

R U 2 4 2 2 1 5 6 C 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 422 156⁽¹³⁾ C2

(51) МПК
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2007102016/15, 21.06.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.06.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.06.2004 GB 0413868.1

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2008 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 27.06.2011 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 02/058737 A2, 01.08.2002. WO 2004/032958 A, 22.04.2004. JUMEL K. et al., Evaluation of meningococcal C oligosaccharide conjugate vaccines by size-exclusive chromatography/multi-angle laser light scattering, Biotechnol. and Applied Biochem., 2002, v.36, №3, pp.219-226.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 22.01.2007

(86) Заявка РСТ:
IB 2005/002532 (21.06.2005)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/000920 (05.01.2006)

Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, пат.пov.
Д.А.Сапельникову, рег.№ 114

(72) Автор(ы):

КАПАННОЛИ Джорджо (IT),
КАРИНЧИ Валерия (IT),
Д'АШЕНЦИ Сандро (IT),
МАГАНЬОЛИ Клаудиа (IT)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС ВЭКСИНС ЭНД
ДИАГНОСТИКС С.Р.Л. (IT)

(54) КОМПОЗИЦИИ КОНЬЮГАТОВ САХАРИДОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и касается композиций для производства вакцин против *Neisseria meningitidis*, представляющих собой конъюгаты различных серогрупп *N.meningitidis* с белком-носителем, выбранным из бактериальных токсинов или анатоксинов, с определенным размером, при определении гель-проникающей хроматографией (GPC) и/или с определенной

молекулярной массой при определении эксклюзионной хроматографией с детектированием фотометрией многоуглового рассеяния света (SEC-MALS). Преимущество изобретения заключается в том, что конъюгаты заявленных размеров, представляющих собой фрагменты сахаридов, используются при объединении в поливалентную вакцину. 6 н.л. ф-лы, 14 ил.

R U 2 4 2 2 1 5 6 C 2

R U 2 4 2 2 1 5 6 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) RU (11) 2 422 156 (13) C2

(51) Int. Cl.
A61K 39/095 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2007102016/15, 21.06.2005

(24) Effective date for property rights:
21.06.2005

Priority:

(30) Priority:
21.06.2004 GB 0413868.1

(43) Application published: 27.07.2008 Bull. 21

(45) Date of publication: 27.06.2011 Bull. 18

(85) Commencement of national phase: 22.01.2007

(86) PCT application:
IB 2005/002532 (21.06.2005)

(87) PCT publication:
WO 2006/000920 (05.01.2006)

Mail address:

105064, Moskva, a/ja 88, pat.pov.
D.A.Sapel'nikovu, reg.№ 114

(72) Inventor(s):

KAPANNOLI Dzhordzho (IT),
KARINCHI Valeria (IT),
D'AShENTsI Sandro (IT),
MAGAN'OLI Klaudia (IT)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS VEhKSINS EhND DIAGNOSTIKS
S.R.L. (IT)

R U 2 4 2 2 1 5 6 C 2

(54) COMPOSITIONS OF SACCHARIDE CONJUGATES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology and deals with compositions for production of vaccine against *Neisseria meningitidis*, which represent conjugates of different serogroups of *N. meningitidis* with protein-carrier, selected from bacterial toxins or anatoxins, with specified size, in determination by gel-penetrating chromatography

(GPC) and/or definite molecular weight in determination by exclusion chromatography with detecting by photometry of multi-angle light diffusion (SEC-MALS).

EFFECT: conjugates of claimed sizes, representing saccharide fragments, are applied in combination into polyvalent vaccine.

6 cl, 11 dwg

Все документы, упомянутые здесь, включены путем ссылки во всей своей полноте.

Область изобретения

Это изобретение относится к области анализа и контроля качества вакцин, которые включают бактериальные капсульные сахарины, конъюгированные с носителем.

Предшествующий уровень техники изобретения

Иммуногены, содержащие капсульные сахаридные антигены, конъюгированные с белками-носителями, широко известны в этой области. Конъюгирование превращает Т-независимые антигены в Т-зависимые антигены, таким образом усиливая вторичные иммунные ответы и позволяя защитному иммунитету развиваться, а прототипом конъюгированной вакцины послужила вакцина для *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) [например, см. главу 14 ссылки 1]. Со временем Hib вакцины были разработаны конъюгированные сахаридные вакцины для защиты от *Neisseria meningitidis* (менингококк) и против *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк). Другие организмы, для которых конъюгированные вакцины представляют интерес, это *Streptococcus agalactiae* (группа В стрептококков) [2], *Pseudomonas aeruginosa* [3] и *Staphylococcus aureus* [4].

Вместо того, чтобы использовать полноразмерные капсульные сахарины, можно выбирать олигосахаридные фрагменты желаемого размера после стадии гидролиза [например, ссылка 5], и было показано, что конъюгаты, полученные с олигосахаридами средней длины цепи, дают улучшенную иммуногенность [например, ссылки 6 и 7]. Из трех конъюгированных вакцин N.meningitidis серогруппы C, которые были одобрены для использования на людях, MenjugateTM [8] и MeningitecTM основаны на олигосахаридах, тогда как NeisVac-CTM использует полноразмерный полисахарид.

Когда в вакцину включены конъюгаты, контроль качества по производству и выпуску обычно требует, чтобы они имели определенный размер молекулы и/или молярную массу, а также чтобы эти параметры соотносились между группами. Размер молекулы и молярная масса могут также быть использованы для контроля стабильности вакцины, поскольку конъюгаты могут агрегировать со временем, вызывая увеличение размера и массы.

Задача изобретения обеспечить новые и улучшенные методы для измерения молекулярного размера, молярной массы и родственных параметров для конъюгированных сахаридных антигенов, особенно для конъюгатов менингококковых сахаридов.

Раскрытие изобретения

Изобретатели обнаружили, что гель-проникающая хроматография и SEC-MALS (size exclusion chromatography with detection by multi-angle light-scattering photometry - эксклюзионная хроматография с детектированием фотометрией многоуглового рассеяния света) могут быть использованы для точного и достоверного измерения молекулярного размера и молярной массы, соответственно, конъюгатов сахаридов.

Таким образом, изобретение обеспечивает способ измерения молекулярного размера конъюгированного сахаридного антигена в образце, включающий стадию анализа образца с помощью гель-проникающей хроматографии. Время удерживания из хроматографического анализа может быть преобразовано в радиус вязкости ($R\eta$), например, сравнением по калибровочной кривой, таким образом, позволяя просто вычислять молекулярный размер. Таким способом может быть легко определен средний молекулярный размер и/или распределение молекулярных размеров конъюгатов в образце.

Изобретение также обеспечивает способ измерения молярной массы конъюгированного сахаридного антигена в образце, включающий стадию анализа

образца с помощью SEC-MALS. Время удерживания в эксклюзионной хроматографии может быть преобразовано в молярную массу. Таким способом могут быть легко определены средняя молярная масса и/или распределение молярных масс (полидисперсность) конъюгатов в образце. В ссылке 9 показано, что SEC-MALS ранее использовалась для измерения пре-конъюгированных пневмококковых и менингококковых сахаридов, но ни о каких данных пост-конъюгирования не сообщается.

Сахарид

Изобретение позволяет измерять параметры для конъюгированных сахаридных антигенов. Сахаридный антиген является типичным бактериальным капсульным сахаридом, например, из *Neisseria meningitidis* (серогруппы A, B, C, W135 или Y), *Streptococcus pneumoniae* (серотипы 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F или 23F), *Streptococcus agalactiae* (типы Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII или VIII), *Haemophilus influenzae* (типируемые штаммы: a, b, c, d, e или f), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и т.д. Остальные сахариды, определяемые при анализе, включают глюканы (например, грибковые глюканы, такие как глюканы в *Candida albicans*) и грибковые капсульные сахариды, например, из капсулы *Cryptosporidium neoformans*. Изобретение особенно полезно для анализа капсульных сахаридов из серогрупп A, C, W135 и Y *N.meningitidis*.

