



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/09 (2020.08); A61K 39/385 (2020.08); A61K 31/715 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2019114121, 15.01.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.01.2015

Дата регистрации:
26.02.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.01.2014 US 61/929,561

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2016127123 21.01.2014

(45) Опубликовано: 26.02.2021 Бюл. № 6

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

ХАН Мингминг (US),
ПРАСАД Аввари Кришна (US),
КУПЕР Дэвид (US),
УОТСОН Венди Джо (US)

(73) Патентообладатель(и):

ПФАЙЗЕР ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 0157899, 16.10.1985. US 5714354,
03/02/1998. EA 14107 B1, 29.10.2010. JANSSON
P.-E. ET AL. Structural studies of the capsular
polysaccharide from Streptococcus pneumoniae
types 15B and 15C. Carbohydrate research, 1987,
V.162, P.111-116. RU 2009135485 A, 27.04.2011.

(54) Капсульные полисахариды Streptococcus pneumoniae и их конъюгаты

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к иммуногенным конъюгатам, содержащим капсульный полисахарид Streptococcus pneumoniae серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем, к способам их

получения и к иммуногенным композициям, содержащим их. Изобретение можно использовать для лечения заболеваний, связанных с присутствием Streptococcus pneumoniae. 12 н. и 9 з.п. ф-лы, 1 ил., 4 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/09 (2020.08); A61K 39/385 (2020.08); A61K 31/715 (2020.08)(21)(22) Application: **2019114121, 15.01.2015**(24) Effective date for property rights:
15.01.2015Registration date:
26.02.2021

Priority:

(30) Convention priority:
21.01.2014 US 61/929,561Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2016127123 21.01.2014(45) Date of publication: **26.02.2021 Bull. № 6**

Mail address:

191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**HAN Mingming (US),
PRASAD Avvari Krishna (US),
COOPER David (US),
WATSON Wendy Jo (US)**

(73) Proprietor(s):

PFIZER INC. (US)(54) **STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CAPSULAR POLYSACCHARIDES AND CONJUGATES THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to immunogenic
conjugates containing a capsular polysaccharide
Streptococcus pneumoniae serotype 15B covalently
bound to a carrier protein, to methods for their
preparation and to immunogenic compositions

containing them.

EFFECT: invention can be used for treating diseases
associated with the presence of *Streptococcus*
pneumoniae.

21 cl, 1 dwg, 4 tbl, 1 ex

R U 2 7 4 3 7 9 3 C 1

R U 2 7 4 3 7 9 3 C 1

Область изобретения

Данное изобретение относится к выделенному капсульному полисахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В и к способам его получения. Изобретение также относится к иммуногенным конъюгатам, содержащим капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем, к способам их получения и к иммуногенным композициям и вакцинам, содержащим их.

Предшествующий уровень техники

Streptococcus pneumoniae представляют собой грамположительные, ланцетовидные кокки, которые обычно наблюдаются в парах (диплококки), а также в виде коротких цепочек или в виде отдельных клеток. Они хорошо растут на чашках с кровяным агаром с образованием блестящих колоний и демонстрируют альфа-гемолиз, а в случае анаэробного выращивания они демонстрируют бета-гемолиз. Клетки большинства пневмококковых серотипов имеют капсулу, которая представляет собой полисахаридное покрытие, окружающее каждую клетку. Эта капсула представляет собой детерминанту вирулентности у людей, так как она препятствует фагоцитозу путем предотвращения прикрепления антител к бактериальным клеткам. В настоящее время существует более 90 известных идентифицированных пневмококковых капсульных серотипов, с 23 наиболее распространенными серотипами, составляющими примерно 90% инвазивных заболеваний во всем мире. В качестве вакцины пневмококковое полисахаридное покрытие может придать достаточную степень иммунитета к *Streptococcus pneumoniae* субъектам с развитой и неослабленной иммунной системой, но капсульный полисахарид, конъюгированный с белком-носителем, обеспечивает иммунный ответ у детей раннего возраста и пожилых людей, которые также в большой степени рискуют быть инфицированными пневмококками.

С момента введения первой 7-валентной пневмококковой конъюгированной вакцины (PCV7 или Превенар) в 2000 году, инвазивное заболевание, вызванное этими семи серотипами (4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F и 23F) почти исчезло. Добавление серотипов 1, 3, 5, 6А, 7F и 19А в Превенар 13 дополнительно снижало число инвазивных пневмококковых заболеваний.

Однако частота инвазивных пневмококковых заболеваний, вызванных невакцинными серотипами, такими как *Streptococcus pneumoniae* серотипов 15А, 15В и 15С, в последнее время возросло (см., например, Beall B. et al, Journal of Clinical Microbiology. 44(3):999-1017, 2006, или Jacobs et Al, Clin Infect Dis. (2008) 47 (11): 1388-1395). Ни одна из имеющихся в настоящее время на рынке пневмококковых вакцин не обеспечивает надлежащей защиты против *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В у человека и, в частности у детей младше 2-х лет. Таким образом, существует потребность в иммуногенных композициях, которые можно использовать для индукции иммунного ответа против *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В. Также дополнительным преимуществом было бы то, что такая иммуногенная композиция могла быть использована для защиты субъектов против *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С и/или 15А.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, имеющий молекулярную массу от 5 кДа до 500 кДа.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен выделенный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, содержащий по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8, предпочтительно по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на

мМ указанного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В.

В еще одном аспекте, в настоящем изобретении предложен выделенный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, содержащий по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8, предпочтительно по меньшей мере 0,6 мМ глицерина

на мМ указанного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен иммуногенный конъюгат, содержащий выделенный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, раскрытый в данном описании изобретения, ковалентно связанный с белком-носителем. В одном аспекте указанный белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается иммуногенная композиция, содержащая иммуногенный конъюгат, раскрытый в данном описании изобретения, и физиологически приемлемый носитель. В одном аспекте указанная иммуногенная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный антиген. В одном аспекте указанная иммуногенная композиция

дополнительно содержит адъювант.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается вакцина, содержащая иммуногенную композицию, раскрытую в данном описании изобретения.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения

выделенного полисахарида серотипа 15В, раскрытого в данном описании изобретения, включающий следующие стадии:

(а) получение ферментационной культуры бактериальных клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В;

(б) лизис бактериальных клеток в указанной ферментационной культуре;

(в) очистка капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В из ферментационной культуры; и

(г) доведение очищенного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В до нужного размера посредством гомогенизации под высоким давлением.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения активированного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, включающий стадию взаимодействия выделенного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, раскрытого в данном описании изобретения, с окислителем. В одном аспекте настоящего изобретения предложен активированный капсульный полисахарид серотипа 15В, полученный или получаемый посредством вышеуказанного способа.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения иммуногенного конъюгата, содержащего капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем, включающий следующие стадии:

(а) смешивание активированного полисахарида, раскрытого в данном описании изобретения, с белком-носителем;

(б) взаимодействие смеси активированного полисахарида и белка-носителя с восстанавливающим агентом с образованием конъюгата капсульный полисахарид серотипа 15В-белок-носитель. В одном аспекте настоящего изобретения предложен иммуногенный конъюгат, полученный или получаемый посредством вышеуказанного способа.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, включающий введение субъекту иммуногенного количества иммуногенной композиции или вакцины, раскрытых в

данном описании изобретения.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, заболевания или состояния, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15A, 15B и/или 15C, у субъекта, включающий стадию введения терапевтически или профилактически эффективного количества иммуногенной композиции или вакцины, раскрытых в данном описании изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - Структура повторяющейся единицы пневмококкового капсульного полисахарида серотипа 15B.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение можно будет проще понять посредством ссылки на следующее подробное описание предпочтительных воплощений изобретения и на примеры, включенные в данное описание изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном описании изобретения, имеют такое же значение, как обычно понимает специалист в области техники, к которой относится изобретение. Хотя любые способы и вещества, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем описании изобретения, могут быть использованы в практическом воплощении или при тестировании настоящего изобретения, некоторые предпочтительные способы и вещества описаны в настоящем описании изобретения. В описанных воплощениях и формуле изобретения будет использоваться определенная терминология в соответствии с определениями, изложенными ниже.

Определения

При использовании в данном описании термин “молекулярная масса” полисахарида или конъюгата белок-носитель - полисахарид относится к молекулярной массе, рассчитанной посредством гель-фильтрационной хроматографии (SEC) в сочетании с многоугловым детектором рассеяния лазерного света (MALLS).

При использовании в данном описании термин “свободный полисахарид” означает капсульный полисахарид серотипа 15B, который ковалентно не конъюгирован с белком-носителем, но тем не менее присутствует в композиции конъюгата капсульный полисахарид серотипа 15B-белок-носитель. Свободный полисахарид может быть нековалентно ассоциирован с (то есть нековалентно связан с, адсорбирован или заключен в или с) конъюгатом полисахарид - белок-носитель.

Процент свободного полисахарида измеряют после конечной очистки конъюгата капсульный полисахарид серотипа 15B-белок-носитель. Предпочтительно его измеряют в пределах 4 недель после конечной очистки. Его выражают как процент от общего полисахарида в образце.

При использовании в данном описании термин “полисахарид серотипа 15B” или “капсульный полисахарид серотипа 15B” относится к капсульному полисахариду *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B.

При использовании в данном описании термин “гликоконъюгат серотипа 15B” или “конъюгат серотипа 15B” относится к выделенному полисахариду серотипа 15B, ковалентно конъюгированному с белком-носителем.

При использовании в данном описании термин “степень окисления” (DO) относится к числу повторяющихся единиц сахара на альдегидную группу, образованную при активации выделенного полисахарида окислителем. Степень окисления полисахарида можно определить, используя обычные методы, известные специалистам в данной области техники.

При использовании в данном описании, термин "субъект" относится к млекопитающему, в том числе к человеку, или к птице, рыбе, рептилии, амфибии или любому другому животному. Термин "субъект" также включает домашних животных или животных для исследования. Неограничивающие примеры домашних животных или животных для исследования включают: собак, кошек, свиней, кроликов, крыс, мышей, песчанок, хомяков, морских свинок, хорьков, обезьян, птиц, змей, ящериц, рыб, черепах и лягушек. Термин "субъект" дополнительно включает сельскохозяйственных животных. Неограничивающие примеры сельскохозяйственных животных включают: альпака, бизонов, верблюдов, крупный рогатый скот, оленей, свиней, лошадей, лам, мулов, ослов, овец, коз, кроликов, северных оленей, яков, кур, гусей и индюков.

Выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В

Как показано на Фиг. 1, повторяющаяся единица полисахарида серотипа 15В состоит из разветвленного трисахаридного остова (один N-ацетилглюкозамин (Glc_PNAc), одна галактопираноза (Gal_P) и одна глюкопираноза (Glc_P)) с дисахаридной ветвью $\alpha\text{Gal}_P\beta\text{Gal}_P$ связанной с C4- гидроксильной группой Glc_PNAc . Фосфоглицерин связан с C3- гидроксильной группой остатка βGal_P в дисахаридной ветви. Капсульный полисахарид серотипа 15В О-ацетилирован и общая величина О-ацетилирования составляет примерно 0,8-0,9 О-ацетильных групп на повторяющуюся единицу полисахарида (см., например, C. Jones et Al, *Carbohydrate Research*, 340 (2005) 403-409). Капсульный полисахарид серотипа 15С имеет структуру основы, идентичную серотипу 15В, но не имеет О-ацетилирования.

Выделенный полисахарид серотипа 15В по изобретению может быть получен посредством способа, включающего следующие стадии:

(а) получение ферментационной культуры бактериальных клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В;

(б) лизис бактериальных клеток в указанной ферментационной культуре;

(в) очистка полисахарида серотипа 15В из ферментационной культуры; и

(г) доведение до нужного размера очищенного полисахарида серотипа 15В

посредством гомогенизации под высоким давлением.

Полисахариды серотипа 15В можно получить непосредственно из бактерий, используя способы выделения, известные специалистам в данной области техники (см., например, способы, раскрытые в публикациях патентных заявок US 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340 и 20080102498 или WO 2008118752). Кроме того, они могут быть получены с использованием протоколов синтеза.

Штаммы *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В можно получить из установленных коллекций культур (такие как, например, депонированный в ATCC штамм No ATCC10354 или штамм, имеющийся в Streptococcal Reference Laboratory of the Center for disease control and prevention (Стрептококковая справочная лаборатория Центра контроля и предупреждения заболеваний), Atlanta, GA)) или клинических образцов.

Бактериальные клетки предпочтительно выращивают в соевой среде. После ферментации бактериальных клеток, которые производят капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, эти бактериальные клетки лизируют с получением клеточного лизата. Бактериальные клетки можно лизировать с помощью любого лизирующего агента. "Лизирующий агент" представляет собой любой агент, который помогает разрушению клеточной оболочки и высвобождению аутолизина, который вызывает клеточный лизис, включающий, например, детергенты. При использовании в данном описании термин "детергент" относится к анионному или катионному

детергенту, способному индуцировать лизис бактериальных клеток. Типичные примеры таких детергентов для применения в способах по настоящему изобретению включают дезоксихолат натрия (DOC), N-лауроилсаркозин, натриевую соль хенодезоксихолевой кислоты и сапонины.

5 В одном воплощении настоящего изобретения лизирующий агент, используемый для лизиса бактериальных клеток, представляет собой DOC. DOC представляет собой натриевую соль желчной дезоксихолевой кислоты, которую обычно получают из биологических источников, таких как коровы или волы. DOC активирует белок LytA, который представляет собой аутолизин, вовлеченный в рост клеточной стенки и деление
10 в *Streptococcus pneumoniae*. Белок LytA имеет холинсвязывающие домены в своей C-концевой части и мутации гена *lytA*, как известно, продуцируют мутантов LytA, которые устойчивы к лизису, вызванному DOC.

