До фракціонування, розчин нативного PS очищували на фільтрі з порами 10 мкм зі швидкістю потоку 50 мл/хв. Гомогенізатор EMULSIFLEX C-50 використовували, щоб скоротити молекулярну масу та в'язкість полісахариду перед стадією активації. Ефективність фракціонування залежить від циркулюючого тиску, тиску питательного плунжерата загальної кількості циклів. З метою покращити ефективність фракціонування (а отже скоротити загальну кількість циклів), клітини, що гомогенізують, Emulsiflex були замінені клітинами фіксованої геометрії (Microfluidics F20Y-0.75 мкм камера для взаємодії). Мета фракціонування полягає у скороченні молекулярної маси та в'язкості PS без критичного зниження його антигенності.

Розмір скорочення здійснювали при 15000 ± 500 psi (фунтів на квадратний дюйм) та наступним вимірюванням в'язкості в процесі. Фракціонування зупиняють, коли досягається 5.0 ± 0.3 ер.

Фільтрація фракціонованих PS на 0.22 мкм

Фракціоновані PS фільтрують на мембрані Millipack 40 (пори 0.22 мкм) зі швидкістю потоку 10 мл/хв. Відфільтровані фракціоновані PS зберігають при -20°C.

Модифікування полісахариду Vi

1.5 г фракціонованих Vi PS розчинили при 25 °C в EPI при взбитуванні (5 мг/мл). 13.35 г ADH (8.9 мг ADH/мг PS) додають до PS розчину. Після повного розчинення 1N розчином HCl довели pH до 5.0 ± 0.05. EDAC (0.1 мг/мг PS) додали в твердому стані. Розчин залишили на 60 хвилин при 25°C. Потім розчин нейтралізували, додаючи 1M Tris-HCl pH 7.5, та залишили що найменше на 30 хвилин при 25°C (максимум 2 години). Встановили, що рівень модифікування складає 4.55% використовуючи TNBS дозування (мг ADH/100 мг PS). TNBS дозування було 200 мкг/мл та PS дозування - 4034 мкг/мл; таким чином 0.0697 мкмоль ADH

/16.46 мкмоль фрагменту, що повторюється (Mw245). 1.3 мкмоль ADH /16.46 мкмоль реакційноспроможних COOH груп на Vi, таким чином 7% Vi COOH груп були ADH модифікованими COOH групами.

Діафільтрація

PSVi_{ADH} похідну діафільтрували з метою видалення непрореагувавших ADH та EDAC сопродуктів. Діафільтрацію проводили на мембрані CENTRAMATE (0.09 м², пора 10 kDa). Розчин діалізували проти 20 об'ємів 0.2M розчину NaCl. Наступною за стадією діафільтрації виконували кількісним аналізом ADH (TNBS проба) в проникненні після 3, 5, 10 та 20 об'ємів діафільтрації.

Фільтрація на 0.22 мкм

PSVi_{ADH} на кінцевій стадії фільтрували на мембрані з порами 0.22 мкм (Millipack 40) зі швидкістю потоку 10 мл/хв. Відфільтрований PSVi_{ADH} зберігають при +2/+8°C протягом не більше 4 днів.

PSVi_{ADH}-TT кон'югати

Умови процесу були наступні:

Початкова PSVi_{ADH} концентрація 2 мг/мл в 0.2 M розчині NaCl, початкове TT/PSVi_{ADH} співвідношення - 2.5/1 (м/м), EDAC концентрація 0.25 мг/мл PS та TT концентрація 10 мг/мл в 0.2M розчині NaCl.

1г PSVi_{ADH} розведений в 0.2M розчині NaCl, щоб отримати кінцеву PS концентрацію 2 мг/мл (дозування уронової кислоти). Очищений TT розчин розводили в 0.2M розчині NaCl, щоб досягти концентрацію 10 мг/мл.

TT додавали до PSVi_{ADH} розчину з метою досягти кінцеве співвідношення 2.5 мг TT/ мг PS. 1N розчином HCl pH доводять до 5.0 ± 0.05. Потім EDAC розчин (7.5 мг/мл в 0.1 M Tris pH 7.5) додали (через 10 хвилин перестальтичним насосом), для досягнення 0.25 мг EDAC/ мг PSVi_{ADH}. Розчин, який одержали в результаті, інкубували 50 хв при + 25°C зі струшуванням та pH регуляцією, щоб отримати кінцевий сумарний час 60 хв. Потім розчин нейтралізували додаванням 1M розчину Tris-HCl pH 7.5 та залишили на 30 хв при +25°C. Кон'югат перенесли при 4°C та залишають на всю ніч при умові слабого струшування до стадії хроматографування.