Капсула *N.meningitidis* серогруппы A - это гомополимер ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связанного N-ацетил-D-маннозамина-1-фосфата, с частичным O-ацетилированием в C3 и C4 положениях. Капсула *N.meningitidis* серогруппы A - это гомополимер ($\alpha 2 \rightarrow 8$)-связанных сиаловых кислот. Капсульный сахарид *N.meningitidis* серогруппы C - это гомополимер ($\alpha 2 \rightarrow 9$)-связанной сиаловой кислоты (N-ацетил нейраминовой кислоты или 'NeuNAc') с различным O-ацетилированием в позициях 7 и/или 8.

Сахарид *N.meningitidis* серогруппы W135 - это полимер, состоящий из звеньев дисахарида сиаловая кислота-галактоза [$\rightarrow 4$]-D-NeuP5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Gal- α -(1 \rightarrow] с различным O-ацетилированием в 7 и 9 позициях сиаловой кислоты [10].

Сахарид *N.meningitidis* серогруппы Y аналогичен сахариду серогруппы W135 за исключением того, что повторяющееся звено дисахарида включает глюкозу вместо галактозы [$\rightarrow 4$]-D-NeuP5Ac(7/9OAc)- α -(2 \rightarrow 6)-D-Glc- α -(1 \rightarrow). Капсульный сахарид H.influenzae типа b - это полимер рибозы, рибита и фосфата ['PRP', (поли-3- β -D-рибоза-(1,1)-D-рибитол-5-фосфат)].

Другие предпочтительные сахаридные антигены - это эукариотические антигены, например грибковые сахариды, растительные сахариды, человеческие сахариды (например, раковые антигены) и т.д. Другие предпочтительные сахариды - это липополисахариды и липоолигосахариды.

Сахаридный антиген может находиться в природной форме либо может происходить от, например, сахара, который был подвергнут химическому изменению и/или деполимеризации. Изобретение, в частности, пригодно для анализа олигосахаридных фрагментов капсульных полисахаридов. Природные полисахариды в основном имеют степень полимеризации по меньшей мере 20 (например, 20, 30, 40, 50, 60 или больше), и они могут быть превращены в олигосахаридные фрагменты (например, со степенью полимеризации менее 20) с помощью деполимеризации, например, гидролизом.

Химический гидролиз сахаридов в основном включает обработку либо кислотой, либо основанием в стандартных условиях. Условия для деполимеризации капсульных сахаридов до составляющих их моносахаридов известны в этой области. Для сахаридов серогрупп W135 и Y предпочтителен кислотный гидролиз. Кислотный

гидролиз с использованием ТФУ (трифторуксусной кислоты) может быть использован для гидролиза всех серогрупп C, W135 и Y, при этом для серогруппы C предпочтительна слегка более низкая температура инкубации, чтобы избежать деградации ее сиаловых кислот (90°C, а не 100°C). Типичная обработка ТФУ включает добавление ТФУ до конечной концентрации 2 М с последующим нагреванием до 90-100°C в течение 90 минут. Сахарид серогруппы C может быть гидролизован для анализа общего содержания сахаридов обработкой 100 мМ HCl при 80°C в течение 2 часов [11]. Другие типичные условия гидролиза включают миллимолярные концентрации слабой кислоты (например, уксусной кислоты) при повышенных температурах (например, 70-90°C).

Изобретение особенно полезно для использования с образцами конъюгатов, которые включают различные сахарины разных длин, например разные фрагменты одного и того же исходного сахарида.

15 Конъюгаты

Сахаридный антиген, который следует проанализировать, конъюгируют с носителем. Ковалентное конъюгирование используется для усиления иммуногенности сахаридов путем превращения их из Т-независимых антигенов в Т-зависимые антигены, обеспечивая, таким образом, примирение иммунологической памяти. Конъюгирование особенно полезно для педиатрических вакцин и является хорошо известным методом [описан, например, в ссылках с 12 по 21]. Сахарины могут пришиваться к носителям напрямую [22, 23], если не используются основные линкеры или спенсеры, например адипиновая кислота, β-пропионамидные [24], нитрофенил-этиламинные [25], галоацил галоидные [26], гликозидные связи [27], 6-аминокапроновая кислота [28], антидиуретический гормон [29], C₄-C₁₂ компоненты [30] и т.д.

Типичными белками-носителями в конъюгатах являются бактериальные токсины и анатоксины, такие как дифтерийный анатоксин или столбнячный анатоксин.

Производное дифтерийного токсина CRM197 [31-33] является белком-носителем в Menjugate™ и Meningitec™, тогда как столбнячный анатоксин используется в NeisVac™. Дифтерийный анатоксин используется в качестве носителя в Menacra™. CRM197 является белком-носителем в Prevnar™. Другие известные белки-носители включают белок внешней мембранны N.meningitidis [34], синтетические пептиды [35, 36], белки теплового шока [37, 38], коклюшные белки [39, 40], цитокины [41], лимфокины [41], гормоны [41], факторы роста [41], искусственные белки, включающие множественные эпитопы человеческих CD4⁺ Т-клеток из различных антигенов патогенного происхождения [42], белок D из H.influenzae [43, 44], белок поверхности пневмококка PspA [45], белки захвата железа [46], токсин A или B из C.difficile [47] и т.д. Композиции могут использовать более одного белка-носителя, например, для уменьшения риска подавления носителя, а один белок-носитель может нести более одного сахаридного антигена [48]. В основном, конъюгаты имеют соотношение сахарид:белок (по массе) между 1:5 (т.е. избыток белка) и 5:1 (т.е. избыток сахара). Композиции могут включать свободный белок-носитель дополнительно к конъюгатам [49].

Изобретение особенно подходит для анализа конъюгатов менингококковых сахаридов (серогруппы A, C, W135 и Y) с носителем CRM197. Такие конъюгаты могут быть приготовлены методами, раскрытыми в ссылках 50-53. Предпочтительными являются конъюгаты, приготовленные по ссылке 51, т.е. фрагменты олигосахаридов с носителем CRM197 и линкером на основе адипиновой кислоты.

Гель-проникающая хроматография

Гель-проникающая хроматография (GPC) является широко известным и стандартным методом. Изобретение в основном использует HPGPC (высокоэффективную GPC). Методы GPC используются по изобретению для определения гидродинамического размера (в смеси, средний размер и/или распределение размеров) конъюгата в образце.

Время удерживания на GPC колонке может быть преобразовано в радиус вязкости ($R\eta$) с помощью стандартных методов. Обычно время удерживания определяется для стандартов известного молекулярного размера, что обеспечивает корреляцию этих двух параметров. Молекулярный размер конъюгата можно затем вывести из его времени удерживания на колонке. Например, калибровка колонки, используя декстраны известного молекулярного размера, и их времена удерживания могут быть соотнесены с радиусом вязкости, используя полиномиальное уравнение третьего порядка [54, 55]. Радиус вязкости использует внутреннюю вязкость и молекулярную массу для объяснения эффекта, что форма молекулы влияет на удерживание.

В гетерогенной смеси метод GPC может быть использован для определения как среднего молекулярного размера, так и распределения молекулярного размера в смеси. SEC-MALS

Эксклюзационная хроматография (SEC) является широко известным методом. Результаты разделения могут быть проанализированы фотометрией многоуглового рассеяния света (MALS) и дифференциальной рефрактометрией. Этот метод может обеспечить информацией по распределению молярной массы и гидродинамического радиуса (молекулярного размера), конформации и другим физическим параметрам полимера, независимым от хроматографических параметров, таких как скорость потока и неподвижная фаза, и ненуждающимся в калибровке по молярной массе [9]. В отличие от необходимости калибровать по молярной массе, определение молекулярной массы с помощью MALS основано на предварительном определении специфического коэффициента преломления (dn/dc) для интересующего полимера в интересующем растворителе на интересующей длине волн и при интересующей температуре.