В одном воплощении настоящего изобретения лизирующий агент, используемый для лизиса бактериальных клеток, представляет собой лизирующий агент неживотного
15 происхождения. Лизирующие агенты неживотного происхождения для применения в способах по настоящему изобретению включают агенты из неживотных источников с механизмом действия, аналогичным DOC (то есть, которые влияют на функцию LytA и приводят к лизису клеток *Streptococcus pneumoniae*). Такие лизирующие агенты неживотного происхождения включают, без ограничения ими, аналоги DOC,
20 поверхностно-активные вещества, детергенты и структурные аналоги холина. В одном воплощении лизирующий агент неживотного происхождения выбран из группы, состоящей из декансульфоновой кислоты, *трет*-октилфенокси-поли(оксиэтилен)этанола (например Igepal® CA-630, CAS#: 9002-93-1, имеющиеся у Sigma Aldrich, St. Louis, MO), конденсатов октилфенол этиленоксида (например Triton® X-100, имеющийся у Sigma
25 Aldrich, St. Louis, MO), N-лауроилсаркозина натрия, лаурил-иминодипропионата, додецилсульфата натрия, хенодезоксихолата, гиодезоксихолата, гликодезоксихолата, тауродезоксихолата, таурохенодезоксихолата и холата. В другом воплощении лизирующий агент неживотного происхождения представляет собой N-лауроилсаркозин. В другом воплощении лизирующий агент представляет собой N-лауроилсаркозин
30 натрия.

Полисахарид серотипа 15B может быть затем выделен из клеточного лизата с использованием методов очистки, известных в данной области техники, в том числе с использованием центрифугирования, глубинной фильтрации, осаждения, ультрафильтрации, обработки активированным углем, диафильтрации и/или
35 хроматографии на колонке (см., например, публикации патентных заявок США 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340 и 20080102498 или WO 2008118752). Очищенный капсульный полисахарид серотипа 15B может затем быть использован для получения иммуногенных конъюгатов.

Предпочтительно, для того чтобы получить конъюгаты с подходящими
40 характеристиками фильтруемости и/или выходов, перед конъюгацией с белком-носителем выполняют доведение полисахаридов до диапазона более низкой молекулярной массы (MW). Предпочтительно, размер очищенного полисахарида серотипа 15B уменьшают при сохранении критических характеристик структуры полисахарида, таких как, например, присутствие О-ацетильных групп. Предпочтительно, размер очищенного
45 полисахарида серотипа 15B уменьшают посредством механической гомогенизации.

В предпочтительном воплощении размер очищенного полисахарида серотипа 15B уменьшают посредством гомогенизации под высоким давлением. При гомогенизации под высоким давлением достигаются высокие скорости сдвига посредством подачи

технологического потока через проточный канал с достаточно малыми размерами. Скорость сдвига увеличивается посредством использования большего приложенного давления гомогенизации, и время экспозиции может быть увеличено путем рециркуляции потока вещества через гомогенизатор.

5 Способ гомогенизации под высоким давлением для уменьшения размера очищенного полисахарида серотипа 15В при сохранении структурных характеристик полисахарида, таких как присутствие О-ацетильных групп.

10 Выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В, полученный посредством очистки полисахарида серотипа 15В из лизата *Streptococcus pneumonia* и возможно доведения до нужного размера очищенного полисахарида, может быть охарактеризован разными параметрами, включая, например, молекулярную массу, мМ глицерина на мМ указанного полисахарида серотипа 15В, или мМ ацетата на мМ указанного полисахарида серотипа 15В.

15 Степень О-ацетилирования полисахарида может быть определена любым способом, известным в данной области техники, например посредством протонного ЯМР (Lemercinier and Jones (1996) Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones and Lemercinier (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247, WO 05/033148 или WO 00/56357). Другой обычно используемый метод описан в Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261. Предпочтительно, присутствие О-ацетильных групп определяют посредством анализа 20 методом ионной HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Присутствие О-ацетила в очищенном, выделенном или активированном капсульном полисахариде серотипа 15В или в конъюгате полисахарид серотипа 15В-белок-носитель выражают в виде количества мМ ацетата на мМ указанного полисахарида или как число О-ацетильных групп на повторяющуюся единицу полисахарида.

25 Присутствие глицеринфосфатных боковых цепей можно определить путем измерения глицерина с использованием высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (HРАЕС-РАD) после его высвобождения при обработке полисахарида фтористоводородной кислотой (HF). Присутствие глицерина в очищенном, выделенном или активированном полисахариде 30 серотипа 15В или в конъюгате полисахарид серотипа 15В-белок-носитель выражают в виде количества мМ глицерина на мМ полисахарида серотипа 15В.

Выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В также может быть получен синтетически с использованием способов, известных специалистам в данной области техники.

35 В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В имеет молекулярную массу от 5 до 500 кДа, от 50 до 500 кДа, от 50 до 450 кДа, от 100 до 400 кДа, от 100 до 350 кДа. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В имеет молекулярную массу от 100 до 350 кДа. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В 40 имеет молекулярную массу от 100 до 300 кДа. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В имеет молекулярную массу от 150 до 300 кДа.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8 мМ ацетата на мМ 45 указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,5, 0,6 или 0,7 мМ ацетата на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В

содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,7 мМ ацетата на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении присутствие О-ацетильных групп определяют посредством анализа методом ионной HPLC.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,5, 0,6 или 0,7 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,6 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,7 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В имеет молекулярную массу от 100 до 350 кДа, предпочтительно 150 до 350 кДа и содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В имеет молекулярную массу от 100 до 350 кДа, предпочтительно от 150 до 350 кДа и содержит по меньшей мере 0,6 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В и по меньшей мере 0,6 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В имеет молекулярную массу от 100 до 350 кДа, предпочтительно от 150 до 350 кДа и содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В и по меньшей мере 0,6 мМ глицерина на мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В.

Конъюгат капсульный полисахарид серотипа 15В-белок-носитель

Выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В может быть конъюгирован с белком-носителем с получением иммуногенного конъюгата. Выделенный полисахарид может быть конъюгирован с белком-носителем способами, известными специалистам (см., например, публикации патентных заявок US 20060228380, 20070184071, 20070184072, 20070231340 или WO 2011/100151).

В одном воплощении полисахарид может быть активирован с помощью 1-циано-4-диметиламинопиридин тетрафторбората (CDAP) с образованием цианатного эфира. Активированный полисахарид может быть соединен непосредственно или через спейсерную (линкерную) группу с аминогруппой на белке-носителе. Например, спейсер может представлять собой цистамин или цистеамин для получения тиолированного полисахарида, который может быть соединен с носителем посредством тиоэфирной связи, полученной после взаимодействия с малеимид-активированным белком-носителем (например, используя GMBS (N-(γ-малеимидобутирилокси)сукцинимидный эфир)) или галогеноацетилованным белком-носителем (например, с использованием йодацетамида или N-сукцинимидил-бромацетата или SIAB (N-сукцинимидил-(4-иодацетат)

аминобензоат), или (N-сукцинимидил-иодацетат), или SBAP (N-сукцинимидил-3-(бромацетатамидо)пропионат)). Предпочтительно, цианатный эфир (возможно полученный посредством CDAP-химии), соединяют с гександиамином или дигидразидом адипиновой кислотой (ADH) и amino-derivatизированный сахарид конъюгируют с белком-носителем с использованием карбодиимидной (например EDAC или EDC) химии через карбоксильную группу на белке-носителе. Такие конъюгаты описаны, например, в WO 93/15760, WO 95/08348 и WO 96129094.

В других подходящих методиках используются карбодиимиды, гидразиды, активные сложные эфиры, норборнан, *пара*-нитробензойная кислота, N-гидроксисукцинимид (NHS), S-NHS (сульфо-NHS), EDC, TSTU (O-(N-сукцинимидил)-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат). Многие методики описаны в публикации патентной заявки WO 98/42721. В конъюгирование может быть вовлечен карбонильный линкер, который может быть образован путем взаимодействия свободной гидроксильной группы сахара с CDI (1,1'-карбонилдиимидазол) (Bethell et al. J. Biol. Chem. 1979, 254: 2572-4; Hearn et al. J. Chromatogr. 1981, 218: 509-18) и последующего взаимодействия с белком с образованием карбаматной связи. Этот способ может включать восстановление аномерного конца до первичной гидроксильной группы, возможное введение защиты/удаление защиты первичной гидроксильной группы, взаимодействие первичной гидроксильной группы с CDI с образованием CDI-карбаматного промежуточного соединения и сочетание CDI-карбаматного промежуточного соединения с аминогруппой на белке.

В предпочтительном воплощении выделенный капсульный полисахарид серотипа 15B конъюгирован с белком-носителем посредством восстановительного аминирования. Восстановительное аминирование включает активацию полисахарида посредством окисления и конъюгирование активированного полисахарида с белком-носителем посредством восстановления.

Активация капсульного полисахарида серотипа 15B

Активированный капсульный полисахарид серотипа 15B получают посредством взаимодействия выделенного капсульного полисахарида серотипа 15B с окислителем. Например, указанный активированный капсульный полисахарид серотипа 15B можно получить посредством способа, включающего следующие стадии:

(а) получение ферментационной культуры бактериальных клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B;

(б) лизис бактериальных клеток в указанной ферментационной культуре;

(в) очистка полисахарида серотипа 15B из ферментационной культуры;

(г) доведение очищенного полисахарида серотипа 15B до нужного размера посредством гомогенизации под высоким давлением.

(д) взаимодействие доведенного до нужного размера полисахарида серотипа 15B с окислителем.

В предпочтительном воплощении концентрация выделенного капсульного полисахарида серотипа 15B, который взаимодействует с окислителем, составляет от 0,1 до 10 мг/мл, от 0,5 до 5 мг/мл, от 1 до 3 мг/мл или примерно 2 мг/мл.

В предпочтительном воплощении окислитель представляет собой периодат. Периодат окисляет вицинальные гидроксильные группы с образованием карбонильных или альдегидных групп и вызывает расщепление связи C-C. Термин “периодат” включает как периодат, так и периодную кислоту. Этот термин также включает и метапериодат (IO_4^-), и ортопериодат (IO_6^{5-}). Термин “периодат” также включает различные периодатные соли, в том числе периодат натрия и периодат калия. В предпочтительном воплощении окислитель представляет собой периодат натрия. В предпочтительном

воплощении периодат, используемый для окисления капсульного полисахарида серотипа 15В, представляет собой метапериодат. В предпочтительном воплощении периодат, используемый для окисления капсульного полисахарида серотипа 15В, представляет собой метапериодат натрия.

- 5 В предпочтительном воплощении полисахарид взаимодействует с 0,01-10, 0,05-5, 0,1-1, 0,5-1, 0,7-0,8, 0,05-0,5, 0,1-0,3 молярного эквивалента окислителя. В предпочтительном воплощении полисахарид взаимодействует с примерно 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 молярного эквивалента окислителя. В предпочтительном воплощении полисахарид взаимодействует с примерно 0,15
- 10 молярного эквивалента окислителя. В предпочтительном воплощении полисахарид взаимодействует с примерно 0,25 молярного эквивалента окислителя. В предпочтительном воплощении полисахарид взаимодействует с примерно 0,5 молярного эквивалента окислителя. В предпочтительном воплощении полисахарид взаимодействует с примерно 0,6 молярного эквивалента окислителя. В предпочтительном воплощении
- 15 полисахарид взаимодействует с примерно 0,7 молярного эквивалента окислителя.

В предпочтительном воплощении продолжительность реакции составляет от 1 до 50, от 10 до 30, от 15 до 20, от 15 до 17 часов или примерно 16 часов.

- В предпочтительном воплощении температуру реакции поддерживают от 15 до 45°C, от 15 до 30°C, от 20 до 25°C. В предпочтительном воплощении температуру реакции
- 20 поддерживают примерно при 23°C.

В предпочтительном воплощении реакцию окисления выполняют в буфере, выбранном из натрий-фосфатного буфера, калий-фосфатного буфера, 2-(N-морфолино) этансульфоновой кислоты (MES) или Bis-Tris. В предпочтительном воплощении буфер представляет собой калий-фосфатный буфер.

- 25 В предпочтительном воплощении буфер имеет концентрацию от 1 до 500 мМ, от 1 до 300 мМ, от 50 до 200 мМ. В предпочтительном воплощении буфер имеет концентрацию примерно 100 мМ.

- В предпочтительном воплощении реакцию окисления выполняют при рН от 4 до 8, от 5 до 7, от 5,5 до 6,5. В предпочтительном воплощении значение рН составляет
- 30 примерно 6.

В предпочтительном воплощении активированный капсульный полисахарид серотипа 15В получен посредством взаимодействия от 0,5 до 5 мг/мл выделенного капсульного полисахарида серотипа 15В с 0,2-0,3 молярного эквивалента периодата при температуре от 20 до 25°C.

- 35 В предпочтительном воплощении активированный капсульный полисахарид серотипа 15В очищают. Активированный капсульный полисахарид серотипа 15В очищают способами, известными специалистам в данной области техники, такими как гель-проникающая хроматография (GPC), диализ или ультрафильтрация/диафильтрация. Например, активированный капсульный полисахарид очищают путем концентрирования
- 40 и диафильтрации с использованием устройства для ультрафильтрации.

В предпочтительном воплощении изобретение относится к активированному капсульному полисахариду серотипа 15В, полученному или получаемому посредством вышеописанного способа.

- В предпочтительном воплощении степень окисления активированного капсульного полисахарида серотипа 15В составляет от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10, от 2 до 5, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 10 до 20, от 10 до 15, от 15 до 20. В предпочтительном воплощении степень окисления активированного капсульного полисахарида серотипа 15В составляет от 2 до 10, от 4 до 8, от 4 до 6, от 6 до 8, от 6 до 12, от 8 до 12, от 9 до

лиофилизуют, возможно в присутствии криопротектора/лиопротектора. В одном воплощении указанный криопротектор/лиопротектор представляет собой сахарид. В предпочтительном воплощении сахарид выбран из сахарозы, трегалозы, рафинозы, стахиозы, мелезитозы, декстрана, маннита, лактита и палатинита. В предпочтительном воплощении сахарид представляет собой сахарозу. Лيوфилизированный активированный капсульный полисахарид может затем быть смешан с раствором, содержащим белок-носитель.

В другом воплощении активированный капсульный полисахарид серотипа 15B смешивают с белком-носителем и лيوфилизуют, возможно в присутствии криопротектора/лиопротектора. В одном воплощении указанный криопротектор/лиопротектор представляет собой сахарид. В предпочтительном воплощении сахарид выбран из сахарозы, трегалозы, рафинозы, стахиозы, мелезитозы, декстрана, маннита, лактита и палатинита. В предпочтительном воплощении сахарид представляет собой сахарозу. Совместно лيوфилизированные полисахарид и белок-носитель затем могут быть ресуспендированы в растворе и взаимодействовать с восстанавливающим агентом.

В одном воплощении изобретение относится к лيوфилизированному активированному капсульному полисахариду серотипа 15B.

