



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 128603

(13) C2

(51) МПК

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

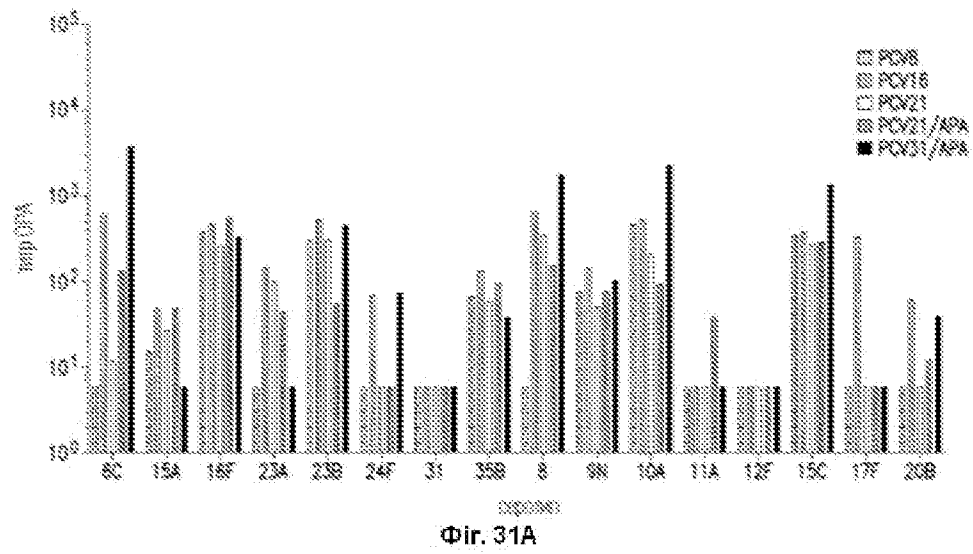
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2020 04012	(72) Винахідник(и):	Сміт Вільям Дж. (US), МакГью Патрік (US), Вінтерз Майкл Алберт (US), Скіннер Джулі М. (US), Ге Цзянь (US), Мусей Луві (US), Абейгунавардана Чітрананда (US), Цуй Ядун Адам (US), Косинські Майкл Дж. (US)
(22) Дата подання заявки:	04.12.2018	(73) Володілець (володільці):	МЕРК ШАРП ЕНД ДОУМ ЕЛЕЛСІ, 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	29.08.2024	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/595,388	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	CN 103656631 A1, 26.03.2014 WO 2017/173415 A2, 05.10.2017
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	06.12.2017		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.11.2020, Бюл.№ 21		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	28.08.2024, Бюл.№ 35		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2018/063709, 04.12.2018		

(54) ПОЛІВАЛЕНТНА ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ПРОТИ ПНЕВМОКОКОВОГО ЗАХВОРЮВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, які містять відмінні кон'югати полісахаридів з білком. Кожний кон'югат складається з капсульного полісахариду, отриманого з іншого (відмінного) серотипу *Streptococcus pneumoniae*, кон'югованого з білком-носієм CRM197. Імуногенні композиції забезпечують широкий спектр дії проти пневмококового захворювання.

UA 128603 C2



ПЕРЕХРЕСТНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Незастосовне

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даній винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, які містять відмінні кон'югати полісахаридів з білком. Кожний кон'югат складається з капсульного полісахариду, отриманого з іншого (відмінного) серотипу *Streptococcus pneumoniae*, кон'югованого з білком-носієм, переважно CRM197. Імуногенні композиції забезпечують широкий спектр дії проти пневмококового захворювання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Streptococcus pneumoniae є грампозитивною бактерією і найбільш поширеною причиною інвазивних бактеріальних захворювань (таких як пневмонія, бактеріємія, менінгіт і середній отит) у немовлят і дітей молодшого віку. Пневмокок інкапсульований хімічно зшитим полісахаридом, який додає специфічності серотипу. Існує більше 90 відомих серотипів пневмококів, і капсула є основним чинником, що визначає вірулентність пневмококів, оскільки капсула не тільки захищає внутрішню поверхню бактерій від комплементу, але сама по собі є слабо імуногенною. Полісахариди є Т-незалежними антигенами і, в більшості випадків, не можуть бути процесовані або презентовані молекулами МНС для взаємодії з Т-клітинами. Однак вони можуть стимулювати імунну систему через альтернативний механізм, який включає перехресне зв'язування поверхневих рецепторів на В-клітинах.