SEC-MALS может быть использован для определения молярной массы конъюгата. Молярная масса образца определяется на каждом участке данных SEC пика, как видно из типичного графика Дебая, при этом молярная масса определяется из отрезка графика, отсекаемого на координатной оси [56-58]. Сигнал коэффициента преломления, пропорциональный концентрации, и сигнал 90° MALS, пропорциональный концентрации и молярной массе, могут быть наложены друг на друга для определения распределений молярной массы.

В гетерогенной смеси метод SEC-MALS может быть использован для определения как средней молярной массы, так и распределения молярной массы (полидисперсности) в смеси.

Композиции конъюгатов

Изобретение обеспечивает композицию, содержащую конъюгат капсулного сахарида из серогруппы A N.meningitidis, где молекулярный размер конъюгата 57.1 Å и/или молярная масса конъюгата 88.5 кДа. Композиция может также включать конъюгат капсулного сахарида из серогруппы A N.meningitidis, где молярная масса конъюгата 190 кДа.

Изобретение обеспечивает композицию, содержащую конъюгат капсулного

сахарида из серогруппы С N.meningitidis, где молекулярный размер конъюгата 57.0 Å и/или молярная масса конъюгата 85.2 кДа.

Изобретение обеспечивает композицию, содержащую конъюгат капсульного сахарида из серогруппы W135 N.meningitidis, где молекулярный размер конъюгата 68.7 Å и/или молярная масса конъюгата 110.1 кДа. Композиция может также включать конъюгат капсульного сахарида из серогруппы W135 N.meningitidis, где молярная масса конъюгата 347 кДа.

Изобретение обеспечивает композицию, содержащую конъюгат капсульного сахарида из серогруппы Y N.meningitidis, где молекулярный размер конъюгата 63.3 Å и/или молярная масса конъюгата 84.7 кДа. Композиция может также включать конъюгат капсульного сахарида из серогруппы Y N.meningitidis, где молярная масса конъюгата 486 кДа.

Несмотря на то что значения молекулярного размера и молярной массы даны как отдельные числа, изобретение распространяется на конъюгаты, у которых эти числа составляют ±20%, ±15%, ±10%, ±5%, ±2% и т.д.

Изобретение также обеспечивает композицию, содержащую два или более (т.е. 2, 3 или 4) конъюгатов серогрупп A, C, W 135 и Y, как описано выше.

Изобретение также обеспечивает способ приготовления поливалентной конъюгатной вакцины, включающий стадии (а) анализа двух или более конъюгатов, используя способ по изобретению, и (б) комбинирование проанализированных конъюгатов для получения поливалентной вакцины.

Изобретение также обеспечивает способ приготовления поливалентной конъюгатной вакцины, включающий стадии смешивания двух или более конъюгатов, которые были проанализированы, используя метод по изобретению.

Смешанные сахарины

Изобретение делает возможным анализ в композициях, которые включают конъюгаты капсульных сахариев. В основном, изобретение следует использовать для образцов, содержащих один тип конъюгата (например, сахарины, полученные из одного и того же капсульного сахарида, пришитые к одному и тому же носителю). Поэтому для поливалентных вакцин (например, MenactraTM, PrevnarTM) изобретение в основном следует использовать на отдельных конъюгатах до того, как они будут комбинированы для получения конечного поливалентного продукта, а не на самом конечном продукте. Если два конъюгата имеют очень различающиеся молекулярные размеры и молярные массы, то в таком случае следует проводить параллельный анализ.

Стабильность во время хранения

Изобретение может быть использовано для контроля стабильности конъюгатов во время хранения. Таким образом, способы по изобретению могут быть применены для образцов из одного и того же материала в момент времени t1 и t2, а результаты анализа можно сравнить. Значительное изменение молярной массы и/или молекулярного размера указывает на то, что вакцина не совсем стабильна. Таким образом, изобретение может быть использовано для выбора стабильных вакцин и отклонения нестабильных вакцин.

Неконъюгатные компоненты

Наряду с анализом конъюгатов в композиции, способы изобретения могут включать анализ других компонентов или свойств, например осмотического давления, pH, степени полимеризации отдельных сахариев или конъюгатов, содержания белка (особенно для белков-носителей), содержания алюминия, содержания детергента,

содержания консерванта и т.д.

Изобретение обеспечивает способ приготовления композиции вакцины, включающий стадию анализа молярной массы и/или молекулярного размера конъюгата по изобретению и стадию измерения pH композиции, за которой при необходимости следует стадия приведения pH композиции к желаемому значению, например, между 6 и 7 или около 7.

Изобретение также обеспечивает метод приготовления композиции вакцины, включающий стадии: (a) подготовку одного или более конъюгатов, как описано выше; (b) приготовление из конъюгата(конъюгатов) стоковой вакцины (bulk vaccine); (c) анализ стоковой вакцины на pH и/или другие свойства; и, если результаты стадии (c) показывают, что стоковая вакцина применима для клинического использования, (d) приготовление и упаковка вакцины из стока для использования на людях. Стадия (c) может включать оценку минимальной концентрации сахарида, оценку соотношения неконъюгированный:конъюгированный сахарид и т.д. Стадия (d) может включать упаковку в форму единичной дозы или в форму многократной дозы, например в пузырьки или в шприцы. Очная доза на человека для инъекции имеет объем 0.5 мл.

Изобретение также обеспечивает способ приготовления композиции вакцины, включающий стадии: (a) подготовку одного или более конъюгатов, как описано выше; и (b) смещивание конъюгированного сахарида с одним или более дополнительными антигенами, например, с

- капсульным сахаридным антигеном серогруппы C N.meningitidis;
- капсульным сахаридным антигеном серогруппы A N.meningitidis;
- белковым антигеном серогруппы B N.meningitidis;
- препаратами микровезикул N.meningitidis серогруппы B [59], 'нативными OMV' (везикулами внешней мембранны) [60], пузырьками или везикулами внешней мембранны [например, ссылки с 61 по 66 и т.д.];
- сахаридным антигеном из Haemophilus influenzae тип b;
- антигеном из Streptococcus pneumoniae, таким как поливалентные конъюгированные сахаридные антигены [например, ссылки с 67 по 69];
- антигеном из вируса гепатита А, таким как инактивированный вирус [например, 70, 71];

- антигеном из вируса гепатита В, таким как поверхностный антиген и/или антиген сердцевины [например, 71, 72];

- антигеном из Bordetella pertussis, таким как коклюшный холотоксин (PT) и филаментный гемагглютинин (FHA) из B.pertussis, при необходимости в сочетании с пертактином и/или агглютиногенами 2 и 3 [например, ссылки 73 и 74]. Могут быть использованы клеточные коклюшные антигены;

- антигеном дифтерии, таким как дифтерийный анатоксин [например, глава 3 ссылки 75], например мутантный CRM₁₉₇ [например, 76];

- антигеном столбняка, таким как столбнячный анатоксин [например, глава 4 ссылки 75];

- антигеном(антigenами) полиомиелита [например, 77, 78], такими как IPV (инактивированная полiovакцина).

Такие антигены могут быть адсорбированы на адьювант - соль алюминия (например, гидроксид или фосфат), или они могут быть неадсорбированными (например, свободными в растворе).

Групповая совместимость

Способы изобретения надежны и совместимы и, следовательно, делают

возможными адекватные сравнения различных групп конъюгатов. Таким образом, различные группы конъюгатов могут быть получены, исследованы, и совместимые группы могут быть отобраны для выделения и использования в приготовлении конъюгатных вакцин, тогда как аберрантные группы могут быть отклонены.