В одном воплощении изобретение относится к совместно лيوфилизированному активированному капсульному полисахариду серотипа 15B и белку-носителю. В предпочтительном воплощении белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

Конъюгирование активированного капсульного полисахарида серотипа 15B с белком-носителем

Активированный капсульный полисахарид серотипа 15B может быть конъюгирован с белком-носителем способом, включающим следующие стадии:

(а) смешивание активированного капсульного полисахарида серотипа 15B с белком-носителем, и

(б) взаимодействие смеси активированного капсульного полисахарида серотипа 15B и белка-носителя с восстанавливающим агентом с образованием конъюгата капсульный полисахарид серотипа 15B-белок-носитель.

Конъюгирование активированного капсульного полисахарида серотипа 15B с белком-носителем посредством восстановительного аминирования в диметилсульфоксиде (DMSO) пригодно для сохранения содержания О-ацетила полисахарида по сравнению, например, с восстановительным аминированием в водной фазе, где уровень О-ацетилирования полисахарида значительно снижается. В предпочтительном воплощении стадию (а) и стадию (б) выполняют в DMSO.

В предпочтительном воплощении стадия (а) включает растворение лيوфилизированного капсульного полисахарида серотипа 15B в растворе, содержащем белок-носитель и DMSO. В предпочтительном воплощении стадия (а) включает растворение совместно лيوфилизированного капсульного полисахарида серотипа 15B и белка-носителя в DMSO.

Когда стадии (а) и (б) выполняют в водном растворе, стадии (а) и (б) выполняют в буфере, предпочтительно выбранном из PBS (фосфатно-солевого буфера), MES (2-морфолиноэтансульфоновая кислота), HEPES (2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]-этансульфоновая кислота), Bis-tris, ADA (N-(2-ацетамидо)иминодиуксусная кислота), PIPES (1,4-пиперазиндиэтансульфоновая кислота), MOPSO (3-морфолино-2-гидроксипропансульфоновая кислота), BES (N,N-бис(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота), MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота), DIPSO (3-(N,N-бис[2-гидроксиэтил]амино)-2-гидроксипропансульфоновая кислота),

MOBS (4-(N-морфолино)бутансульфоновая кислота), HEPPSO (4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (пиперазин-N,N'-бис(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), TEA (триэтиламин), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновая кислота), Бицин или НЕРВ (N-(2-гидроксиэтил) пиперазин-N'-(4-бутансульфоновая кислота)), при pH от 6,0 до 8,5, от 7 до 8, или от 7 до 7,5. В предпочтительном воплощении буфер представляет собой PBS. В предпочтительном воплощении значение pH составляет примерно 7,3.

В предпочтительном воплощении концентрация активированного капсульного полисахарида серотипа 15В на стадии (б) составляет от 0,1 до 10 мг/мл, от 0,5 до 5 мг/мл, от 0,5 до 2 мг/мл. В предпочтительном воплощении концентрация активированного капсульного полисахарида серотипа 15В на стадии (б) составляет примерно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3 мг/мл.

В предпочтительном воплощении исходное соотношение на входе (масса/масса) активированного капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю составляет от 5:1 до 0,1:1, от 2:1 до 0,1:1, от 2:1 до 1:1, от 1,5:1 до 1:1, от 0,1:1 до 1:1, от 0,3:1 до 1:1, от 0,6:1 до 1:1.

В предпочтительном воплощении исходное соотношение на входе активированного капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю составляет примерно от 0,6:1 до 1,5:1, предпочтительно от 0,6:1 до 1:1. Такое исходное соотношение на входе является особенно подходящим для получения низкого уровня свободного полисахарида в иммуногенном конъюгате.

В предпочтительном воплощении исходное соотношение активированного капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю на входе составляет примерно 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1, 0,9:1, 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 или 2:1.

В одном воплощении восстанавливающий агент представляет собой цианоборгидрид натрия, триацетоксиборгидрид натрия, боргидрид натрия или цинка в присутствии кислоты Брэнстеда или Льюиса, аминокислоты, такие как пиридинборан, 2-пиколинборан, 2,6-диборан-метанол, диметиламин-боран, *трет*-BuMeⁱPrN-BH₃, бензиламин-BH₃ или 5-этил-2-метилпиридинборан (РЕМВ). В предпочтительном воплощении восстанавливающий агент представляет собой цианоборгидрид натрия. В предпочтительном воплощении восстанавливающий агент представляет собой 2-пиколин-боран натрия.

В предпочтительном воплощении количество восстанавливающего агента, используемого на стадии (б), составляет примерно от 0,1 до 10 молярных эквивалентов, от 0,5 до 5 молярных эквивалентов, от 1 до 2 молярных эквивалентов. В предпочтительном воплощении количество восстанавливающего агента, используемого на стадии (б), составляет примерно 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 молярных эквивалента.

В предпочтительном воплощении продолжительность стадии (б) составляет от 1 до 60 часов, от 10 до 50 часов, от 40 до 50 часов; от 42 до 46 часов. В предпочтительном воплощении продолжительность стадии (б) составляет примерно 44 часов.

В предпочтительном воплощении температуру реакции на стадии (б) поддерживают от 10 до 40°C, от 15 до 30°C или от 20 до 26°C. В предпочтительном воплощении температуру реакции на стадии (б) поддерживают примерно при 23°C.

В предпочтительном воплощении способ получения иммуногенного конъюгата,

содержащего капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем, дополнительно включает стадию (стадия (в)) блокирования непрореагировавшего альдегида (гашение) путем добавления NaBH_4 .

В предпочтительном воплощении количество NaBH_4 , используемое на стадии (в), составляет от 0,1 до 10 молярных эквивалентов, от 0,5 до 5 молярных эквивалентов, от 1 до 3 молярных эквивалентов. В предпочтительном воплощении количество NaBH_4 , используемое стадии (в), составляет примерно 2 молярных эквивалента.

В предпочтительном воплощении продолжительность стадии (в) составляет от 0,1 до 10 часов, от 0,5 до 5 часов, от 2 до 4 часов. В предпочтительном воплощении продолжительность стадии (в) составляет примерно 3 часа.

В предпочтительном воплощении на стадии (в) поддерживают температуру реакции от 15 до 45°C, от 15 до 30°C или от 20 до 26°C. В предпочтительном воплощении поддерживают температуру реакции на стадии (в) примерно при 23°C.

В предпочтительном воплощении выход на стадии конъюгирования (стадия б) составляет более 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%. В предпочтительном воплощении выход на стадии конъюгирования (стадия б) составляет более 60%. В предпочтительном воплощении выход на стадии конъюгирования (стадия б) составляет более 70%. Выход представляет собой количество полисахарида серотипа 15В в конъюгате $\times 10$ /количество активированного полисахарида, используемое на стадии конъюгирования.

В предпочтительном воплощении способ получения иммуногенного конъюгата, содержащего капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем, включает следующие стадии:

(а) получение ферментационной культуры бактериальных клеток *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В;

(б) лизис бактериальных клеток в указанной ферментационной культуре;

(в) очистка полисахарида серотипа 15В из ферментационной культуры;

(г) доведение очищенного полисахарида серотипа 15В до нужного размера посредством гомогенизации под высоким давлением;

(д) взаимодействие доведенного до нужного размера полисахарида серотипа 15В с окислителем;

(е) смешивание активированного полисахарида серотипа 15В с белком-носителем, и

(ж) взаимодействие смеси активированного полисахарида серотипа 15В и белка-носителя с восстанавливающим агентом с образованием конъюгата полисахарида серотипа 15В-белок-носитель; и

(з) блокирование непрореагировавшего альдегида (гашение) посредством добавления NaBH_4 .

В предпочтительном воплощении выход на стадии конъюгирования (стадия ж) вышеуказанного способа составляет более 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%. В предпочтительном воплощении выход стадии конъюгирования (стадия ж) составляет более 60%. В предпочтительном воплощении выход стадии конъюгирования (стадия ж) составляет более 70%. Выход представляет собой количество полисахарида серотипа 15В в конъюгате $\times 100$ /количество активированного полисахарида, используемого на стадии конъюгирования.

После конъюгирования капсульного полисахарида серотипа 15В с белком-носителем, этот конъюгат полисахарида-белок может быть очищен (обогащен в отношении

количества конъюгата полисахарид-белок) посредством различных методов, известных специалистам. Эти методы включают диализ, процедуры концентрирования/диафильтрации, фильтрацию с тангенциальным потоком, осаждение/элюирование, колоночную хроматографию (DEAE ((диэтиламиноэтил)-декстран) или гидрофобная хроматография) и глубинную фильтрацию.

В предпочтительном воплощении белок-носитель является нетоксичным и нереагеногенным и может быть получен в достаточном количестве и с достаточной чистотой. Белки-носители должны поддаваться стандартным процедурам конъюгирования.

В предпочтительном воплощении активированный капсульный полисахарид серотипа 15В конъюгирован с белком-носителем, который выбран из группы, состоящей из: DT (дифтерийный анатоксин), TT (столбнячный анатоксин) или фрагмента С из TT, CRM197 (нетоксичный, но антигенно идентичный вариант дифтерийного токсина) другие точечные мутанты DT, такие как CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM102, CRM 103 и CRM107 и другие мутации, описанные Nicholls and Youle в Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делеция или мутация Glu-148 на Asp, Gln или Ser, и/или Ala 158 на Gly, и другие мутации, описанные в US 4709017 или US 4950740; мутация по меньшей мере одного или более остатков Lys 516, Lys 526, Phe 530 и/или Lys 534, и другие мутации, описанные в US 5917017 или US 6455673; или фрагмент, описанный в US 5843711, пневмококковый пневмолизин (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), включая детоксифицированный в некоторой степени ply (пневмолизин), например dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) или dPLY-формол, PhtX, включая PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (последовательности PhtA, PhtB, PhtD или PhtE описаны в WO 00/37105 или WO 00/39299) и слияния белков Pht, например слияния PhtDE, слияния PhtBE, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/54007, WO2009/000826), OMPC (менингококковый белок наружной мембраны - обычно извлекается из N.meningitidis серогруппы B - EP0372501), PorB (из N. meningitidis), PD (белок D Haemophilus influenza - см., например, EP 0594610 B) или их иммунологически функциональные эквиваленты, синтетические пептиды (EP0378881, EP0427347), белки теплового шока (WO 93/17712, WO 94/03208), белки коклюша (WO 98/58668, EP 0471177), цитокины, лимфокины, факторы роста и гормоны (WO10 91/01146), искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4+ Т-клеток человека из различных антигенов, полученных из патогенов (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), такие как белок N19 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7) пневмококковый поверхностный белок PspA (WO 02/091998), белки захвата железа (WO 01/72337), токсин А или В C. difficile (WO 00/61761). В одном воплощении активированный полисахарид серотипа 15В конъюгирован с DT (дифтерийный анатоксин). В другом воплощении активированный полисахарид серотипа 15В конъюгирован с фрагментом С из TT. В другом воплощении активированный полисахарид серотипа 15В конъюгирован с PD (белок D Haemophilus influenza - см., например, EP 0594610 B).

В предпочтительном воплощении активированный капсульный полисахарид серотипа 15В по изобретению конъюгирован с белком CRM₁₉₇. Белок CRM₁₉₇ представляет собой нетоксичную форму дифтерийного токсина, но иммунологически неотличим от дифтерийного токсина. CRM₁₉₇ производится C.diphtheria, инфицированной нетоксигенным фагом $\beta 197^{tox-}$, созданным посредством нитрозогуанидинового мутагенеза токсигенного коринофага-бета (Uchida, T. et al. 1971, Nature New Biology 233:8-11). CRM₁₉₇ очищали посредством ультрафильтрации, осаждения сульфатом

аммония и ионообменной хроматографии. Белок CRM₁₉₇ имеет такую же молекулярную массу как дифтерийный токсин, но отличается от него изменением одного основания (гуанин на аденин) в структурном гене. Это единственное изменение основания вызывает замену аминокислоты глутаминовая кислота на глицин в зрелом белке и устраняет токсические свойства дифтерийного токсина. Белок CRM₁₉₇ является безопасным и эффективным Т-клеточно-зависимым носителем сахаридов. Более подробную информацию о CRM₁₉₇ и его получении можно найти, например, в US 5614382.

В одном воплощении изобретение относится к иммуногенному конъюгату, содержащему капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем. В одном воплощении изобретение относится к иммуногенному конъюгату, содержащему капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем посредством восстановительного аминирования. В одном воплощении изобретение относится к иммуногенному конъюгату, содержащему капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем посредством восстановительного аминирования в DMSO. В предпочтительном воплощении белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇. В предпочтительном воплощении полисахарид представляет собой выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В, как определено в настоящем описании. В предпочтительном воплощении полисахарид представляет собой выделенный капсульный полисахарид серотипа 15В, как определено в настоящем описании, который был доведен до нужного размера посредством гомогенизации под высоким давлением.

В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит менее чем примерно 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 или 15% свободного капсульного полисахарида серотипа 15В по сравнению с общим количеством капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит менее чем примерно 25% свободного капсульного полисахарида серотипа 15В по сравнению с общим количеством капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит менее чем примерно 20% свободного капсульного полисахарида серотипа 15В по сравнению с общим количеством капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит менее чем примерно 15% свободного капсульного полисахарида серотипа 15В по сравнению с общим количеством капсульного полисахарида серотипа 15В.

В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат имеет молекулярную массу от 3000 до 20000 кДа; от 5000 до 10000 кДа; от 5000 до 20000 кДа; от 8000 до 20000 кДа; от 8000 до 16000 кДа; или от 10000 до 16000 кДа. Молекулярную массу иммуногенного конъюгата измеряют посредством SEC-MALLS.

В предпочтительном воплощении отношение (масса/масса) капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,5 до 3. В предпочтительном воплощении отношение капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,4 до 2, от 0,5 до 2, от 0,5 до 1,5, от 0,5 до 1, от 1 до 1,5, от 1 до 2. В предпочтительном воплощении соотношение капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,7 до 0,9.

Среду гель-фильтрационной хроматографии (CL-4В) можно использовать для определения относительного распределения размера молекул конъюгата. Для гель-фильтрационной хроматографии (SEC) используют колонки с подачей самотеком для

построения профиля распределения размера молекул конъюгатов. Большие молекулы, вытесненные из пор в среду, элюируются быстрее, чем небольшие молекулы.

Коллекторы фракций используют для сбора элюата с колонки. Фракции тестируют колориметрически посредством анализа сахаридов. Для определения K_d , колонки калибруют, чтобы установить фракцию, в которой молекулы полностью вытеснены (V_0), ($K_d=0$) и фракцию, представляющую максимальное удерживание (V_i), ($K_d=1$).