Очистка

Перед елюванням на Сефакрилі S400HR, кон'югат очищували (робили прозорим) використовуючи 10 мкм фільтр Kleenpak. Швидкість потоку зафіксували на 100 мл/хв. Потім кон'югат вприскували на Сефакрил S400HR та відбірочний пул оцінювали по Kd величині. Наступний критерій був використаний для відбору пулу: від OD= 0.05 при 280 нм зібраних на старті та фініші, коли Kd= 0.22.

Стерилізуюча фільтрація

До фільтрації, основну масу перенесли назад до кімнатної температури. Потім кон'югат фільтрували на Opticar 4" стерилізуючій мембрані. Швидкість потоку зафіксували на 30 мл/хв.

Аналітичні

Результуючий кон'югат мав кінцеве TT/PS співвідношення (м/м) 2.44/1, вміст PS - 3.7% та αPSA/αPS антигенність - 58%.

Приклад 1d - приготування інших полісахаридних кон'югатів

Ковалентне зв'язування Haemophilus influenzae (Hib) PRP полісахариду до TT було проведене хімічною конденсацією розробленою Chu та іншими (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256). Hib PRP полісахарид був активований додаванням CNBr та інкубацією при pH 10.5 протягом 6 хвилин. Потім pH була понижена до pH 8.75 та додали гідратид адипінової кислоти (ADH) й інкубацію продовжували ще протягом 90 хвилин. Активований PRP був приєднаний до очищеного антиотоксину правця через карбодіімідну конденсацію використовуючи 1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл)карбодіімід (EDAC). EDAC додавали до активованого PRP, щоб досягти кінцеве співвідношення 0.6 мг EDAC/мг активованого PRP. pH довели до 5.0 та додали очищений антиотоксин правця, щоб досягти 2мг TT/мг активованого PRP. Результуючий розчин залишили на три дні з м'яким перемішуванням. Після фільтрації через 0.45мкм мембрану, кон'югат очищували на колонці з сефакрилом S500HR (Pharmacia, Sweden) збалансованій в 0.2M NaCl.

MenC -TT кон'югати були вироблені, з використанням нативних полісахаридів (більше 150kDa як виміряно MALLS), або незначною мірою мікрофлюїдизовані. MenA-TT кон'югати були вироблені, з використанням або нативних полісахаридів або незначною мірою мікрофлюїдизованих полісахаридів більше 60kDa як виміряно MALLS методом прикладу 2. MenW та MenY-TT кон'югати були вироблені, з використанням фракціонованих полісахаридів близько 100-200kDa як виміряно MALLS (дивись приклад 2). Фракціонування здійснювали мікрофлюїдизацією з використанням гомогенізатора Emulsiflex C-50. Потім полісахариди фільтрували через 0.2мкм фільтр.

Активация та пряме сполучення проводили як описано в WO96/29094 та WO 00/56360. Коротко, полісахарид концентрацією 10-20мг/мл в 2M NaCl pH

5.5-6.0 змішали з CDAP розчином (100мг/мл свіжо виготовлений в ацетонітрилі/WFI, 50/50) до кінцевого CDAP/ полісахарид співвідношенні 0.75/1 чи 1.5/1. Після 1.5 хвилин, pH підвищили розчином гідроксиду натрію до pH10.0. Через три хвилини додали антиотоксин правця, щоб досягти співвідношення протеїн/полісахарид 1.5/1 для MenW, 1.2/1 для MenY, 1.5/1 для MenA або р 1.5/1 для MenC. Реакція продовжувалась від одного до двох годин.

Після стадії сполучення, додали гліцин до кінцевого співвідношення гліцин/PS (м/м) 7.5/1 та pH довели до 9.0. Суміш залишили на 30 хвилин. Кон'югат очищували використовуючи 10 мкм фільтр Kleenpak, а потім загрузили в Сефакрилову колонку S400HR використовуючи для елювання буфер 150mM NaCl, 10 mM чи 5mM Tris pH7.5.

Клінічні серії фільтрували на стерилізуючій мембрані Opticar 4. Кон'югати, які отримані в результаті, мали середнє співвідношення полісахарид:протеїн 1:1-1:5 (м/м).