Изобретение обеспечивает две группы вакцины, где: (а) обе группы вакцины содержат (i) конъюгат капсулного сахарида серогруппы A *Neisseria meningitidis*; (ii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы C *Neisseria meningitidis*; (iii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы W135 *Neisseria meningitidis*, (iv) конъюгат капсулного сахарида серогруппы Y *Neisseria meningitidis*; (b) молекулярный размер сахарида серогруппы A в первой группе составляет A_1 , а молекулярный размер сахарида серогруппы A во второй группе составляет A_2 ; (c) молекулярный размер сахарида серогруппы C в первой группе составляет C_1 , а молекулярный размер сахарида серогруппы C во второй группе составляет C_2 ; (d) молекулярный размер сахарида серогруппы W135 в первой группе составляет W_1 , а молекулярный размер сахарида серогруппы W135 во второй группе составляет W_2 ; (e) молекулярный размер сахарида серогруппы Y в первой группе составляет Y_1 , а молекулярный размер сахарида серогруппы Y во второй группе составляет Y_2 , (f) соотношения A_1/A_2 , C_1/C_2 , W_1/W_2 и Y_1/Y_2 каждое составляет величину между 0.90 и 1.10, а предпочтительно между 0.95 и 1.05.

Изобретение обеспечивает две группы вакцины, где: (а) обе группы вакцины содержат (i) конъюгат капсулного сахарида серогруппы A *Neisseria meningitidis*; (ii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы C *Neisseria meningitidis*; (iii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы W135 *Neisseria meningitidis*; (iv) конъюгат капсулного сахарида серогруппы Y *Neisseria meningitidis*; (b) молярная масса сахарида серогруппы A в первой группе составляет A_1 , а молярная масса сахарида серогруппы A во второй группе составляет A_2 ; (c) молярная масса сахарида серогруппы C в первой группе составляет C_1 , а молярная масса сахарида серогруппы C во второй группе составляет C_2 ; (d) молярная масса сахарида серогруппы W135 в первой группе составляет W_1 , а молярная масса сахарида серогруппы W135 во второй группе составляет W_2 ; (e) молярная масса сахарида серогруппы Y в первой группе составляет Y_1 , а молярная масса сахарида серогруппы Y во второй группе составляет Y_2 ; (f) соотношения A_1/A_2 , C_1/C_2 , W_1/W_2 и Y_1/Y_2 каждое составляет величину между 0.90 и 1.10, а предпочтительно между 0.95 и 1.05.

Соотношения, указанные в (f), могут быть основаны на сравнении одного образца из каждой группы, но обычно они основываются на средних значениях (например, средних) от нескольких образцов из каждой группы. Таким образом, у двух групп могут быть взяты несколько образцов, и каждый образец может быть подвергнут нескольким измерениям A_1 , A_2 , C_1 , C_2 , W_1 , W_2 , Y_1 , Y_2 , при этом для каждой группы вычисляются средние значения, а средние значения используются для вычисления необходимых соотношений.

Каждая группа (или лот) вакцины готовится отдельно. Например, две группы могут быть приготовлены путем раздельных смешиваний одних и тех же стоков отдельных конъюгатов или путем смешивания стоков отдельных конъюгатов, приготовленных раздельно. Различные образцы одной и той же стоковой смеси не являются различными группами, поскольку эти образцы не подвергаются варьированию между группами, что происходит из различий, появляющихся при приготовлении смесей различных конъюгатов.

Общие положения

Термин «содержащий» включает в себя «включающий», так же как «состоящий», например, композиция, «содержащая» X, может состоять исключительно из X, а может включать что-то дополнительно, например X+Y.

5 Термин «по существу» не исключает «полностью», например композиция, которая «по существу не содержит» Y, может полностью не содержать Y. Где необходимо, термин «по существу» может быть опущен из формулировки изобретения.

Термин «около» в отношении числах x означает, например, $x \pm 10\%$.

Краткое описание чертежей

10 Фиг.1 показывает калибровочную кривую шести декстранов известных гидродинамических размеров.

Фиг.2-5 показывают HPGPC анализ CRM197 конъюгатов из серогрупп A, C, W135 и Y.

15 Фиг.6 показывает приведенное выходное напряжение известных концентраций для калибровки dn/dc на Фиг.7 и 8.

Фиг.9 показывает график Дебая из анализа SEC-MALS, а Фиг.10 показывает наложение сигнала R1 и сигнала 90° MALS.

20 Фиг.11-14 показывают анализы молярной массы с помощью SEC-MALS для CRM197 конъюгатов из серогрупп A, C, W135 и Y.

Варианты осуществления изобретения

CRM197 конъюгаты олигосахаридов серогрупп A, C, W135 и Y менингококка были приготовлены по общему описанию в ссылке 51. Каждый из этих конъюгатов был проанализирован с помощью HPGPC и SEC-MALS по изобретению.

25 HPGPC анализ

Гликоконъюгатные вакцины в основном состоят из ряда гликоформ с набором сахаридов разных длин, присоединенных к белковому носителю в разных местах. HPGPC был использован для характеристики менингококковых гликоконъюгатов по 30 молекулярному размеру путем определения их гидродинамического размера и распределения по размерам.

Калибровка использовала ряд из шести декстранов с гидродинамическими размерами в пределах от 17 до 115 Å. HPGPC анализ стандартов показан на Фиг.1.

35 Молекулярные массы стандартов и вычисленные молекулярные массы были следующими:

Стандарт	115360	54130	26000	91840	38560	17590
Вычисленный	115666	53847	25425	91514	39280	17767

40 Анализ декстранов был использован, чтобы соотнести радиус вязкости ($R\eta$) с GPC временем удерживания, используя полиномиальное уравнение третьего порядка [54, 55]:

$$R\eta (\text{в } \text{\AA}) = (10^8)(30 M_p[\eta]/(\pi \times 6.023 \times 10^{23}))^{1/3}$$

45 где M_p = пищевая Mw и $[\eta]$ = внутренняя вязкость в dL/g.

Радиусы вязкости конъюгатов были вычислены по этому уравнению, которое использует внутреннюю вязкость и Mw для объяснения эффекта, что форма молекулы влияет на удерживание.

50 Анализы отдельных конъюгатов показаны на Фиг.2-5. Гидродинамические размеры были вычислены следующим образом:

Серогруппа	A	C	W135	Y
Размер (Å)	57.1	57.0	68.7	63.3
Полидисперсность	1.032	1.018	1.040	1.035

В качестве примера условий анализа конъюгат серогруппы А был проанализирован в 50 мкл объеме инъекции на колонке TSK-Gel G4000SW (300×7,5 мм ID) с подвижной фазой 0.1 М фосфат натрия/0.2 М сульфат аммония, pH 7.0. Скорость потока была 0.5 мл/мин. Использовался детектор коэффициента преломления Waters 410.

SEC-MALS анализ

До SEC-MALS анализа были определены коэффициенты преломления (dn/dc) конъюгатов в условиях анализа. Пример выходного напряжения для ряда концентраций показан на Фиг.6. Этот выход дает стандартные кривые, показанные на Фиг.7 и 8. Вычисленные значения были следующими:

Серогруппа	A	C	W135	Y
dn/dc	0.163	0.190	0.159	0.201

Конъюгаты были проанализированы с помощью SEC-MALS. Молярные массы образцов были определены на каждом участке данных SEC пика, как видно из типичного графика Дебая на Фиг.9. Молярная масса определялась по отрезку, отсекаемому на координатной прямой графика [56-58]. RI сигнал (синий), пропорциональный концентрации, и 90° MALS детектор (красный), пропорциональный концентрации и молярной массе, могут быть наложены (Фиг.10).

Анализы молярной массы (грамм на моль) показаны на Фиг.11-14. Анализы показывают, что гликоконъюгаты MenA, MenW135 и MenY имеют главный пик с плечом низкой концентрации большей M_w , тогда как конъюгат MenC имеет один пик более гомогенного материала.

Результаты анализов пиков (M_w в кДа; полидисперсность в M_w/M_n) были следующими:

		A	C	W135	Y
Главный пик	M_w	88.540	85.230	110.100	84.650
	Полидисперсность	1.012	1.011	1.049	1.050
Плечо	M_w	190.000	-	485.800	347.200
	Полидисперсность	1.053	-	1.090	1.096

Следует понимать, что изобретение было описано только с помощью примеров, и могут быть сделаны модификации, которые при этом останутся в пределах объема и сущности изобретения.