Фракция, в которой достигается определенное свойство образца (V_e), соотносят с K_d посредством выражения $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$.

В предпочтительном воплощении по меньшей мере 20% иммуногенного конъюгата имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 30% иммуногенного конъюгата имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 40% иммуногенного конъюгата имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% иммуногенного конъюгата имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 60% иммуногенного конъюгата имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении по меньшей мере 70% иммуногенного конъюгата имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B.

В предпочтительном воплощении от 40% до 90% иммуногенного конъюгата серотипа 15B имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении от 50% до 90% иммуногенного конъюгата серотипа 15B имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B. В предпочтительном воплощении от 65% до 80% иммуногенного конъюгата серотипа 15B имеет значение K_d , ниже или равное 0,3 на колонке CL-4B.

В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,5, 0,6 или 0,7 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,7 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B. В предпочтительном воплощении присутствие О-ацетильных групп определяют посредством анализа методом ионной HPLC.

В предпочтительном воплощении соотношение мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B в иммуногенном конъюгате к мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B в выделенном полисахариде составляет по меньшей мере 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 или 0,95. В предпочтительном воплощении отношение мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B в иммуногенном конъюгате к мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B в выделенном полисахариде составляет по меньшей мере 0,7. В предпочтительном воплощении отношение мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B в иммуногенном конъюгате к мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B в выделенном полисахариде составляет по меньшей мере 0,9. В предпочтительном воплощении присутствие О-ацетильных групп определяют посредством анализа методом ионной HPLC.

В предпочтительном воплощении отношение мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В в иммуногенном конъюгате к мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В в активированном полисахариде составляет по меньшей мере 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9 или 0,95. В предпочтительном воплощении отношение мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В в иммуногенном конъюгате к мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В в активированном полисахариде составляет по меньшей мере 0,7. В предпочтительном воплощении отношение мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В в иммуногенном конъюгате к мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В в активированном полисахариде составляет по меньшей мере 0,9. В предпочтительном воплощении присутствие О-ацетильных групп определяют посредством анализа методом ионной HPLC.

В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8 мМ глицерина на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,5, 0,6 или 0,7 мМ глицерина на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В. В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,6 мМ глицерина на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В.

В предпочтительном воплощении иммуногенный конъюгат содержит по меньшей мере 0,7 мМ глицерина на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В.

Степень конъюгирования представляет собой количество остатков лизина в белке-носителе, которые конъюгированы с капсульным полисахаридом серотипа 15В. Доказательство модификации лизина в белке-носителе в результате ковалентных связей с полисахаридами получают посредством аминокислотного анализа с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области техники. Конъюгирование приводит к уменьшению количества восстановленных остатков лизина по сравнению с белком CRM₁₉₇ исходного вещества, используемого для получения конъюгированных веществ.

В предпочтительном воплощении степень конъюгирования иммуногенного конъюгата 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 предпочтительном воплощении степень конъюгирования иммуногенного конъюгата составляет от 2 до 5.

Иммуногенная композиция

Термин "иммуногенная композиция" относится к любой фармацевтической композиции, содержащий антиген, например микроорганизм или его компонент, где указанная композиция может быть использована, чтобы вызвать иммунный ответ у субъекта.

При использовании в данном описании "иммуногенный" означает способность антигена (или эпитопа антигена), такого как бактериальный капсульный полисахарид, или иммуногенный конъюгат, или иммуногенная композиция, содержащая антиген, вызывать иммунный ответ у хозяина, такого как млекопитающее, опосредованный либо гуморально, либо клеточно, либо обоими способами.

В одном воплощении изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей иммуногенный конъюгат капсульный полисахарид серотипа 15В- белок-носитель, раскрытый в данном описании изобретения.

В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных

связываться с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B. В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных связываться с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, как измерено с помощью стандартного анализа ELISA.

5 В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных связываться с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B и 15A и/или 15C. В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных связываться с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B и 15A и/или 15C, как измерено с помощью стандартного анализа ELISA.

В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных связываться с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B и 15C. В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных связываться с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B и 15C, как измерено с помощью стандартного анализа ELISA.

В методе ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ) антитела из сыворотки вакцинированных субъектов инкубируют с полисахаридами, которые адсорбированы на твёрдой подложке. Связанные антитела обнаруживают с помощью фермент-конъюгированных вторичных детекторных антител.

В одном воплощении указанный анализ ELISA представляет собой стандартизованный (ВОЗ) анализ ELISA, как определено ВОЗ в "Учебном пособии по иммуноферментному анализу для количественного определения IgG, специфических к серотипу *Streptococcus pneumoniae* (Pn PS ELISA)." (доступном на <http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf>; по состоянию на 31 марта, 2014).

В ELISA измеряют типоспецифические IgG антитела против капсульного полисахарида (PS) *S. pneumoniae*, присутствующие в человеческой сыворотке. Когда разведения человеческой сыворотки добавляют к микротитрационным планшетами, покрытым типоспецифическим капсульным PS, антитела, специфичные к этому капсульному PS, связываются с микротитрационными планшетами. Антитела, связанные с планшетами, выявляют, используя IgG антитело козы против человека, меченное щелочной фосфатазой, и затем с пара-нитрофенил-фосфатный субстрат. Оптическая плотность окрашенного конечного продукта пропорциональна количеству антитела против капсульного PS, присутствующему в сыворотке.

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению способна вызывать IgG антитела у человека, которые способны связываться с полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 15B в концентрации по меньшей мере 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 или 0,5 мкг/мл, как определено посредством анализа ELISA.

40 В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению способна вызывать IgG антитела у человека, которые способны связываться с полисахаридом *S. pneumoniae* серотипа 15C в концентрации по меньшей мере 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 или 0,5 мкг/мл, как определено посредством анализа ELISA.

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению способна вызывать IgG антитела у человека, которые способны связываться с полисахаридом *S. pneumoniae* серотипов 15B и 15C в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,35, 0,4 или 0,5 мкг/мл, как определено посредством анализа ELISA.

В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании

изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных уничтожить *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В в опсоно-фагоцитарном анализе (ОРА), как раскрыто в данном описании изобретения. В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при тестировании в анализе ОРА, как раскрыто в данном описании изобретения, имеет более высокий титр ОРА, чем титр ОРА, полученный с неконъюгированным нативным капсультным полисахаридом *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В.

В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных уничтожить *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С в опсоно-фагоцитарном анализе, как раскрыто в данном описании изобретения. В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при тестировании в анализе ОРА, как раскрыто в данном описании изобретения, имеет более высокий титр ОРА, чем титр ОРА, полученный с неконъюгированным нативным капсультным полисахаридом *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15С.

В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных уничтожить *Streptococcus pneumoniae* серотипов 15В и 15С и/или 15А в опсоно-фагоцитарном анализе, как раскрыто в данном описании изобретения.

В одном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, при введении субъекту индуцирует образование антител, способных уничтожить серотипы 15В и 15С.

Пневмококковый опсонофагоцитирующий анализ (ОРА), который определяет уничтожение клеток *S. pneumoniae* фагоцитарными эффекторными клетками в присутствии функционального антитела и комплемента, считается важным заменителем для оценки эффективности пневмококковой вакцины.

Опсонофагоцитирующий анализ (ОРА) может быть выполнен путем совместной инкубации смеси клеток *Streptococcus pneumoniae*, инаktivированной теплом тестируемой человеческой сыворотки, дифференцированных клеток HL-60 (фагоциты) и экзогенного источника комплемента (например комплемента крольчат). Опсонофагоцитарная реакция протекает во время инкубации и бактериальные клетки, которые покрыты антителом и комплементом погибают при опсонофагоцитозе. Колониеобразующие единицы (КОЕ) выживших бактерий, которые избегают опсонофагоцитоза, определяют путем посева на чашки аналитической смеси. Титр ОРА определяют, как кратность разбавления, которая приводит к 50%-ному уменьшению количества бактерий по сравнению с контрольными лунками без тестируемой сыворотки. Титр ОРА интерполируют из двух разведений, которые включают эту границу 50%-ного уничтожения.

Конечный титр 1:8 или выше считается положительным результатом в этом типе киллинг-анализа ОРА.

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению способна вызывать титр по меньшей мере 1:8 против *S. pneumoniae* серотипа 15В у по меньшей мере 50% субъектов, как определено посредством опсоно-фагоцитирующего киллинг-анализа (ОРА). В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению способна вызывать титр по меньшей мере 1:8 против *S. pneumoniae* серотипа 15В у по меньшей мере 60%; 70%, 80%, 90% или у по меньшей мере 93% субъектов, как определено посредством опсоно-фагоцитирующего киллинг-анализа (ОРА).

В одном воплощении иммуногенная композиция по изобретению способна вызывать

титр по меньшей мере 1:8 против *S. pneumoniae* серотипа 15С по меньшей мере у 50% субъектов, как определено посредством опсоно-фагоцитирующего киллинг-анализа (ОРА). В одном воплощении иммуногенная композиция способна вызывать титр по меньшей мере 1:8 против *S. pneumoniae* серотипа 15С у по меньшей мере 60%; 70%, 80%, 90% или у по меньшей мере 95% субъектов, как определено посредством опсоно-фагоцитирующего киллинг-анализа (ОРА).

Приготовление иммуногенной композиции по настоящему изобретению в виде препарата может быть выполнено с использованием известных в данной области методов. Например, иммуногенные конъюгаты по изобретению могут быть приготовлены с физиологически приемлемым носителем для получения композиции. Примеры таких наполнителей включают, без ограничения ими, воду, буферный раствор хлорида натрия, полиолы (например глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль) и растворы декстрозы.

В предпочтительном воплощении иммуногенная композиция может содержать по меньшей мере один дополнительный антиген. В предпочтительных воплощениях иммуногенная композиция может содержать по меньшей мере один дополнительный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*.

В предпочтительном воплощении иммуногенная композиция может содержать по меньшей мере один дополнительный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae*, конъюгированный с белком-носителем. В предпочтительном воплощении указанный белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇.

В некоторых воплощениях иммуногенная композиция содержит один или более адъювантов. Как определено в настоящем описании, "адъювант" представляет собой вещество, которое служит для усиления иммуногенности иммуногенной композиции по настоящему изобретению. Таким образом, адъюванты часто дают для повышения иммунного ответа и они хорошо известны специалистам в данной области техники. Подходящие адъюванты, повышающие эффективность композиции, включают, без ограничения ими:

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

(2) композиции эмульсии масло в воде (с другими специфическими иммуностимулирующими агентами, такими как мурамилпептиды (определенные ниже) или компоненты бактериальной клеточной стенки, или без них), такие как, например,

(а) MF59 (PCT публикация WO 90/14837), содержащий 5% сквалена, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span 85 (возможно содержащий различные количества МТР-РЕ (см. ниже, хотя не обязательно)), приготовленный в виде субмикронных частиц с использованием микрофлюидизатора, такого как микрофлюидизатор Модель 110У (Microfluidics, Newton, MA),

(б) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5% плуроник-блокированного полимера L121 и thr-MDP (см. ниже), либо микрофлюидизированный в субмикронную эмульсию, либо перемешанный с образованием эмульсии с частицами большего размера, и

(в) RibiTM адъювантная система (RAS), (Corixa, Hamilton, MT), содержащая 2% сквалена, 0,2% Tween 80 и один или более компонентов клеточной стенки бактерий из группы, состоящей из 3-О-дезацелированного монофосфориллипида А (MPLTM), описанный в патенте US 4912094 (Corixa), трегалозы димиколата (TDM) и остова клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL + CWS (DetoxTM);

(3) могут быть использованы адъюванты-сапонины, такие как Quil A или

STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (патент US 5057540), или частицы, образованные из них, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы);

(4) бактериальные липополисахариды, синтетические аналоги липида А, такие как аминоксил-глюкозамин-фосфатные соединения (AGP) или их производные или аналоги, которые имеются в Corixa, и которые описаны в патенте US 6113918; одно из таких AGP представляет собой 2-[(R)-3-тетрадеканоилоксотетрадеканоиламино]этил 2-Дезокси-4-офосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоилоксотетрадеканоил]-2-[(R)-3-тетрадеканоилоксотетрадеканоиламино]-b-D-глюкопиранозид, который также известен как 529 (ранее известный как RC529), который приготовлен в виде водной формы или в виде стабильной эмульсии, синтетические полинуклеотиды, такие как олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотив(ы) (патент US 6207646);

(5) 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), гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор некроза опухоли (TNF), костимуляторные молекулы 87-1 и 87-2, и т.д.;

(6) детоксифицированные мутанты бактериального АДФ-рибозилирующего токсина, такие как холерный токсин (СТ), либо дикого типа, либо в мутантной форме, например, где глутаминовая кислота в аминокислотном положении 29 заменена другой аминокислотой, предпочтительно гистидином, в соответствии с международной заявкой на патент, опубликованной как международная публикация WO 00/18434 (см. также WO 02/098368 и WO 02/098369), коклюшный токсин (РТ) или термолабильный токсин *E. coli* (LT), в частности LT-K63, LT-R72, СТ-S109, РТ-K9/G129 (см., например, WO 93/13302 и WO 92/19265); и

(7) другие вещества, которые действуют в качестве иммуностимулирующих агентов для повышения эффективности композиции.

Мурамил-пептиды включают, без ограничения ими, N-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thf-MDP), N-ацетил-L-нормурамил-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)-этиламин (MTP-PE) и т.д.

В одном воплощении настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, содержат CpG-олигонуклеотид в качестве адъюванта. CpG-олигонуклеотид, при использовании в данном описании, относится к иммуностимулирующему CpG-олигодезоксинуклеотиду (CpG-ODN) и соответственно, эти термины используются взаимозаменяемо, если не указано иное.

Иммуностимулирующие CpG-олигодезоксинуклеотиды содержат один или более иммуностимулирующих CpG-мотивов, которые являются неметилованными цитозин-гуанин динуклеотидами, возможно в окружении определенных предпочтительных оснований. Статус метилирования иммуностимулирующего CpG-мотива обычно относится к остатку цитозина в динуклеотиде. Иммуностимулирующий олигонуклеотид, содержащий по меньшей мере один неметилованный CpG-динуклеотид, представляет собой олигонуклеотид, который содержит 5'-неметилованный цитозин, связанный фосфатной связью с 3'-гуанином, и который активирует иммунную систему посредством связывания с Toll-подобным рецептором 9 (TLR-9). В другом воплощении иммуностимулирующий олигонуклеотид может содержать один или более метилированных CpG-динуклеотидов, которые активируют иммунную систему посредством TLR9, но не так сильно, как если бы CpG-мотив(ы) был/были неметилованы. Иммуностимулирующие CpG-олигонуклеотиды могут содержать один или более палиндромов, которые в свою очередь могут окружать CpG-динуклеотид.