Приклад 2 - визначення молекулярної маси використовуючи MALLS

Детектори було з'єднано з PXBT колонкою з виключенням розміру часток, з якої отримували елюат. З одного боку, детектор розсіювання лазерного світла вимірював інтенсивність світла, розсіяного під 16 кутами макромолекулярним розчином, і з іншого боку, інтерференційний рефрактометр, лінійно розміщений, дозволяв визначати кількість вимитого зразка. За цими інтенсивностями можна визначати розмір і форму

макромолекул в розчині.

Середню молекулярну масу (M_w) визначали як суму мас всіх різновидів, помножену на їх відповідну молекулярну масу і поділену на суму мас всіх різновидів.

a) Середня масова молекулярна маса: $-M_w-$

$$M_w = \frac{\sum W_i}{\sum m_i} = \frac{m_i}{m_i}$$

b) Середня числова молекулярна маса: $-M_n-$

$$M_n = \frac{\sum N_i}{\sum m_i} = \frac{m_i}{m_i}$$

c) Середньоквадратичний радіус: $-R_w-$ та R^2_w - це квадрат радіусу визначений за:

$$R^2_w \text{ чи } (r^2)_w = \frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}$$

(m_i - є маса розсіюючого центру і та r_i - є відстань між розсіюючим центром і та центром тяжіння макромолекули).

d) Полідисперсність визначається як співвідношення $-M_w / M_n-$.

Менінгококові полісахариди аналізували методом MALLS, загружаючи в дві PXBT колонки (TSKG6000 та 5000PWxl), які використовували в комбінації. 25мкл полісахариду загрузили до колонки та елюювали 0.75 мл фільтрованої води. Полісахариди виявляли використовуючи світловий детектор розсіювання (Wyatt Dawn DSP, оснащений 10мВт аргонним лазером з довжиною хвилі 488нм) та нижньометричний рефрактометр (Wyatt Otilab DSP, оснащений P100 коміркою і червоним фільтром $\lambda = 498\text{нм}$).

Молекулярні маси полісахаридів та відновлення всіх зразків розраховували методом Debye використовуючи підбір багаточлена порядку 1 в програмі Astra 4.72.

Приклад 3 - Клінічні випробування встановлення ефекту лінкера в MenA в MenACWY кон'югаті вакцини

Одна доза різних композицій MenACWY вакцини вводили підліткам 15-19 років в 5 групах по 25 осіб в 1:1:1:1:1 випадкових пробах. Випробувані на композиціях були:

F1 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA кон'югатом, що містить АН (ADH) спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 5/5/5/5 мкг

F2 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA кон'югатом, що містить АН спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 2.5/5/2.5/2.5 мкг

F3 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA кон'югатом, що містить АН спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 5/5/2.5/2.5 мкг

F4 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з без спейсеру в будь-якому кон'югаті - 5/5/5/5 мкг

Контрольна група - Mencevax™ ACWY

На 30 день після прививки, у пацієнтів був взятий зразок крові.

Зразки крові використовували для встановлення ефекту відсоткового співвідношення SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 та SBA-MenY відгуків через один місяць після введення дози вакцини. Вакцинний відгук визначали як 1) для початкових серонегативних предметів - поствакцинальний титр антитіл $\geq 1/32$ за 1 місяць або 2) для початкових серонегативних предметів - титр антитіл ≥ 4 кратного довакцинального титру антитіл.

Результати

Як показано в Таблиці нижче, використання спейсеру в MenA кон'югаті призводить до зростання імунного відгуку проти MenA. Відсоткове співвідношення відгуків підвищується з 66% до 90-95% коли додавали АН спейсер. Це відображалось в зростанні в SBA GMT з 4335 до 10000 та зростанні в GMC з 5 до 20-40. Несподівано, використання АН спейсеру також призводить до зростання імунного відгуку проти MenC після перевірки зростанням у відсотковому співвідношенні відгуків та зростанням в SBA GMT. Зростання могло б також бути видним в SBA-GMT проти MenY (6742-7122) та проти MenW (4621-5418) коли ввели спейсер.