Ссылки (содержание которых включено сюда путем ссылки)

- [1] Vaccines (ред. Plotkin et al.) 4-е издание, ISBN: 0721696880.
- [2] Baker et al. (2003) J Infect Dis 188:66-73.
- [3] Theilacker et al. (2003) Infect Immun 71:3875-84.
- [4] Неизвестный автор (2003) Drugs R D 4:383-5.
- [5] Ravenscroft et al. (1999) Vaccine 17:2802-2816.
- [6] Paoletti et al. (1992) J Clin Invest 89:203-9.
- [7] Anderson et al. (1986) J Immunol 137:1181-6.
- [8] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49.
- [9] D'Ambra et al. (2000) Dev Biol Basel 103:241-242.
- [10] WO 2005/033148.
- [11] Jumel et al. (2002) Biotechnol Appl Biochem 36:219-226.
- [12] Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196.
- [13] Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2: S28-36.
- [14] Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34: 163-168.

- [15] Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 113-133, vii.
- [16] Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47: 563-567.
- [17] Европейский патент 0477508.
- 5 [18] Патент США 5306492.
- [19] WO 98/42721.
- [20] Conjugate Vaccines (ред. Cruse et al.) ISBN 3805549326, особенно том 10: 48-114.
- [21] Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 или 012342335X.
- [22] Патент США 4761283.
- 10 [23] Патент США 4356170.
- [24] WO 00/10599.
- [25] Gever et al. Med. Microbiol. Immunol, 165: 171-288 (1979).
- [26] Патент США 4057685.
- 15 [27] Патенты США 4673574; 4761283; 4808700.
- [28] Патент США 4459286.
- [29] Патент США 4965338.
- [30] Патент США 4663160.
- [31] Неизвестный автор (Янв. 2002) Research Disclosure, 453077.
- 20 [32] Anderson (1983) Infect Immun 39(1): 233-238.
- [33] Anderson et al. (1985) J Clin Invest 76 (1): 52-59.
- [34] EP-A-0372501.
- [35] EP-A-0378881.
- [36] EP-A-0427347.
- 25 [37] WO 93/17712.
- [38] WO 94/03208.
- [39] WO 98/58668.
- [40] EP-A-0471177.
- [41] WO 91/01146.
- 30 [42] Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31: 3816-3824.
- [43] EP-A-0594610.
- [44] WO 00/56360.
- [45] WO 02/091998.
- 35 [46] WO 01/72337.
- [47] WO 00/61761.
- [48] WO 99/42130.
- [49] WO 96/40242.
- 40 [50] WO 02/058737.
- [51] WO 03/007985.
- [52] Rennels et al. (2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979.
- [53] Campbell et al. (2002) J Infect Dis 186:1848-1851.
- [54] Kunitani et al. (1991) J Chrom 588:125ff.
- 45 [55] Kunitani et al. (1993) J Chrom 632:19ff.
- [56] Wyatt (1997) Instrumentation Science & Technology 25(1):1ff.
- [57] Wen et al. (1996) Anal Biochem 240:155ff.
- [58] Rollings (1992) в Laser Light Scattering in Biochemistry, глава 19.
- 50 [59] WO 02/09643.
- [60] Katial et al. (2002) Infect Immun 70:702-707.
- [61] WO 01/52885.
- [62] Европейский патент 0301992.

- [63] Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- [64] Fukasawa et al. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
- [65] WO 02/09746.
- [66] Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333.
- [67] Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- [68] Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
- [69] Jedrzejas (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- [70] Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
- [71] Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
- [72] Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Suppl: S63-68 & 79-80.
- [73] Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
- [74] Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.
- [75] Vaccines (1988) ред. Plotkin и Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [76] Del Guidice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- [77] Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
- [78] Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.

Формула изобретения

1. Композиция для производства вакцин против *Neisseria meningitidis*, содержащая конъюгат капсулного сахарида серогруппы А *N. meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $57.1\pm2\text{ \AA}$ и/или молярная масса конъюгата составляет $88.5\pm2\text{ кДа}$.

2. Композиция для производства вакцин против *Neisseria meningitidis*, содержащая конъюгат капсулного сахарида серогруппы W135 *N.meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $68.7\pm2\text{ \AA}$ и/или молярная масса конъюгата составляет $110.1\pm2\text{ кДа}$.

3. Композиция для производства вакцин против *Neisseria meningitidis*, содержащая конъюгат капсулного сахарида серогруппы Y *N.meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $63.3\pm2\text{ \AA}$ и/или молярная масса конъюгата составляет $84.7\pm2\text{ кДа}$.

4. Композиция для производства вакцин против *Neisseria meningitidis*, содержащая два или более конъюгат, как определено в пп.1-3.

5. Вакцина против *Neisseria meningitidis*, содержащая: (i) конъюгат капсулного сахарида серогруппы А *Neisseria meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $57.1\pm2\text{ \AA}$; (ii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы С *Neisseria meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $57.0\pm2\text{ \AA}$; (iii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы W135 *Neisseria meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $68.7\pm2\text{ \AA}$; (iv) конъюгат капсулного сахарида серогруппы Y *Neisseria meningitidis*; с белком-носителем CRM197, где молекулярный размер конъюгата составляет $63.3\pm2\text{ \AA}$.

6. Вакцина против *Neisseria meningitidis*, содержащая (i) конъюгат капсулного сахарида серогруппы А *Neisseria meningitidis* с белком-носителем CRM M197, где молярная масса конъюгата составляет $88.5\pm2\text{ кДа}$; (ii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы С *Neisseria meningitidis* с белком-носителем CRM 197, где молярная масса конъюгата составляет $85.2\pm2\text{ кДа}$; (iii) конъюгат капсулного сахарида серогруппы W135 *Neisseria meningitidis*; с белком-носителем CRM197, где молярная масса конъюгата составляет $110.1\pm2\text{ кДа}$; (iv) конъюгат капсулного

сахарида серогруппы Y *Neisseria meningitidis* с белком-носителем CRM197, где молярная масса коньюгата составляет 84,7±2% кДа.