СрG-олигонуклеотиды были описаны в ряде выданных патентов, опубликованных патентных заявок и других публикаций, включая патенты US 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116; и 6339068.

В одном воплощении настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, содержат любой СрG-олигонуклеотид, описанный на с. 3 (строка 22) - с. 12 (строка 36) в WO2010/125480.

Были идентифицированы разные классы иммуностимулирующих СрG-олигонуклеотидов. Они упоминаются как А, В, С и Р класс и описаны более подробно на с. 3 (строка 22) - с. 12 (строка 36) в WO2010/125480. Способы по изобретению охватывают использование таких разных классов иммуностимулирующих СрG-олигонуклеотидов.

В одном воплощении настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, содержат СрG-олигонуклеотид класса А. Предпочтительно, СрG-олигонуклеотид "класса А" по изобретению имеет следующую нуклеиновокислотную последовательность: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 1). Некоторые неограничивающие примеры олигонуклеотидов А-класса включают:

5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3' (SEQ ID NO: 2) ; где * относится к фосфоротиоатной связи и _ относится к фосфодиэфирной связи.

В одном воплощении настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, содержат СрG-олигонуклеотид класса В. В одном воплощении СрG-олигонуклеотид для применения в настоящем изобретении представляет собой СрG-олигонуклеотид класса В, представленный по меньшей мере формулой:

5' X₁X₂CGX₃X₄ 3', где X₁, X₂, X₃, и X₄ представляют собой нуклеотиды. В одном воплощении X₂ представляет собой аденин, гуанин или тимин. В другом воплощении, X₃ представляет собой цитозин, аденин или тимин.

Последовательности СрG-олигонуклеотидов класса В по изобретению являются такими, которые подробно описаны выше в патентах US 6194388, 6207646, 6214806, 6218371, 6239116 и 6339068. Типичные последовательности включают последовательности, описанные в этих последних заявках и патентах, но не ограничиваются ими.

В одном воплощении СрG-олигонуклеотид "класса В" по изобретению имеет следующую нуклеиновокислотную последовательность:

5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEQ ID NO: 3), или
 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (SEQ ID NO: 4), или
 5' TCGTCGTTTTGTCTGTTTTGTCTGTT 3' (SEQ ID NO: 5), или
 5' TCGTCGTTTCGTCTGTTTTGTCTGTT 3' (SEQ ID NO: 6), или
 5' TCGTCGTTTTGTCTGTTTTTTTCGA 3' (SEQ ID NO: 7).

В любой из этих последовательностей все связи могут быть фосфоротиоатными связями. В другом воплощении в любой из этих последовательностей одна или более связей может быть фосфодиэфирной, предпочтительно между "С" и "G" СрG-мотива, делая СрG-олигонуклеотид полугибким. В любой из этих последовательностей этил-уридин или галоген может заменить 5'-Т; примеры замен галогенами включают, без ограничения ими, замены бром-уридином или йод-уридином.

Некоторые неограничивающие примеры олигонуклеотидов В-класса включают:

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 8), или

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (SEQ ID NO: 9), или
5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 10),

или

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (SEQ ID NO: 11),

5 или

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (SEQ ID NO: 12),
где * относится к фосфоротиоатной связи.

В одном воплощении настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, содержат CpG-олигонуклеотид класса C. В одном
10 воплощении CpG-олигонуклеотиды "класса C" по изобретению имеют следующие нуклеиновокислотные последовательности:

5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 13), или

5' TCGTCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 14), или

5' TCGGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 15), или

15 5' TCGGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 16), или

5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 17), или

5' TCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 18), или

5' TCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 19), или

5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 20), или

20 5' TCGCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 21), или

5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 22), или

5' TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCCG 3' (SEQ ID NO: 23), или

5' TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG 3' (SEQ ID NO: 24), или

5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (SEQ ID NO: 25).

25 В любой из этих последовательностей все связи могут быть фосфоротиоатными связями. В другом воплощении в любой из этих последовательностей одна или более связей может быть фосфодиэфирной, предпочтительно между "C" и "G" CpG-мотива, делая CpG-олигонуклеотид полугибким.

Некоторые неограничивающие примеры олигонуклеотидов C-класса включают:

30 5' T*C_G*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 26), или

5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 27),

или

5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 28), или

5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 29), или

35 5' T*C_G*C_G*T*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 30), или

5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 31), или

5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 32), или

5' T*C_G*C_G*T*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 33), или

5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 34), или

40 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 35), или

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 36), или

5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 37),

или

5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*T 3' (SEQ ID NO: 38),

45 где * относится к фосфоротиоатной связи и _ относится к фосфодиэфирной связи.

В любой из этих последовательностей этил-уридин или галоген может заменить 5' T; примеры замен галогенами включают, без ограничения ими, замены бром-уридином или йод-уридином.

В одном воплощении настоящего изобретения иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, содержат CpG-олигонуклеотид класса Р. В одном воплощении CpG-олигонуклеотид для применения в настоящем изобретении представляет собой CpG-олигонуклеотид класса Р, содержащий домен активации 5'-TLR и по меньшей мере две палиндромные области, одну палиндромную область, являющуюся 5'-палиндромной областью длиной по меньшей мере 6 нуклеотидов и соединенную с 3'-палиндромной областью длиной по меньшей мере 8 нуклеотидов либо непосредственно, либо с помощью спейсера, где олигонуклеотид включает по меньшей мере один динуклеотид YpR. В одном воплощении указанный олигонуклеотид не представляет собой T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO: 27). В одном воплощении CpG-олигонуклеотид класса Р включает по меньшей мере один неметилованный CpG-динуклеотид. В другом воплощении домен активации TLR представляет собой TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT или TTTT. В еще одном воплощении домен активации TLR находится в пределах 5'-палиндромной области. В другом воплощении домен активации TLR расположен непосредственно в направлении 5' к 5'-палиндромной области.

В одном воплощении CpG-олигонуклеотиды "класса Р" по изобретению имеют следующую нуклеиновокислотную последовательность:

5' TCGTCGACGATCGGCGCGCGCCG 3' (SEQ ID NO: 39).

В указанных последовательностях все связи могут быть фосфоротиоатными связями. В другом воплощении одна или более связей может быть фосфодиэфирной, предпочтительно между "С" и "G" CpG-мотива, делая CpG-олигонуклеотид полугибким. В любой из этих последовательностей этил-уридин или галоген может заменить 5' Т; примеры замен галогенами включают, без ограничения ими, замены бром-уридином или йод-уридином.

Неограничивающий пример олигонуклеотидов Р-класса включает:

5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (SEQ ID NO: 40), где * относится к фосфоротиоатной связи и _ относится к фосфодиэфирной связи.

В одном воплощении олигонуклеотид включает по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь. В другом воплощении все межнуклеотидные связи олигонуклеотида представляют собой фосфоротиоатные связи. В другом воплощении олигонуклеотид включает по меньшей мере одну связь, подобную фосфодиэфирной. В другом воплощении связь, подобная фосфодиэфирной, представляет собой фосфодиэфирную связь. В другом воплощении липофильная группа конъюгирована с олигонуклеотидом. В одном воплощении липофильная группа представляет собой холестерин.

В одном воплощении все межнуклеотидные связи CpG-олигонуклеотидов, раскрытых в данном описании изобретения, представляют собой фосфодиэфирные связи ("гибкие" олигонуклеотиды, описанные в РСТ заявке WO2007/026190). В другом воплощении CpG-олигонуклеотиды по изобретению становятся устойчивыми к деградации (например стабилизированы). "Стабилизированный олигонуклеотид" относится к олигонуклеотиду, который относительно устойчив к деградации *in vivo* (например с помощью экзо- или эндонуклеазы). Стабилизация нуклеиновой кислоты может быть осуществлена посредством модификации остова. Олигонуклеотиды, имеющие фосфоротиоатные связи, обеспечивают максимальную активность и защищают олигонуклеотид от деградации внутриклеточными экзо- и эндонуклеазами.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды могут иметь химерный остов, который содержит комбинации фосфодиэфирных и фосфоротиоатных связей. В контексте

настоящего изобретения химерный остов относится к частично стабилизированному остову, где по меньшей мере одна межнуклеотидная связь представляет собой фосфодиэфирную связь или связь, подобную фосфодиэфирной, и где по меньшей мере одна другая межнуклеотидная связь представляет собой стабилизированную межнуклеотидную связь, где по меньшей мере одна фосфодиэфирная или подобная фосфодиэфирной связь и по меньшей мере одна стабилизированная связь являются различными. Когда фосфодиэфирная связь преимущественно расположена в пределах мотива CpG, тогда такие молекулы называются “полугибкими”, как описано в заявке РСТ WO2007/026190.

Размер CpG-олигонуклеотида (т.е. число нуклеотидных остатков по всей длине олигонуклеотида) также может вносить свой вклад в стимулирующую активность олигонуклеотида. Для облегчения захвата клетками, CpG-олигонуклеотид по изобретению предпочтительно имеет минимальную длину 6 нуклеотидных остатков. Олигонуклеотиды любого размера более 6 нуклеотидов (даже длиной много т.н.) способны индуцировать иммунный ответ при наличии достаточных иммуностимулирующих мотивов, так как более крупные олигонуклеотиды разрушаются внутри клеток. В некоторых воплощениях CpG-олигонуклеотиды имеют длину от 6 до 100 нуклеотидов, предпочтительно от 8 до 30 нуклеотидов. В важных воплощениях нуклеиновые кислоты и олигонуклеотиды по изобретению не являются плазмидами или экспрессирующими векторами.

В одном воплощении CpG-олигонуклеотиды, раскрытые в данном описании изобретения, содержат замены или модификации, например в основаниях и/или сахарах, как описано в абзацах 134-147 в WO 2007/026190.

В одном воплощении CpG-олигонуклеотид по настоящему изобретению химически модифицирован. Примеры химических модификаций известны специалистам в данной области и описаны, например, в Uhlmann E. et al. (1990), Chem. Rev. 90:543, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke, S.T. et al. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; и Hunziker J. et al., (1995), Mod. Synth. Methods 7:331-417. Олигонуклеотид по изобретению может иметь одну или более модификаций, где каждая модификация находится на определенном фосфодиэфирном межнуклеозидном мостике, и/или на определенном элементе β -D-рибозы, и/или в определенном положении природного нуклеозидного основания по сравнению с олигонуклеотидом с той же самой последовательностью, которая состоит из природной ДНК или РНК.

В некоторых воплощениях изобретения CpG-содержащие нуклеиновые кислоты можно просто смешивать с иммуногенными носителями в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники (см., например, WO 03/024480).

В конкретном воплощении настоящего изобретения любая из иммуногенных композиций, раскрытых в данном описании изобретения, содержит от 2 мкг до 100 мг CpG-олигонуклеотида, предпочтительно от 0,1 мг до 50 мг CpG-олигонуклеотида, предпочтительно от 0,2 мг до 10 мг CpG-олигонуклеотида, предпочтительно от 0,3 мг до 5 мг CpG-олигонуклеотида, еще более предпочтительно от 0,5 до 2 мг CpG-олигонуклеотида, еще более предпочтительно от 0,75 до 1,5 мг CpG-олигонуклеотида. В предпочтительном воплощении иммуногенная композиция, раскрытая в данном описании изобретения, содержит примерно 1 мг CpG-олигонуклеотида.

В предпочтительном воплощении адъювант представляет собой адъювант на основе алюминия, выбранный из группы, состоящей из фосфата алюминия, сульфата алюминия и гидроксида алюминия. В одном воплощении иммуногенные композиции, описанные в данном описании изобретения, содержат в качестве адъюванта фосфат алюминия.

В предпочтительных воплощениях иммуногенные композиции по изобретению дополнительно содержат по меньшей мере один компонент из буфера, криопротектора, соли, двухвалентного катиона, неионогенного детергента, ингибитора свободнорадикального окисления, разбавителя или носителя.

5 Иммуногенная композиция возможно может содержать один или более физиологически приемлемых буферов, выбранных, без ограничения ими, из Tris (триметиламин), фосфатного, ацетатного, боратного, цитратного, глицинового, гистидинового и сукцинатного. В некоторых воплощениях композицию забуферивают до диапазона pH от примерно 5,0 до примерно 7,0, предпочтительно от примерно 5,5
10 до примерно 6,5.

Иммуногенная композиция возможно может содержать один или более неионных поверхностно-активных веществ, включая, но без ограничения ими, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, Полисорбат-80 (Tween 80), Полисорбат-60 (Tween 60), Полисорбат-40 (Tween 40) и Полисорбат-20 (Tween 20), алкиловые эфиры
15 полиоксиэтилена, включая, но без ограничения ими, Бридж 58, Бридж 35, а также другие, такие как Triton X-100; Triton X-114, NP40, Span 85 и ряд неионных поверхностно-активных веществ (например Плурионик 121). В предпочтительном воплощении иммуногенная композиция содержит Полисорбат-80 в концентрации от примерно 0,001% до примерно 2% (вплоть до примерно 0,25%, являющейся предпочтительной)
20 или Полисорбат-40 в концентрации от примерно 0,001% до 1% (вплоть до примерно 0,5%, являющейся предпочтительной).

Изобретение также относится к вакцинам, содержащим иммуногенную композицию по изобретению.

Способы индукции иммунного ответа и защиты от инфекции

25 Настоящее изобретение также включает способы применения иммуногенных композиций, описанных в данном описании изобретения. Например, в одном воплощении изобретения предложен способ индукции иммунного ответа против *Streptococcus pneumoniae*, включающий введение субъекту иммуногенного количества любой иммуногенной композиции, описанной в данном описании изобретения.

30 В одном воплощении изобретения предложен способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumonia*, или способ предупреждения инфекции *Streptococcus pneumonia*, или способ уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, где указанные способы включают введение субъекту иммуногенного количества любой
35 иммуногенной композиции, описанной в данном описании изобретения.

В одном воплощении изобретения предложен способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, или способ предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, или способ уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной
40 *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, где способы включают введение субъекту иммуногенного количества любой иммуногенной композиции, описанной в данном описании изобретения.