Композиція	% SBA MenA відгуки	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC мкг/мл ELISA
F 1 5АН/5/5/5	90.9	9805	20.38
F2 2.5АН/5/2.5/2.5	75	8517	29.5
F3 5АН/5/2.5/2.5	95.5	10290	47.83
F4 5/5/5/5	66.7	4335	5.46
Mencevax™	85.7	8022	27.39
Композиція	% SBA MenC відгуки	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC мкг/мл ELISA
F 1 5АН/5/5/5	69.6	3989	12.11
F2 2.5АН/5/2.5/2.5	81.8	3524	12.78
F3 5АН/5/2.5/2.5	81.8	3608	8.4
F4 5/5/5/5	73.9	2391	8.84
Mencevax™	90.0	5447	38.71
Композиція	% SBA MenW відгуки	SBA-MenW GMT	Anti-PSw GMC мкг/мл ELISA
F 1 5АН/5/5/5	95	5418	9.65
F2 2.5АН/5/2.5/2.5	85	4469	14.55

F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	4257	6.39
F4 5/5/5/5	95.5	4621	10.7
Mencevax™	86.4	2714	13.57
Композиція	% SBY MenY відгуки	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC мкг/мл ELISA
F 1 5AH/5/5/5	91.3	7122	16.3
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	87.5	5755	12.52
F3	80	5928	8.88
F4 5/5/5/5	91.3	6742	13.88
Mencevax™	91.7	4854	21.02

Приклад 4 - Клінічні випробування встановлення ефект лінкера в MenA та MenC кон'югати в MenACWY кон'югаті вакцини

Одна доза різних композицій MenACWY вакцини вводили підліткам 15-19 років в 5 групах по 25 осіб в 1:1:1:1:1 випадкових пробах. Випробувані на композиціях були:

F1 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA та MenC кон'югатами, що містять АН спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 2.5/2.5/2.5/2.5 мкг

F2 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA та MenC кон'югатами, що містять АН спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 5/5/2.5/2.5 мкг

F3 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA та MenC кон'югатами, що містять АН спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 5/5/5/5 мкг

F4 - MenACWY кон'югований до анатоксину правця з MenA кон'югатами, що містять АН спейсер (зроблений відповідно до прикладу 1) - 5/5/5/5 мкг

Контрольна група - Mencevax™ ACWY

На 30 день після прививки, у пацієнтів був взятий зразок крові.

Зразки крові використовували для встановлення ефекту відсоткового співвідношення SBA-MenA, SB A-MenC, SBA-MenW135 та SBA-MenY відгуків через один місяць після введення дози вакцини. Вакцинний відгук визначали як 1) для початкових серонегативних предметів - поствакцинальний титр антитіл $\geq 1/32$ за 1 місяць або 2) для початкових серонегативних предметів - титр антитіл ≥ 4 кратного довакцинального титру антитіл.

Результати

Введення АН спейсера в MenC кон'югат призводить до зростання імунного відгуку проти MenC як показано в таблиці нижче. Це демонструється зростанням в SBA GMT з 1943 до 4329 та зростанням в anti-PSC GMC з 7.65 до 13.13. Сильні імунні відгуки проти MenA, MenW та MenY зберігались.

Композиція	% SBA MenA відгуки	SBA-MenA GMT	Anti-PSA GMC мкг/мл ELISA
F	75	8417	20.23
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	72	6299	16.07
F3 5AH/5AH/5/5	87	9264	27.26
F4 5AH/5/5/5	77.3	9632	20.39
Mencevax™	78.3	8284	12.93
Композиція	% SBA MenC відгуки	SBA-MenC GMT	Anti-PSC GMC мкг/мл ELISA
F12.5AH/2.5AH/2.5/	88	3619	12.82
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	88	2833	13.32
F3 5AH/5AH/5/5	95.8	4329	13.13
F4 5AH/5/5/5	95.8	1943	7.65
Mencevax™	91.7	1567	16.55
Композиція	% SBA MenW відгуки	SBA-MenW GMT	Anti-PSW GMC мкг/мл ELISA
F	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	96	4679	5.4
F3 5AH/5AH/5/5	91.3	4422	4.45
F4 5AH/5/5/5	88	4947	7.67
Mencevax™	96	3486	11.93
Композиція	% SBY MenY відгуки	SBA-MenY GMT	Anti-PSY GMC мкг/мл ELISA
F1	75	3891	17.81
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	92	3968	11.96
F3 5AH/5AH/5/5	79.2	2756	9.51
F4 5AH/5/5/5	80	3914	16.76
Mencevax™	88	3056	21.41