5

10

15

20

25

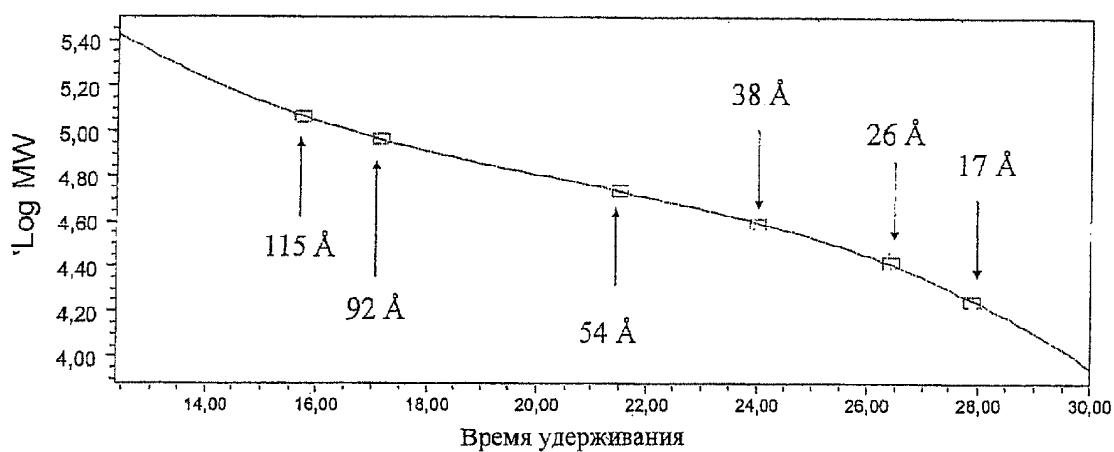
30

35

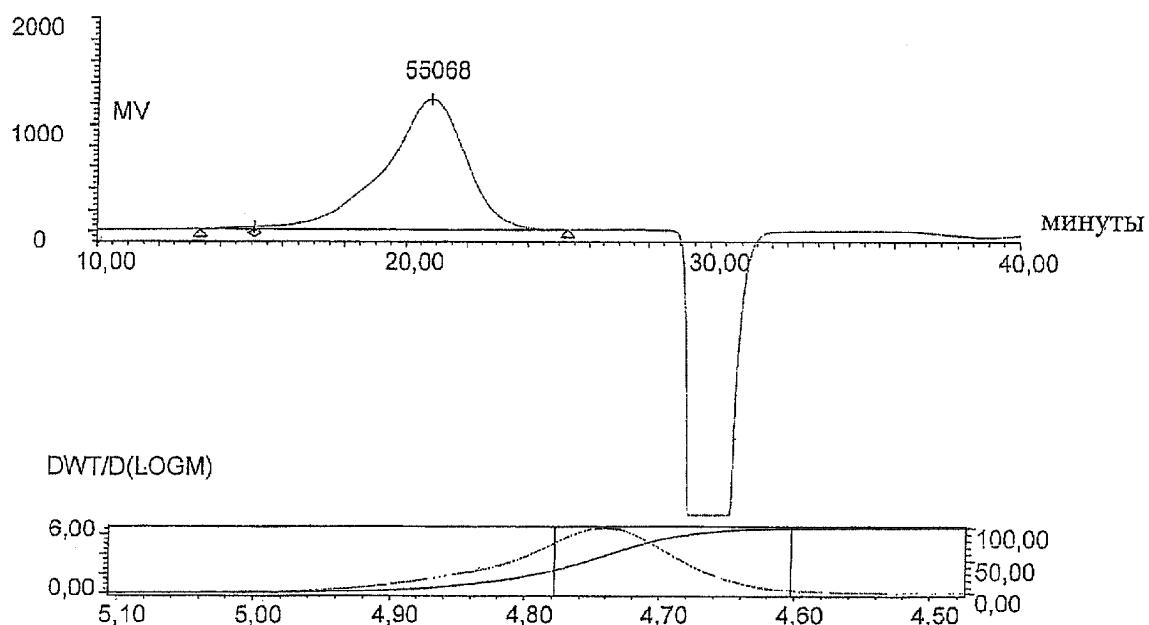
40

45

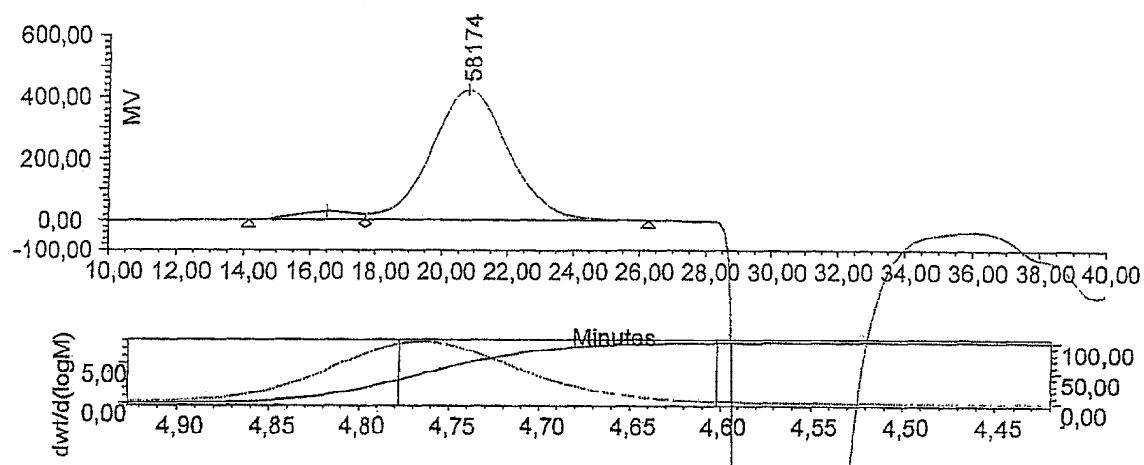
50



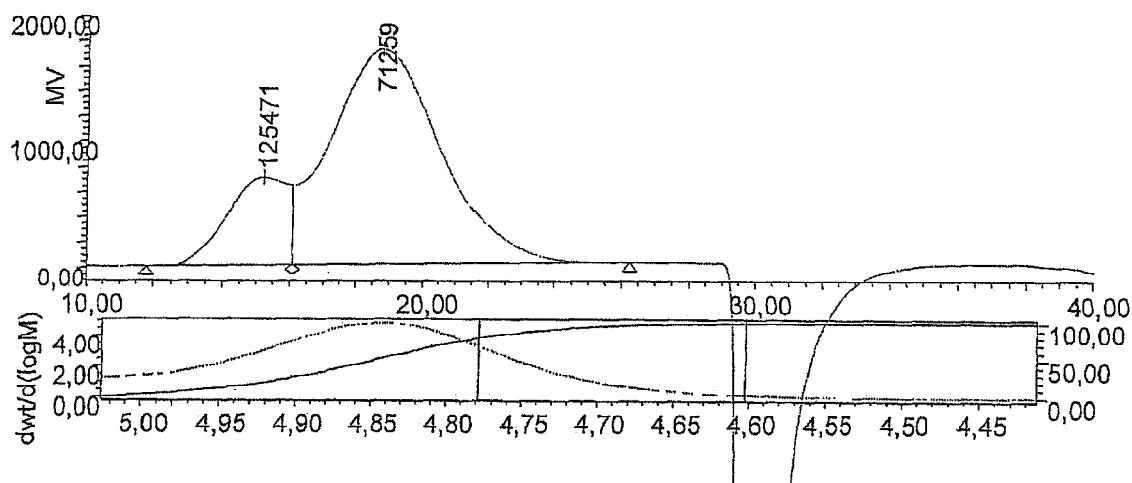
Фиг. 1



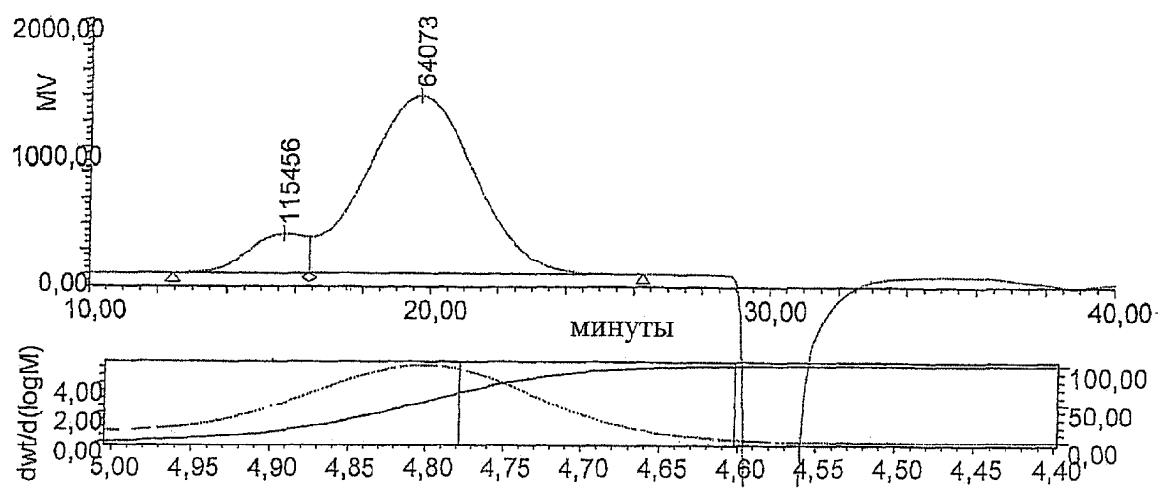