В одном воплощении изобретения предложен способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15C, или способ предупреждения инфекции
45 *Streptococcus pneumoniae* серотип 15C, или способ уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15C, где способы включают введение субъекту иммуногенного количества любой иммуногенной композиции, описанной в данном

описании изобретения.

В одном воплощении изобретения предложен способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, или способ предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотип 15А, или способ уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, где способы включают введение субъекту иммуногенного количества любой иммуногенной композиции, описанной в данном описании изобретения.

В одном воплощении изобретения предложен способ лечения или предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, заболевания или состояния, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В), у субъекта, включающий стадию введения субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества иммуногенной композиции, описанной в данном описании изобретения. В другом воплощении предложен способ лечения или предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, заболевания или состояния, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В) у субъекта, включающий получение препарата поликлональных или моноклональных антител из иммуногенной композиции, описанной в данном описании изобретения, и применение указанного препарата антител для обеспечения субъекта пассивным иммунитетом.

В одном воплощении изобретение относится к применению иммуногенного конъюгата или иммуногенной композиции, раскрытых в данном описании изобретения, для изготовления лекарственного средства для защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae*, и/или для предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, и/или для уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, и/или для защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В), и/или для предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В), и/или для уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В).

В одном воплощении изобретение относится к применению иммуногенного конъюгата или иммуногенной композиции, раскрытых в данном описании изобретения, для защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae*, и/или для предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, и/или для уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, и/или для защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В), и/или для предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В), и/или для уменьшения тяжести или задержки появления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15А, 15В и/или 15С (предпочтительно 15В и/или 15С, более предпочтительно 15В).

"Иммунный ответ" на иммуногенную композицию заключается в развитии у субъекта гуморального и/или клеточного иммунного ответа на молекулы, присутствующие в иммуногенной композиции или вакцинной композиции, представляющей интерес. В

контексте настоящего изобретения "гуморальный иммунный ответ" представляет собой антитело-опосредованный иммунный ответ и включает индукцию и образование антител, которые распознают и связывают с некоторой аффинностью антиген в иммуногенной композиции или вакцине по изобретению, в то время как "клеточный иммунный ответ"

представляет собой ответ, опосредованный Т-клетками и/или другими лейкоцитами. "Клеточный иммунный ответ" вызывается посредством презентации антигенных эпитопов в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I или класса II, CD1 или другими неклассическими МНС-подобными молекулами. Это активирует антиген-специфические CD4+ Т-хелперные клетки или CD8+

цитотоксические Т-лимфоциты ("CTL"). CTL обладают специфичностью к пептидным антигенам, которые представлены в ассоциации с белками, кодируемыми классическим или неклассическим МНС и экспрессируемыми на поверхности клеток. CTL помогают индуцировать и стимулировать внутриклеточное разрушение внутриклеточных микробов или лизис клеток, инфицированных такими микробами. Другой аспект клеточного

иммунитета включает антиген-специфический ответ хелперными Т-клетками. Хелперные Т-клетки действуют так, чтобы помочь стимулированию функции и фокусированию активности неспецифических эффекторных клеток против клеток, презентующих пептид или другие антигены в ассоциации с классическими или неклассическими молекулами МНС на своей поверхности. "Клеточный иммунный ответ" также относится

к продуцированию цитокинов, хемокинов и других подобных молекул, продуцируемых активированными Т-клетками и/или другими лейкоцитами, включая полученные из CD4+ и CD8+ Т-клеток. Способность конкретного антигена или композиции

стимулировать клеточный иммунологический ответ может быть определена с помощью ряда анализов, таких как анализы лимфопролиферации (активации лимфоцитов), CTL цитотоксические клеточные анализы, путем анализа Т-лимфоцитов, специфичных к антигену у сенсibilизированного субъекта или путем измерения продуцирования цитокинов Т-клетками в ответ на повторную стимуляцию антигеном. Такие анализы хорошо известны в данной области. См., например, Erickson *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 4189-4199; и Doe *et al.* (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2369-2376.

Используемое в данном описании "лечение" (включая его варианты, например "лечить" или "подвергнутый лечению") означает любое одно или более из следующих значений: (1) предупреждение инфекции или повторной инфекции, как в случае традиционной вакцины, (2) снижение тяжести или ликвидация симптомов, и (3) существенная или полная ликвидация патогена или расстройства, представляющего

интерес. Следовательно, лечение может быть выполнено профилактически (до инфицирования) или терапевтически (после инфицирования). В настоящем описании профилактическое лечение является предпочтительным способом. В соответствии с конкретным воплощением настоящего изобретения предложены композиции и способы для лечения, включая профилактическую и/или терапевтическую иммунизацию,

животного-хозяина против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15A, 15B и/или 15C (предпочтительно 15B и/или 15C, более предпочтительно 15B). Способы по настоящему изобретению пригодны для придания субъекту профилактического и/или терапевтического иммунитета. Способы по настоящему изобретению могут также быть реализованы на практике на субъектах для биомедицинских исследований.

Термины "иммуногенное количество" и "иммунологически эффективное количество", оба из которых используют взаимозаменяемо в данном описании изобретения, относятся к количеству антигена или иммуногенной композиции, достаточному для того, чтобы вызывать иммунный ответ, либо клеточный (Т-клетки), либо гуморальный (В-клетки

или антитела) ответ, либо оба, измеренный посредством стандартных анализов, известных специалистам в данной области техники.

В предпочтительном воплощении указанный субъект представляет собой человека. В наиболее предпочтительном воплощении указанный субъект представляет собой новорожденного (т.е. в возрасте до трех месяцев), младенца (от 3 месяцев до одного года)) или маленького ребенка (т.е. от одного года до четырех лет).

В одном воплощении иммуногенные композиции, раскрытые в данном описании изобретения, предназначены для использования в качестве вакцины.

В таком воплощении возраст субъекта, который должен быть вакцинирован, может составлять менее 1 года. Например, возраст субъекта, который должен быть вакцинирован, может составлять примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. В одном воплощении возраст субъекта, который должен быть вакцинирован, составляет примерно 2, 4 или 6 месяцев. В другом воплощении возраст субъекта, который должен быть вакцинирован, может составлять менее 2 лет. Например, возраст субъекта, который должен быть вакцинирован, может быть примерно 12-15 месяцев. В некоторых случаях требуется всего лишь одна доза иммуногенной композиции по настоящему изобретению, но в некоторых случаях должна быть введена вторая, третья или четвертая доза (см. раздел схемы приема лекарства).

В одном воплощении настоящего изобретения субъект, которого следует вакцинировать, представляет собой взрослого человека в возрасте 50 лет или старше, более предпочтительно взрослого человека в возрасте 55 лет или старше. В одном воплощении субъект, которого следует вакцинировать, представляет собой взрослого человека в возрасте 65 лет или старше, 70 лет или старше, 75 лет или старше, или 80 лет или старше.

В одном воплощении субъект, которого следует вакцинировать, представляет собой субъекта с пониженным иммунитетом, в частности человека. Субъект с пониженным иммунитетом, как правило, определяется как человек, который проявляет ослабленную или пониженную способность усиливать нормальную гуморальную или клеточную защиту в ответ на провокацию инфекционными агентами.

В одном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, страдает от заболевания или состояния, которое ухудшает иммунную систему и вызывает антительный ответ, который недостаточен для защиты от пневмококкового заболевания или его лечения.

В одном воплощении указанное заболевание представляет собой первичное иммунодефицитное расстройство. Предпочтительно, указанное первичное иммунодефицитное расстройство выбрано из группы, состоящей из: комбинированных Т- и В-клеточных иммунодефицитов, недостаточного образования антител, явно выраженных синдромов, заболеваний дисрегуляции иммунной системы, нарушения фагоцитоза, врожденного иммунодефицита, аутовоспалительных заболеваний и недостаточности комплемента. В одном воплощении указанное первичное иммунодефицитное расстройство выбрано из расстройств, представленных на с. 24, строка 11 - с. 25, строка 19 РСТ заявки WO 2010/125480.

В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, страдает от заболевания, выбранного из группы, состоящей из: ВИЧ-инфекции, синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД), рака, хронического сердечного или легочного расстройства, застойной сердечной недостаточности, сахарного диабета, хронической печёночной недостаточности, алкоголизма, цирроза печени, утечки спинномозговой жидкости,

кардиомиопатии, хронического бронхита, эмфиземы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), дисфункции селезенки (например серповидно-клеточной анемии), отсутствия функции селезенки (аспления), злокачественного заболевания крови, лейкемии, множественной миеломы, болезни Ходжкина, лимфомы, почечной недостаточности, нефротического синдрома и астмы.

В одном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, страдает от недостаточного питания.

В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, принимает лекарство или получает лечение, которое снижает сопротивляемость организма к инфекции. В одном воплощении указанное лекарственное средство выбрано из лекарственных средств, представленных на с. 26, строка 33 - с. 26, строка 40 в РСТ заявке WO2010/125480.

В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, является курильщиком.

В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, имеет количество лейкоцитов (лейкоцитарная формула) ниже 5×10^9 клеток на литр, или ниже 4×10^9 клеток на литр, или ниже 3×10^9 клеток на литр, или ниже 2×10^9 клеток на литр, или ниже 1×10^9 клеток на литр, или ниже $0,5 \times 10^9$ клеток на литр, или ниже $0,3 \times 10^9$ клеток на литр, или ниже $0,1 \times 10^9$ клеток на литр.

Количество лейкоцитов (лейкоцитарная формула): Количество белых кровяных телец (WBC) в крови. WBC обычно измеряют в рамках CBC (полный анализ крови). Лейкоциты являются борющимися с инфекцией клетками крови и отличаются от красных (переносящих кислород) клеток крови, известных как эритроциты. Существуют разные типы лейкоцитов, включающие нейтрофилы (полиморфоядерные лейкоциты; PMN), ленточные клетки (слегка незрелые нейтрофилы), лимфоциты Т-типа (Т-клетки), лимфоциты В-типа (В-клетки), моноциты, эозинофилы и базофилы. Все типы лейкоцитов отражены в количестве лейкоцитов в крови. Нормальный диапазон количества лейкоцитов в крови обычно составляет от 4300 до 10800 клеток на кубический миллиметр крови. Это также может относиться к лейкоцитарной формуле и может быть выражено в международных единицах, как $4,3-10,8 \times 10^9$ клеток на литр.

В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, страдает от нейтропении. В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным иммунитетом, которого следует вакцинировать, имеет количество нейтрофилов ниже 2×10^9 клеток на литр, или ниже 1×10^9 клеток на литр, или ниже $0,5 \times 10^9$ клеток на литр, или ниже $0,1 \times 10^9$ клеток на литр, или ниже $0,05 \times 10^9$ клеток на литр.

Низкое количество лейкоцитов в крови или “нейтропения” является состоянием, которое характеризуется аномально низкими уровнями нейтрофилов в циркулирующей крови. Нейтрофилы представляют собой специфический вид лейкоцитов, которые помогают предотвратить инфекции и бороться с ними. Наиболее распространенной причиной того, что больные раком имеют нейтропению, является побочный эффект химиотерапии. Нейтропения, индуцированная химиотерапией, увеличивает риск инфицирования пациента и нарушает лечение рака.

В конкретном воплощении настоящего изобретения субъект с пониженным

иммунитетом, которого следует вакцинировать, имеет число клеток CD4+ ниже 500/мм³, или число клеток CD4+ ниже 300/мм³, или число клеток CD4+ ниже 200/мм³, число клеток CD4+ ниже 100/мм³, число клеток CD4+ ниже 75/мм³, или число клеток CD4+ ниже 50/мм³.

Анализы клеток CD4 как правило представляют, как число клеток в мм³. Нормальное количество CD4 составляет от 500 до 1600, а количество CD8 составляет от 375 до 1100. Количества CD4 резко снижаются у людей с ВИЧ.

В одном воплощении изобретения любой субъект с пониженным иммунитетом, раскрытый в данном описании изобретения, представляет собой человека мужского или женского пола.

Количество конъюгата в композиции, как правило, рассчитывается на основе общего полисахарида, конъюгированного и неконъюгированного, для данного конъюгата. Например, конъюгат с 20% свободного полисахарида имеет примерно 80 мкг конъюгированного полисахарида и примерно 20 мкг неконъюгированного полисахарида в дозе 100 мкг полисахарида. Вклад белка в конъюгат, как правило, не учитывают при расчете дозы конъюгата. Как правило, каждая доза содержит от 0,1 до 100 мкг полисахарида, в частности от 0,1 до 10 мкг, более конкретно от 1 до 10 мкг и еще более конкретно от 1 до 5 мкг. Предпочтительно каждая доза содержит примерно 1,1, 2, 2,2, 3, 3,3, 4, 4,4 мкг полисахарида.

Оптимальные количества компонентов для конкретной иммуногенной композиции или вакцины могут быть установлены при помощи стандартных исследований, включающих наблюдения соответствующих иммунных ответов у субъектов. После первичной вакцинации субъекты могут получить одну или несколько бустерных иммунизаций с подходящими интервалами между ними.

Эффективность антигена в качестве иммуногена может быть измерена либо посредством пролиферационных анализов, посредством цитолитических анализов, таких как анализы высвобождения хрома для измерения способности Т-клеток лизировать свои специфические клетки-мишени, или путем измерения уровней активности В-клеток путем измерения уровней циркулирующих антител, специфичных к антигену, в сыворотке. Иммунный ответ также может быть определен путем измерения сывороточных уровней антиген-специфического антитела, индуцированного введением антигена, и более конкретно путем измерения способности антител, индуцированных таким образом, увеличивать опсонофагоцитирующую способность определенных лейкоцитов, описанных в данном описании изобретения. Уровень защиты иммунного ответа может быть измерен путем провокации иммунизированного хозяина антигеном, который был введен. Например, если антиген, к которому требуется иммунный ответ, представляет собой бактерию, измеряют уровень защиты, вызванный иммуногенным количеством антигена путем определения процента выживаемости или процента смертности после контрольного заражения животных бактериальными клетками. В одном воплощении величину защиты можно измерять путем измерения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с бактериальной инфекцией, например лихорадки, ассоциированной с инфекцией. Количество каждого антигена в мультиантигенной или в мультикомпонентной вакцине, или в иммуногенных композициях варьируется относительно каждого из других компонентов и может быть определено методами, известными специалистам. Такие методы включают процедуры измерения иммуногенности и/или эффективности *in vivo*.