Полівалентні пневмококові полісахаридні вакцини, ліцензовані протягом багатьох років, довели свою цінність в профілактиці пневмококових захворювань у дорослих, особливо немолодих людей і осіб з високим ризиком. Однак немовлята і діти молодшого віку погано реагують на некон'юговані пневмококові полісахариди. Пневмококова кон'югатна вакцина Pnevna®[®], що містить 7 серотипів, що найчастіше виділяються (4, 6В, 9V, 14, 18С, 19F і 23F), що спричиняють інвазивне пневмококове захворювання у дітей молодшого віку і немовлят, була уперше ліцензована в США в лютому 2000 р. Після повсюдного використання препарату Pnevna®[®] в США сталося значне зниження кількості випадків інвазивного пневмококового захворювання у дітей, що викликається серотипами, присутніми в Pnevna®[®]. Див. Центри з контролю і профілактики захворювань, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7. Проте, Pnevna®[®] має обмежене охоплення серотипів в деяких регіонах світу, до того ж є свідчення появи в США деяких нових серотипів (наприклад, 19А і інші). Див. O'Brien et al., 2004, Am J Epidemiol 159:634-44; Whitney et al., 2003, N Engl J Med 348:1737-46; Kyaw et al., 2006, N Engl J Med 354:1455-63; Hicks et al., 2007, J Infect Dis 196:1346-54; Traore et al., 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189.

У публікації заявки на патент США №. US 2006/0228380 описана 13-валентна пневмококова полісахарид-білкова кон'югатна вакцина, що включає серотипи 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19А, 19F і 23F. У публікації заявки на патент Китаю №. CN 101590224 А описана 14-валентна пневмококова полісахарид-білкова кон'югатна вакцина, що включає серотипи 1, 2, 4, 5, 6А, 6В, 7F, 9N, 9V, 14, 18С, 19А, 19F і 23F.

Інші PCV включають 7, 10, 11 або 13 серотипів, що містяться в PCV-15 (публікація заявки на патент США 2011/0195086), але відносно деяких серотипів спостерігалася імунна інтерференція (наприклад, нижчий захист для серотипу 3 в PCV-11 GSK), і нижчі показники відповіді на серотип 6В в PCV-13 Pfizer (PREVNAR® 13). Див. Prymula et al., 2006, Lancet 367:740-48 і Kieninger et al., Safety і Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants і Toddlers, presented at the 48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC, October 25-28, 2008.

Сучасні полівалентні пневмококові вакцини ефективні в зниженні частоти пневмококових захворювань, пов'язаних з серотипами, присутніми у вакцинах. Проте, поширеність пневмококів, які експресують серотипи, не присутні в доступних в цей час вакцинах, збільшується. Відповідно, існує потреба в додаткових композиціях пневмококових вакцин, які забезпечують захист від різних наборів пневмококових серотипів і які можуть забезпечувати додатковий захист від пневмококових серотипів, не присутніх в доступних в цей час вакцинах.

СУТЬ ВІНАХОДУ

Винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, що містять кон'югати полісахариду *S. pneumoniae* з білком (*S. pneumoniae* полісахарид-білкові кон'югати), де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* є такими, як визначено в даній заявці.

У конкретних варіантах здійснення винаходу серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

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

У додаткових конкретних варіантах здійснення винаходу серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

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

У додаткових конкретних варіантах здійснення винаходу серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

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

У деяких варіантах здійснення набір серотипів *S. pneumoniae*, перерахованих в а), b) або c), додатково містить серотип 6C, серотип 6A або серотипи 6A і 6B.

У деяких варіантах здійснення щонайменше один з полісахарид-білкових кон'югатів утворюється в результаті реакції кон'югації, що містить апротонний розчинник, наприклад диметилсульфоксид (ДМСО). У конкретних варіантах здійснення кожний з полісахарид-білкових кон'югатів утворюється в результаті реакції кон'югації, що містить апротонний розчинник. Як показано в даному описі, використання ДМСО як розчинник під час відновного амінування полісахарид-білкових кон'югатів забезпечує несподівано високу стабільність і підвищену імуногенність цих серотипів порівняно з тими ж кон'югатами, отриманими у водних умовах.