Фиг. 2



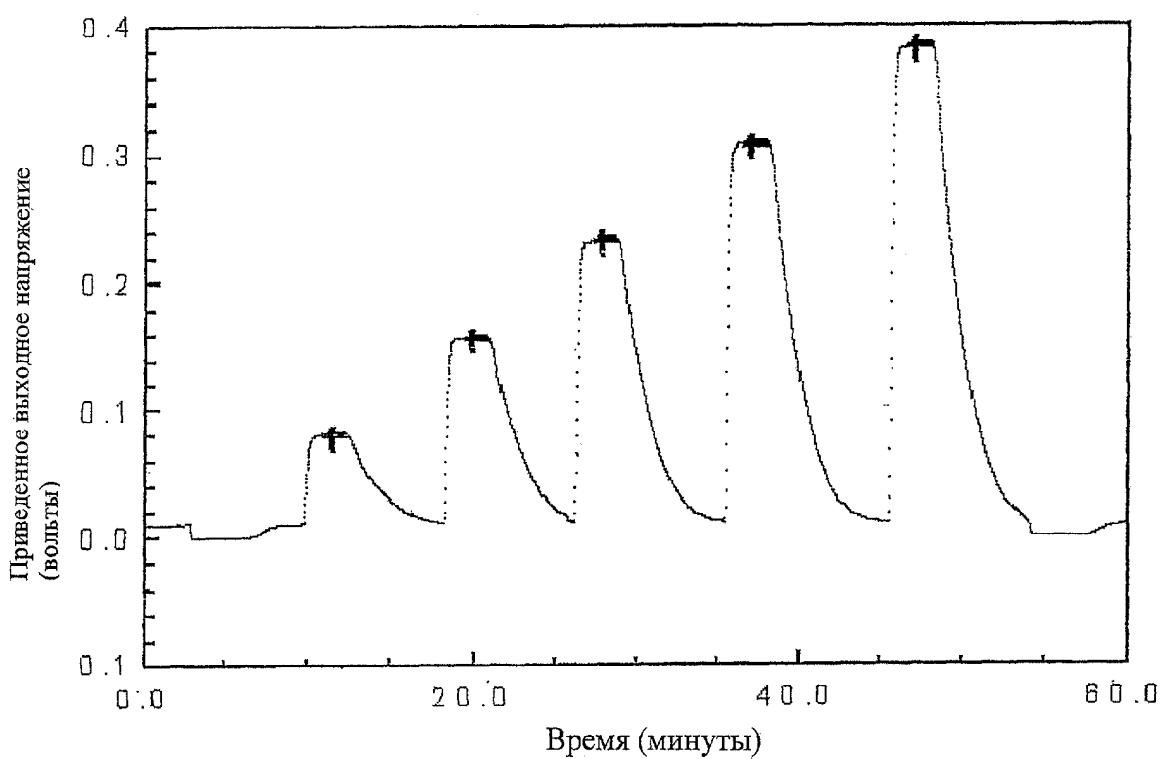
Фиг. 3



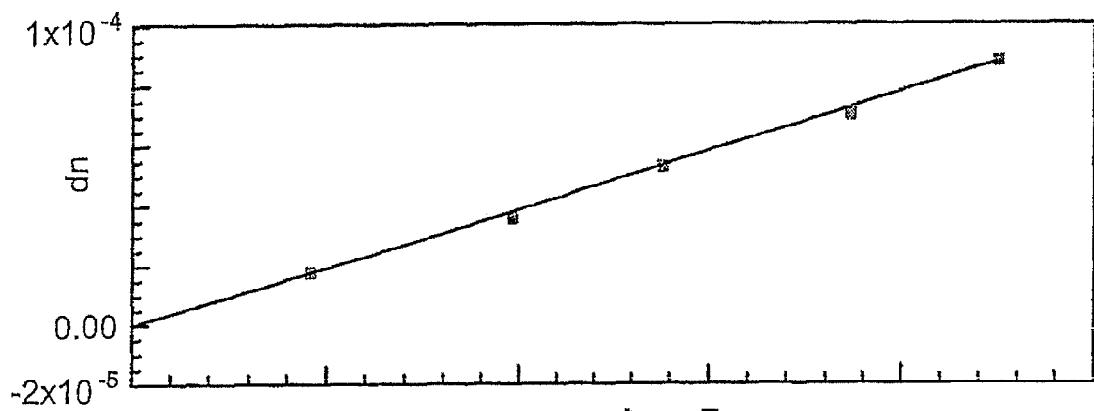
Фиг. 4



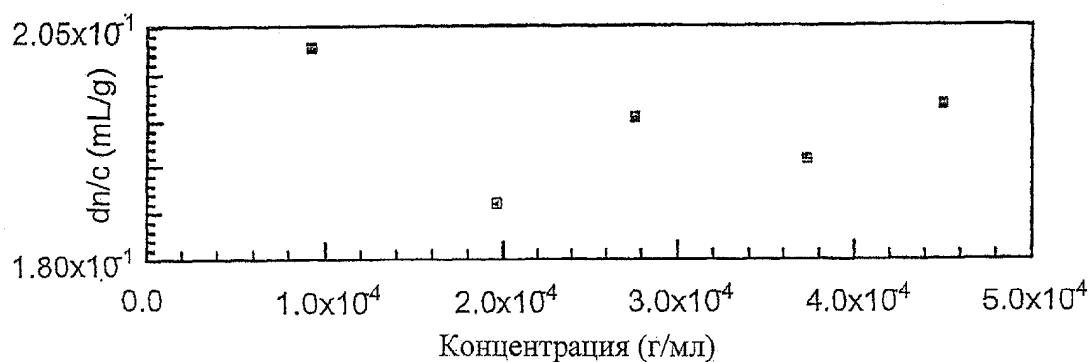
Фиг. 5



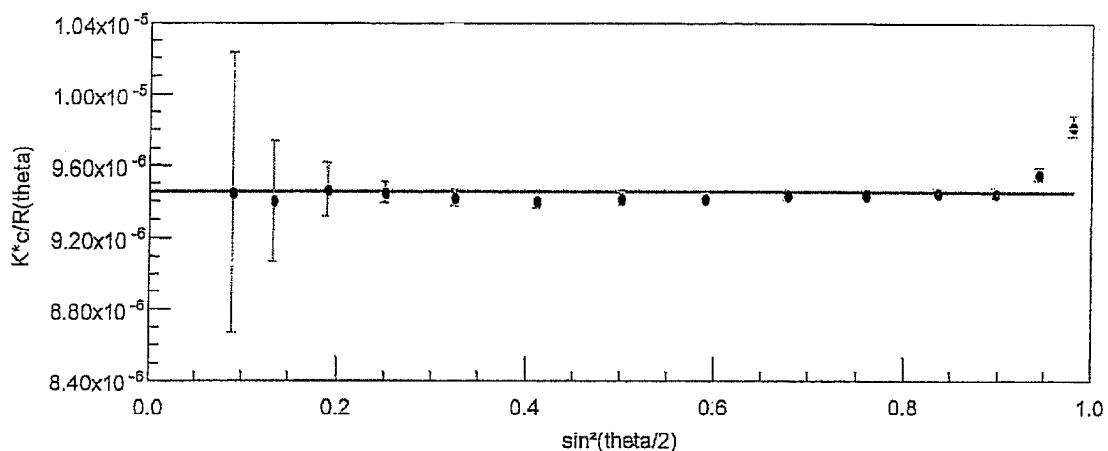
Фиг. 6



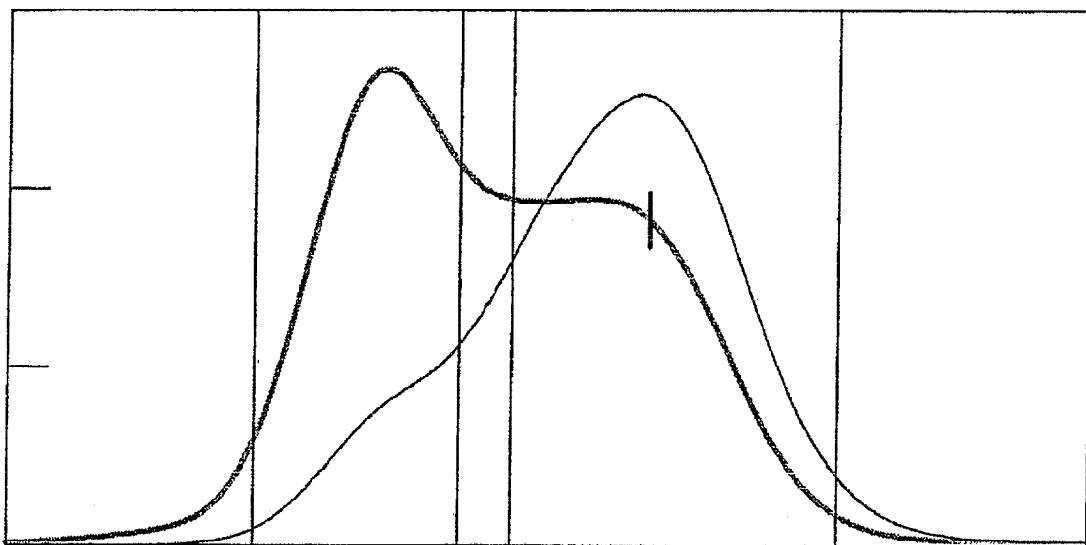