В изобретении также предложены антитела и композиции антител, которые

специфически и селективно связываются с капсульными полисахаридами или гликоконъюгатами по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях антитела получают при введении субъекту капсульных полисахаридов или иммуногенных конъюгатов по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях в изобретении предлагаются очищенные или выделенные антитела, направленные против одного или более капсульных полисахаридов или гликоконъюгатов по настоящему изобретению. В некоторых воплощениях антитела по настоящему изобретению являются функциональными, при измерении посредством киллинга бактерий либо в модели эффективности на животных или посредством киллинг-анализа опсонофагоцитирующей активности. В некоторых воплощениях антитела по изобретению придают пассивный иммунитет субъекту. В настоящем изобретении предложены полинуклеотидные молекулы, кодирующие антитело или фрагмент антитела по изобретению, и клетки, клеточная линия (такие как клетки гибридомы или других сконструированных клеточных линий для рекомбинантного продуцирования антител) или трансгенные животные, которые продуцируют антитело или композицию антител по изобретению, с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Примеры

Пример 1: Получение выделенного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B

1.1 Ферментация и очистка

Капсульные полисахариды серотипа 15B можно получить непосредственно из бактерий, используя способы выделения, известные специалистам в данной области техники (см., например, способы, описанные в публикациях патентных заявок US 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340 и 20080102498 или в WO 2008118752). *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B выращивали в бутылки для посевного материала и затем переносили в ферментатор для посевного материала. При достижении необходимой оптической плотности клетки переносили в производственный ферментатор. Ферментационный бульон инактивировали добавлением N-лауроилсаркозина и очищали посредством ультрафильтрации и диафильтрации.

Затем очищенный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B был доведен до нужного размера с помощью гомогенизации под высоким давлением с использованием гомогенизатора PANDA 2K homogenizer® (GEA Niro Soavi) с получением выделенного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B.

Предпочтительно, выделенный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, полученный посредством вышеуказанного способа, содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15B и имеет молекулярную массу от 50 кДа до 500 кДа, предпочтительно от 150 до 350 кДа.

1.2 Окисление выделенного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B

Окисление полисахарида проводили в 100 мМ буфере на основе фосфата калия (рН 5,8±0,2), полученного путем последовательного добавления рассчитанного количества 500 мМ калий-фосфатного буфера (рН 5,8) и WFI (вода для инъекций) с получением конечной концентрации полисахарида 2,0 г/л. При необходимости рН реакционной смеси доводили до примерно рН 6,0. После корректировки рН температуру реакции доводили до 23±2°C. Окисление инициировали добавлением примерно 0,25 молярных эквивалентов периодата натрия. Реакцию окисления выполняли при 23±2°C в течение примерно 16 часов.

Концентрирование и диафильтрацию активированного полисахарида проводили с

использованием 100K MWCO (с отсечением по молекулярной массе) ультрафильтрационных кассет. Диафильтрацию проводили против 20-кратных диаобъемов WFI. Очищенный активированный полисахарид затем хранили при $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Очищенный активированный сахарид характеризовали, среди прочего, (1) концентрацией сахараида, определенной посредством колориметрического анализа; (2) концентрацией альдегида, определенной посредством колориметрического анализа; (3) степенью окисления (4) молекулярной массой, определенной с помощью SEC-MALLS и (5) наличием О-ацетила и глицерина.

SEC-MALLS используют для определения молекулярной массы полисахаридов и конъюгатов полисахарид-белок. SEC используют для разделения полисахаридов по гидродинамическому объему. Детекторы показателя преломления (RI) и многоугловые детекторы рассеивания лазерного света (MALLS) используют для определения молекулярной массы. Когда свет взаимодействует с веществом, он рассеивается, и количество рассеянного света связано с концентрацией, квадратом dn/dc (удельные инкременты показателя преломления) и молярной массой вещества. Измерение молекулярной массы рассчитывают на основании показаний рассеянного светового сигнала с детектора MALLS и сигнала концентрации с детектора RI.

Степень окисления ($DO = \text{моли повторяющейся единицы сахара/моли альдегида}$) активированного полисахарида определяли следующим образом:

Моли повторяющейся единицы сахара определяют различными колориметрическими методами, такими как, например, антроновый метод. В антроновом методе полисахарид сначала разрушают до моносахаридов под действием серной кислоты и тепла. Антроновый реагент вступает во взаимодействие с гексозами с образованием желто-зеленого комплекса, поглощение которого считают спектрофотометрически при 625 нм. В рамках анализа поглощение прямо пропорционально количеству присутствующей гексозы.

Моли альдегида также определяют одновременно, используя колориметрический метод MBTH. MBTH-анализ включает образование азинового соединения путем взаимодействия альдегидных групп (из данного образца) с 3-метил-2-бензотиазолом-гидразом (реагент MBTH-анализа). Избыток 3-метил-2-бензотиазолин-гидразона окисляется с образованием реакционноспособного катиона. Реакционноспособный катион и азид реагируют с образованием синего хромофора. Образовавшийся хромофор затем считают спектроскопически при 650 нм.

Предпочтительно, активированный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, полученный посредством вышеуказанного способа, содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В и имеет молекулярную массу от 50 кДа до 500 кДа, предпочтительно от 100 до 250 кДа.

1.3 Конъюгирование активированного капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15Вс CRM₁₉₇

Способ конъюгирования состоит из следующих стадий:

- а) Смешивание с сахарозным эксципиентом и лиофилизация.
- б) Восстановление лиофилизированного полисахарида и CRM₁₉₇.
- в) Конъюгирование активированного полисахарида с CRM₁₉₇ и блокирование.
- г) Очистка конъюгата

а) Смешивание с сахарозным эксципиентом и лиофилизация
Активированный полисахарид смешивали с сахарозой в соотношении 25 г сахарозы на грамм активированного полисахарида. Бутыль смеси затем лиофилизировали. После

лиофилизации бутыли, содержащие лиофилизированный активированный полисахарид, хранили при $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Рассчитанное количество белка CRM₁₉₇ было поверхностно заморожено и лиофилизировано отдельно. Лиофилизированный CRM₁₉₇ хранили при $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

б) Восстановление лиофилизированного активированного полисахарида и белка CRM₁₉₇

Лиофилизированный активированный полисахарид восстанавливали в безводном диметилсульфоксиде (DMSO). После полного растворения полисахарида равное количество безводного DMSO добавляли к лиофилизированному CRM₁₉₇ для восстановления.

в) Конъюгирование и блокирование

Восстановленный активированный полисахарид объединяли с восстановленным CRM₁₉₇ в сосуде для взаимодействия (соотношение на входе 0,8:1)? затем тщательно смешивали с получением прозрачного раствора, затем инициировали конъюгирование цианоборгидридом натрия. Конечная концентрация полисахарида в реакционном растворе составляет примерно 1 г/л. Конъюгирование инициировали добавлением 1,0-1,5 мг-экв цианоборгидрида натрия к реакционной смеси и реакционную смесь инкубировали при $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 40-48 ч. Прекращение реакции конъюгирования осуществляли путем добавления 2 мг-экв боргидрида натрия (NaBH₄) для блокирования непрореагировавших альдегидов. Блокирующая реакция продолжалась при $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ± 1 ч.

г) Очистка конъюгата

Раствор конъюгата разбавляли 1:10 охлажденным раствором 5 мМ сукцината-0,9% раствора хлорида натрия (pH 6,0) при подготовке к очистке посредством тангенциальной проточной фильтрации с использованием 100K MWCO мембран. Разбавленный раствор конъюгата пропускали через фильтр 5 мкм и выполняли диафильтрацию, используя раствор 5 мМ сукцината-0,9% раствора хлорида натрия (pH 6,0) в качестве среды. После завершения диафильтрации ретентат пропускали через фильтр 0,22 мкм.

Конъюгат затем разбавляли смесью 5 мМ сукцинат/0,9% раствор хлорида натрия (pH 6) до целевой концентрации сахара, равной примерно 0,5 мг/мл. Конечную стадию фильтрования через 0,22 мкм завершали для получения иммуногенного конъюгата.

Предпочтительно, конъюгат, полученный посредством вышеуказанного способа и содержащий по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на мМ капсульного полисахарида серотипа 15В, имеет молекулярную массу от 3000 до 20000 кДа и имеет степень конъюгирования от 2 до 6.

Пример 2: Характеристика иммуногенного конъюгата, содержащего капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с CRM₁₉₇

Конъюгат 1 получали посредством способа, описанного в примере 1. Конъюгаты 2 и 3 получали посредством аналогичного способа с использованием разных количеств окислителя. Конъюгат 4 получали посредством аналогичного способа за исключением того, что очищенный капсульный полисахарид серотипа 15В не доводили до нужного размера и он был активирован до более низкого DO (более высокий уровень окисления) и конъюгацию выполняли в водной среде. Конъюгат 5 был получен посредством аналогичного способа за исключением того, что очищенный капсульный полисахарид серотипа 15В был доведен до нужного размера посредством химического гидролиза и конъюгацию выполняли в водной среде. Конъюгаты 6 и 7 были получены посредством аналогичного способа за исключением того, что очищенный капсульный полисахарид

серотипа 15В не доводили до нужного размера. Полученные конъюгаты были охарактеризованы, и результаты обобщены в Таблице 1.

Таблица 1: Конъюгаты капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В-CRM₁₉₇

5

10

15

20

25

Конъюгат	1	2	3	4	5	6	7
Полисахарид	Доведенный до нужного размера	Доведенный до нужного размера	Доведенный до нужного размера	Нативный	Гидролизированный	Нативный	Нативный
О-Ацетилирование; Полисахарид (мкмоль ацетат/мкмоль поли)	0,69	0,69	0,69	1,01	0,66	0,76	NA
Растворитель	DMSO	DMSO	DMSO	Водный	Водный	DMSO	DMSO
DO активированного полисахарида	11,4	5,8	9,7	4,8	8,8	5	12
MW активированного полисахарида	196 кДа	218 кДа	235 кДа	435 кДа	270 кДа	431 кДа	460 кДа
Выход (%)	87,2	64	63,7	96,2	78,8	24,2	26,2
Соотношение сахара к белку	0,68	0,65	0,71	1,22	1,29	0,9	1,5
Свободный Сахарид (%)	< 5	< 5	6,1	18,1	PC72026 41 14,2	8,8	18
MW конъюгата, SEC-MALLS	6190 кДа	7090 кДа	7937 кДа	1766 кДа	1029 кДа	6293 кДа	4466 кДа
О-Ацетилирование, Конъюгат (мкмоль ацетат/мкмоль поли)	0,68	0,7	0,68	0,61	0,44	0,85	NA
<0,3 Kd (%), SEC	NA	73	NA	NA	62	NA	NA
Степень конъюгирования, (AAA); модифицированный Lys	3,7	3,9	4,1	NA	3,4	NA	NA
% О-Ацетил, сохранившийся в конъюгате	99%	100%	99,5%	60%	67%	100%	NA

Процент свободного полисахарида измеряют посредством процедуры с использованием геля гидроксида алюминия для связывания белка и ковалентно связанного сахара для удаления центрифугированием. Образцы смешивают с гелем гидроксида алюминия в фосфатном буфере и центрифугируют. Связанный сахар осаждается с гелем, а свободный сахар остается в супернатанте. Полученный супернатант и контрольные образцы количественно оценивали с помощью соответствующих колориметрических анализов для определения процента свободного сахара и для подтверждения достаточного удаления белка и извлечения сахара.

Для аминокислотного анализа образец полисахарид-белок сначала подвергают гидролизу на его отдельные компоненты в виде свободных аминокислот, с использованием гидролиза 6 н. соляной кислотой (HCl) под вакуумом и нагрева (160°C в течение 15 минут). После гидролиза образцы анализируют с использованием аминокислотного анализатора. Отдельные аминокислоты разделяют с помощью ионообменной хроматографии, используя ступенчатый градиент натрий-цитратного буфера с изменением температуры и линейной скорости потока. После разделения определяли количество каждого аминокислотного остатка с использованием системы постколлоного обнаружения соединения с нингидрином. В этой системе нингидрин смешивают с элюатом из колонки в системе постколлоного реактора, и смесь пропускают через фотометр. Реакция нингидрина с элюированными аминокислотами дает фиолетовое соединение, которое имеет максимальное поглощение при 570 нм. Это поглощение представляет собой линейный ответ (функцию) присутствующего количества присутствующих α-аминогрупп, и эта реакция обеспечивает количественный

колориметрический анализ для всех органических соединений с α -аминогруппами. В реакции с иминокислотами, такими как пролин и гидроксипролин, которые не имеют свободных аминогрупп, образуется ярко-желтое соединение и оно имеет поглощение при 440 нм. Площади пиков для каждой аминокислоты рассчитывают, используя обе

выходные длины волны 570 и 440 нм.

Выход рассчитывают следующим образом: (количество полисахарида в конъюгате $\times 100$)/количество активированного полисахарида.

Конъюгаты (4 и 5), образованные с использованием водной среды, демонстрируют значительное снижение уровней О-ацетила. Конъюгаты, образованные в растворителе DMSO, с использованием нативного полисахарида без доведения MW до нужного размера (6 и 7) не демонстрируют снижения уровней О-ацетила. Однако, в дополнение к плохим фильтрационным характеристикам, выходы конъюгата были очень низкими. Конъюгаты, образованные в DMSO, с использованием полисахаридов, которые были доведены до нужного размера посредством гомогенизации под высоким давлением (1, 2 и 3), имели высокий выход и лучшие характеристики фильтруемости со значительным сохранением уровней О-ацетила. Эти конъюгаты также имели очень низкие уровни свободных полисахаридов.

Пример 5: Анализ опсонофагоцитирующей активности (ОРА)

Иммуногенность конъюгатов по изобретению можно оценить с использованием опсонофагоцитирующего анализа (ОРА), описанного ниже.

Группы из 30 6-7 недельных самок-мышей Swiss Webster иммунизировали 0,001 мкг, 0,01 мкг или 0,1 мкг тестируемых конъюгатов посредством подкожного введения в неделю 0. Мышам дополнительно вводили такую же дозу конъюгата в неделю 3 и затем выпускали кровь в неделю 4. Серотип-специфические ОРА выполняли на образцах сыворотки 4 недели.

ОРА используют для измерения функциональных антител в сыворотке крови мышей, специфичных к *S. pneumoniae* серотипа 15В. Тестируемую сыворотку помещают в анализируемые реакционные смеси, которые измеряют способность иммуноглобулина, специфичного к капсульному полисахариду, опсонизировать бактерии, запускать осаждение комплемента, тем самым способствуя фагоцитозу и уничтожению бактерий фагоцитами. Титр ОРА определяют как обратное разведение, которое приводит к 50%-ному уменьшению количества бактерий по сравнению с контрольными лунками без тестируемой сыворотки. Титр ОРА интерполируют из двух разведений, которые включают эту границу 50%-ного уничтожения.

Процедуры ОРА были основаны на методах, описанных в Hu et al., Clin Diagn Lab Immunol 2005;12(February (2)):287-95 со следующими модификациями. Тестируемую сыворотку серийно разводили в 2,5 раза и добавляли к планшетах для микротитрования. Живые целевые бактерии серотипа 15В добавляли в лунки и планшеты встряхивали при 37°C в течение 30 минут. Сыворотку дифференцированных клеток HL-60 (фагоциты) и крольчат (в возрасте от 3 до 4 недель, Pel-Freez®, 6,25% конечная концентрация) добавляли в лунки, и планшеты встряхивали при 37°C в течение 45 минут. Для прекращения реакции, 80 мкл 0,9% NaCl добавляли во все лунки, смешивали, и 10 мкл аликвоту переносили в лунки MultiScreen HTS HV фильтрующих планшетов (Millipore®), содержащих 200 мкл воды. Жидкость фильтровали через планшеты под вакуумом и 150 мкл среды HySox добавляли в каждую лунку и фильтровали через нее. Фильтрующие планшеты затем инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи и затем фиксировали с помощью обесцвечивающего раствора Destain Solution (Bio-Rad). Затем планшеты окрашивали кумасси синим и один раз обесцвечивали. Колонии визуализировали и

подсчитывали на Cellular Technology Limited (CTL) ImmunoSpot Analyzer®. Подсчеты необработанных колоний использовали для построения кривых гибели и определения титров ОРА.

Иммуногенность конъюгатов 1 и 2 определяли в соответствии с вышеуказанным анализом. Один дополнительный конъюгат и неконъюгированный нативный капсульный полисахарид *S. pneumoniae* серотипа 15В (неконъюгированный PS) также тестировали в этом же анализе:

Конъюгат 9 получали посредством конъюгирования нативного (то есть не доведенного до нужного размера) капсульного полисахарида серотипа 15В с CRM₁₉₇ посредством восстановительного аминирования в водном растворе.

Результаты показаны в Таблице 2.

Таблица 2: ОРА-титры в испытаниях на животных			
ОРА GMT (среднее геометрическое титра антител) (95% CI)			
	0,001 мкг	0,01 мкг	0,1 мкг
Конъюгат 1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
Конъюгат 2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
Конъюгат 9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
Неконъюгированный PS	-	-	698 (466, 1045)

Как показано в таблице выше, конъюгаты 1 и 2 при введении мышам образуют антитела, способные опсонизировать *S. pneumoniae* серотипа 15В, запуская отложение комплемента, тем самым содействуя фагоцитозу и уничтожению бактерий фагоцитами. Кроме того, несмотря на их низкую молекулярную массу, они также демонстрируют уровень иммуногенности, аналогичный конъюгату 9, который не был доведен до нужного размера.

Пример 4: Кросс-функциональные ОРА-ответы между серотипом 15В и серотипом 15С

Пневмококковая серогруппа 15 включает четыре структурно родственных серотипа: 15А, 15В, 15С и 15F. Серотипы 15В и 15С неразличимы методами генотипирования и имеют аналогичный состав капсульных полисахаридов (PS), за исключением того, что 15В-PS является О-ацетилированным вариантом 15С-PS. Чтобы понять, обладают ли антитела против PS серотипа 15В кросс-функциональной реактивностью с серотипом 15С, 10 кроликов иммунизировали вакцинами PCV16v и PCV20v, обе из которых содержали иммуногенный конъюгат, содержащий капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с CRM₁₉₇, как раскрыто в данном описании изобретения, в качестве части их композиции. Сыворотку до и после вакцинации тестировали с помощью ОРА-анализов против целевых пневмококковых штаммов серотипов 15В и 15С.

Из 10 кроликов каждой группы 100% имели ОРА-реакцию на серотип 15В после иммунизации конъюгатом серотипа 15В. Из этих же образцов 100% также имели ОРА-ответ на серотип 15С (Таблица 1 и Таблица 2). Низкие ОРА-титры наблюдались в сыворотке до вакцинации в 15С ОРА. Однако увеличение более чем в 10-раз GMT ОРА титра сыворотки после вакцинации по сравнению с титром до вакцинации демонстрирует, что иммуногенные конъюгаты по изобретению индуцируют образование антител, способных уничтожать *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В и 15С в ОРА.

PCV16v представляет собой композицию 16-валентных конъюгатов, содержащих гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 15В, 18С, 19А, 19F, 22F, 23F и 33F (16vPnC), все из которых индивидуально конъюгированы с CRM₁₉₇.

PCV20v представляет собой композицию 20-валентных конъюгатов, содержащих

гликоконъюгаты из *S. pneumoniae* серотипов 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F и 33F (20vPnC), все из которых отдельно конъюгированы с CRM₁₉₇.

Таблица 1. Титры ОРА против штаммов серотипов 15В и 15С в кроличьей сыворотке до и после вакцинации PCV16v

животное	15В ОРА		15С ОРА	
	неделя 0	неделя 4	неделя 0	неделя 4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

Таблица 2. Титры ОРА против штаммов серотипов 15В и 15С в кроличьей сыворотке до и после вакцинации PCV20v

животное	15В ОРА		15С ОРА	
	неделя 0	неделя 4	неделя 0	неделя 4
1	4	3784	неопределяемый*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	неопределяемый*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	неопределяемый*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	неопределяемый*	527
10	4	616	неопределяемый*	545
GMT	4	1917	77	1515

* Титр не может быть определен из-за плохих кривых киллинга

Перечень последовательностей

<110> Pfizer Inc.

<120> Капсульные полисахариды *Streptococcus pneumoniae* и их конъюгаты

<130> PC72026A

<150> US 61/929,561

<151> 2014-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CpG-олигонуклеотид "класса А"

<400> 1

	ggggacgacg tcgtgggggg g	21
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса А"	
	<400> 2	
	ggggacgacg tcgtgggggg g	21
10	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> CpG-олигонуклеотид "класса В"	
	<400> 3	
	tcgtcgtttt tcggtgcttt t	21
	<210> 4	
	<211> 21	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса В"	
	<400> 4	
25	tcgtcgtttt tcggtcgttt t	21
	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса В"	
	<400> 5	
	tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
	<210> 6	
35	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса В"	
40	<400> 6	
	tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt	24
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса В"	
	<400> 7	

	tcgtcgttttt gtcgttttttt tcga	24
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса В	
	<400> 8	
	tcgtcgttttt tcggtgcttt t	21
10	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> олигонуклеотид класса В	
	<400> 9	
	tcgtcgttttt tcggtcgttt t	21
	<210> 10	
	<211> 24	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса В	
	<400> 10	
25	tcgtcgttttt gtcgtttttgt cgtt	24
	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса В	
	<400> 11	
	tcgtcgttttc gtcgtttttgt cgtt	24
	<210> 12	
35	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса В	
40	<400> 12	
	tcgtcgttttt gtcgttttttt tcga	24
	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
	<400> 13	

	tcgcgctcggtt cggcgcgcgс cг	22
	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса C"	
	<400> 14	
	tcgtcgacgt tcggcgcgсг cсг	23
10	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> CpG-олигонуклеотид "класса C"	
	<400> 15	
	tcggacgttc ggcgcgcсс g	21
	<210> 16	
	<211> 19	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса C"	
	<400> 16	
25	tcggacgttc ggcgcgcссг	19
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса C"	
	<400> 17	
	tcgcgctcggtt cggcgcgссг	20
	<210> 18	
35	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса C"	
40	<400> 18	
	tcgacgttcg gcgcgcссг	20
	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса C"	
	<400> 19	

	tcgacgttcg gcgcgscg	18
	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
	<400> 20	
	tcgcgtcgtt cggcgcscg	18
10	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
	<400> 21	
	tcgcgacgtt cggcgcgcgc sg	22
	<210> 22	
	<211> 22	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
	<400> 22	
25	tcgtcgtttt cggcgcgcgc sg	22
	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
	<400> 23	
	tcgtcgtttt cggcgcgcgc sg	22
	<210> 24	
35	<211> 24	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
40	<400> 24	
	tcgtcgtttt acggcgcscgt gccg	24
	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса С"	
	<400> 25	

	tcgtcggtttt cggcgcgcg cgt	23
	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотиды класса С	
	<400> 26	
	tcgcgctcggtt cggcgcgcg cg	22
10	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 27	
	tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg	23
	<210> 28	
	<211> 21	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 28	
25	tcggacgttc ggcgcgcgc cc g	21
	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 29	
	tcggacgttc ggcgcgcgc ccg	19
	<210> 30	
35	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
40	<400> 30	
	tcgcgctcggtt cggcgcgccg	20
	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 31	

	tcgacggttcg gcgcgcgcgc	20
	<210> 32	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 32	
	tcgacggttcg gcgcgcgcgc	18
10	<210> 33	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 33	
	tcgcgctcgtt cggcgcgcgc	18
	<210> 34	
	<211> 22	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 34	
25	tcgcgcacgtt cggcgcgcgc gc	22
	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
30	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 35	
	tcgtcgtttt cggcgcgcgc gc	22
	<210> 36	
35	<211> 22	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
40	<400> 36	
	tcgtcgtttt cggcgcgcgc gc	22
	<210> 37	
	<211> 24	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 37	

	tcgtcgtttt acggcgccgt gccg	24
	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
5	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> олигонуклеотид класса С	
	<400> 38	
	tcgtcgtttt cggcgcgcg cgt	23
10	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
15	<223> CpG-олигонуклеотид "класса Р"	
	<400> 39	
	tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg	23
	<210> 40	
	<211> 23	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<223> CpG-олигонуклеотид "класса Р"	
	<400> 40	
25	tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg	23

(57) Формула изобретения

1. Иммуногенный конъюгат, способный индуцировать защитный иммунный ответ против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, содержащий выделенный

30 капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В, ковалентно связанный с белком-носителем, где указанный выделенный капсульный полисахарид *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15В содержит по меньшей мере 0,6 мМ ацетата на 1 мМ указанного капсульного полисахарида серотипа 15В, по меньшей мере 0,6 мМ глицерина на 1 мМ

указанного капсульного полисахарида серотипа 15В и имеет молекулярную массу от

35 100 кДа до 350 кДа, где соотношение капсульного полисахарида серотипа 15В к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,4 до 2 и где иммуногенный конъюгат имеет молекулярную массу от 3000 до 20000 кДа.

2. Иммуногенный конъюгат по п. 1, где белок-носитель представляет собой CRM197.

3. Иммуногенный конъюгат по любому из пп. 1-2, который содержит менее чем

40 примерно 40, 35, 30, 25, 20 или 15% свободного капсульного полисахарида серотипа 15В по сравнению с общим количеством капсульного полисахарида серотипа 15В.

4. Иммуногенный конъюгат по любому из пп. 1-3, который имеет молекулярную массу от 10000 до 16000 кДа.

5. Иммуногенный конъюгат по любому из пп. 1-4, где соотношение капсульного

45 полисахарида серотипа 15В к белку-носителю в конъюгате составляет от 0,5 до 1,5.

6. Иммуногенный конъюгат по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере 40% иммуногенного конъюгата имеет значение Kd ниже или равное 0,3 на колонке CL-4В.

7. Иммуногенный конъюгат по любому из пп. 1-6, где степень конъюгации 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.

8. Иммуногенная композиция, содержащая иммуногенный конъюгат по любому из пп. 1-7 и физиологически приемлемый носитель, для индуцирования защитного иммунного ответа против *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B.

9. Иммуногенная композиция по п. 8, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный антиген.

10. Иммуногенная композиция по п. 8 или 9, дополнительно содержащая адъювант.

11. Иммуногенная композиция по п. 10, где адъювант представляет собой фосфат алюминия.

12. Вакцина для защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, содержащая иммуногенную композицию по любому из пп. 8-11.

13. Способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, включающий введение субъекту иммуногенного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

14. Способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15C, включающий введение субъекту иммуногенного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

15. Способ защиты субъекта против инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипов 15B и 15C, включающий введение субъекту иммуногенного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

16. Способ лечения или предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, заболевания или состояния, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B, у субъекта, включающий стадию введения терапевтически или профилактически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

17. Способ лечения или предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, заболевания или состояния, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15C, у субъекта, включающий стадию введения терапевтически или профилактически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

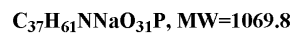
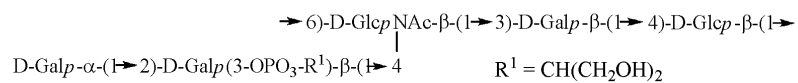
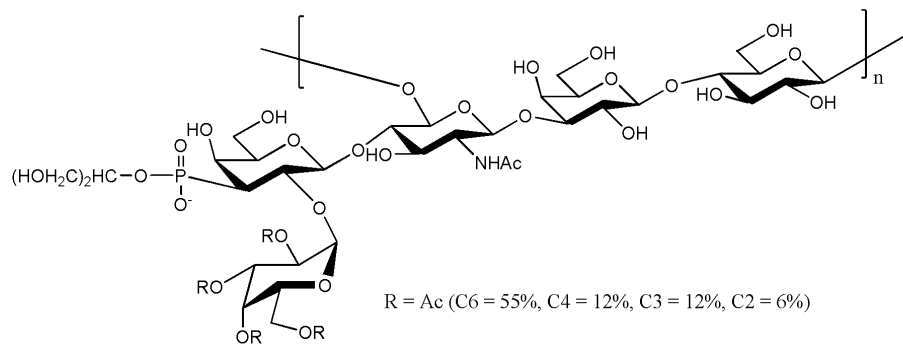
18. Способ лечения или предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae*, заболевания или состояния, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae* серотипов 15B и 15C, у субъекта, включающий стадию введения терапевтически или профилактически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

19. Способ предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15B у субъекта, включающий стадию введения профилактически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

20. Способ предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипа 15C у субъекта, включающий стадию введения профилактически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

21. Способ предупреждения инфекции *Streptococcus pneumoniae* серотипов 15B и 15C у субъекта, включающий стадию введения профилактически эффективного количества иммуногенной композиции по любому из пп. 8-11 или вакцины по п. 12.

Фиг. 1



Ac=Ацетил