Фиг. 7



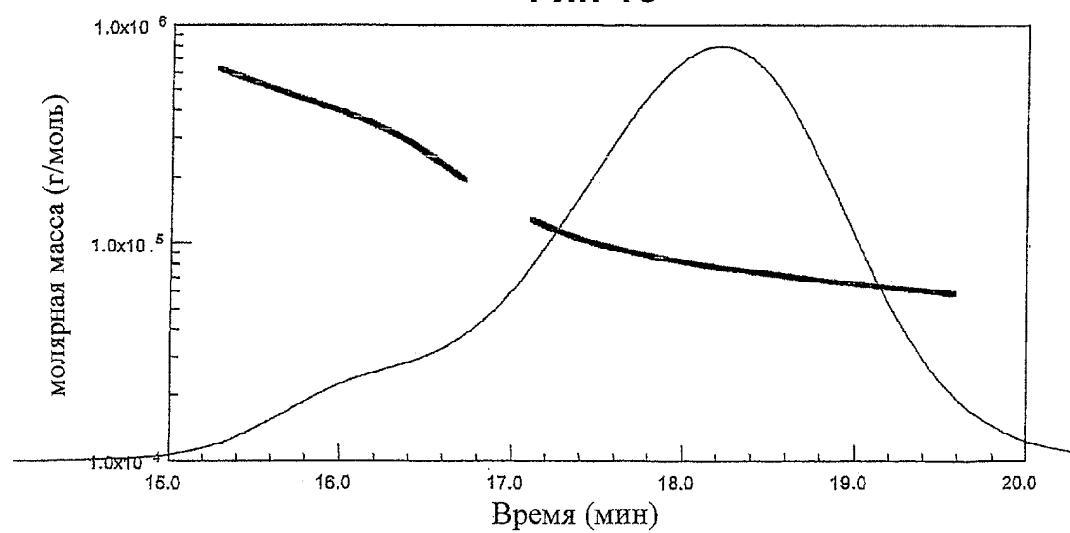
Фиг. 8



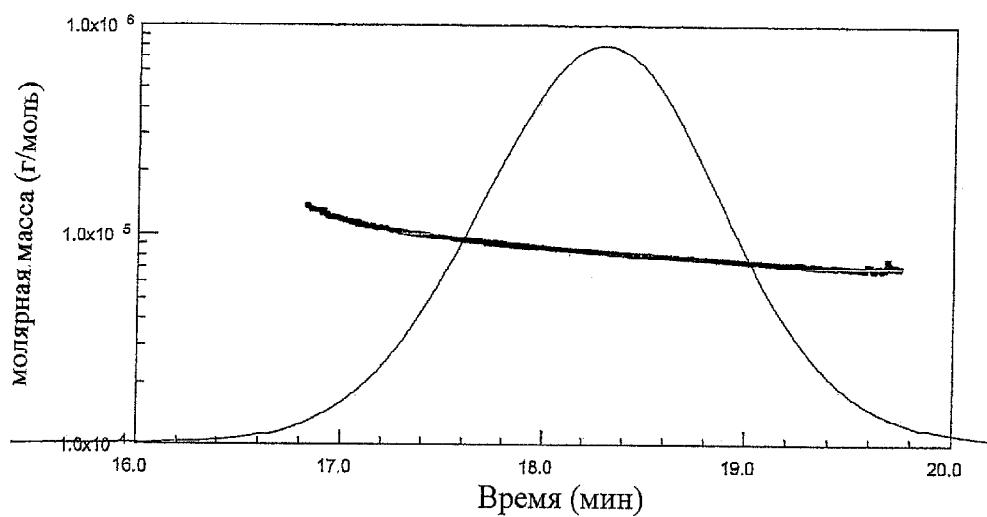
Фиг. 9



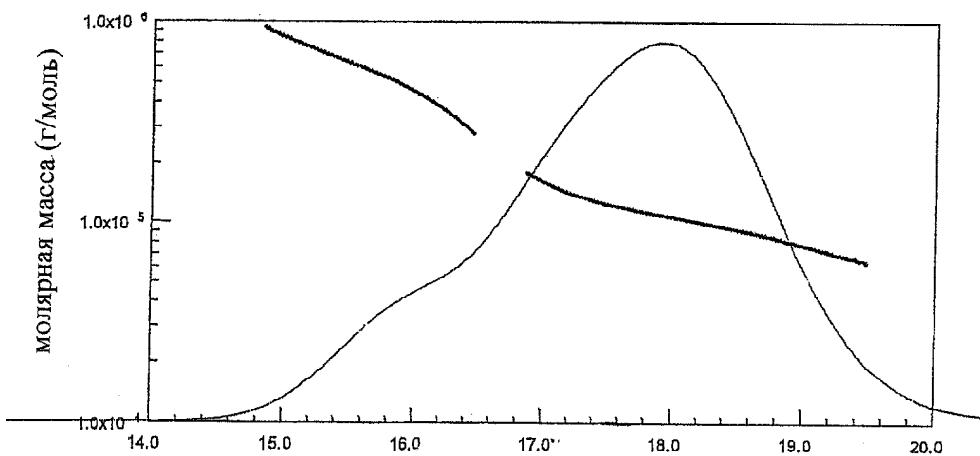
Фиг. 10



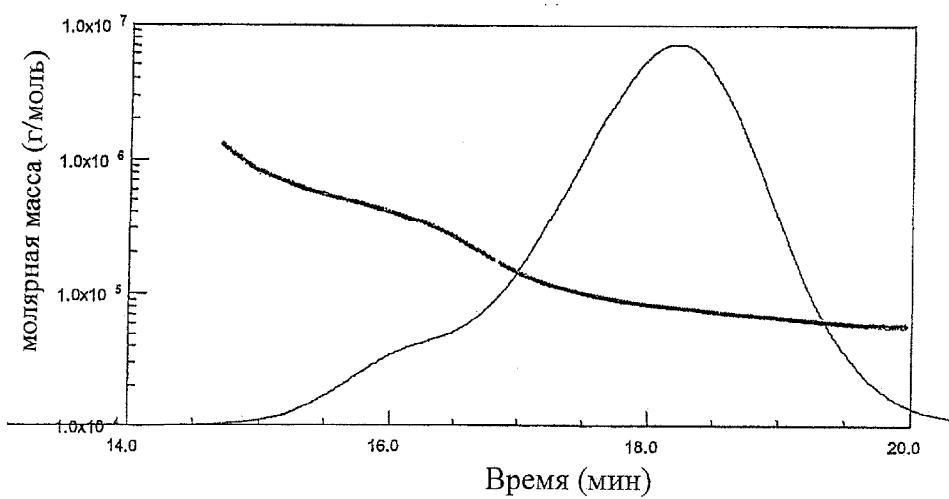
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14