Винахід також стосується способів індукції захисної імунної відповіді у пацієнта-людини, що включають введення пацієнту полівалентних імуногенних композицій за винаходом. У деяких варіантах здійснення способів за винаходом пацієнт раніше отримував лікування полівалентною пневмококовою вакциною.

Полівалентна імуногенна композиція за винаходом може бути використана як частина схеми лікування іншою комплементарною пневмококовою вакциною. Відповідно, винахід стосується способу індукції захисної імунної відповіді у пацієнта-людини, який включає введення пацієнту полівалентної імуногенної композиції за винаходом, що додатково включає введення пацієнту полівалентної пневмококової вакцини в будь-якому порядку. У конкретних варіантах здійснення полівалентна пневмококова вакцина складається з декількох *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм. У інших варіантах здійснення полівалентна пневмококова вакцина складається з некон'югованих капсульних полісахаридів.

Винахід також стосується способів отримання кон'югата полісахариду серотипу 8 *Streptococcus pneumoniae* з білком за допомогою реакції кон'югації в апротонному розчиннику, де в реакції кон'югації не використовується ціаноборогідрид.

Винахід також стосується полівалентних імуногенних композицій, що містять *S. pneumoniae* полісахарид-білкові кон'югати, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому вибрані серотипи *S. pneumoniae* забезпечують перехресну реактивність з іншими вибраними серотипами.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На фіг. 1 показаний 600 МГц одновимірний ¹H ЯМР-спектр капсульного полісахариду серотипу 6C *S. pneumoniae* в оксиді дейтерію (D₂O) при 50 °C. Відмічені сигнали, зумовлені внутрішніми стандартами (ДМСО і DSS-d₆) і залишковою водою (HOD). Мінорні сигнали, відмічені *, зумовлені залишками клітинної стінки *S. pneumoniae*, такими як C-полісахарид і/або пептидоглікани.

На фіг. 2 показаний 600 МГц одновимірний ¹H ЯМР-спектр капсульного полісахариду серотипу 15A *S. pneumoniae* в оксиді дейтерію (D₂O) при 50 °C. Відмічені сигнали, зумовлені внутрішніми стандартами і залишковою водою (HOD). Мінорні сигнали, відмічені *, зумовлені залишками клітинної стінки *S. pneumoniae*, такими як C-полісахарид і/або пептидоглікани.

На фіг. 3 показаний 600 МГц одновимірний ¹H ЯМР-спектр капсульного полісахариду де-О-ацетилованого серотипу 15B *S. pneumoniae* в оксиді дейтерію (D₂O) при 50 °C. Відмічені сигнали, зумовлені внутрішніми стандартами і залишковою водою (HOD). Мінорні сигнали, відмічені *, зумовлені залишками клітинної стінки *S. pneumoniae*, такими як C-полісахарид і/або пептидоглікани.

На фіг. 4 показаний 600 МГц одновимірний ¹H ЯМР-спектр капсульного полісахариду

серотипу 35B *S. pneumonia* в D₂O при 50 °C. Відмічені сигнали, зумовлені внутрішніми стандартами (DMCO і DSS-d₆) і залишковою водою (HOD). Мінорні сигнали, відмічені *, зумовлені залишками клітинної стінки *S. pneumonia*, такими як C-полісахарид і/або пептидоглікани.

5 На фіг. 5 показана ¹H ЯМР-ідентична ділянка, корисна для ідентифікації серотипу 6C *S. pneumonia*. Відмічені положення сигналів кожного аномерного протона повторюваної ланки кожного моносахаридного залишку.

На фіг. 6 показана ¹H ЯМР-ідентична ділянка, корисна для ідентифікації серотипу 15A *S. pneumonia*. Відмічені положення сигналів кожного аномерного протона повторюваної ланки
10 кожного моносахаридного залишку.

На фіг. 7 показана ¹H ЯМР-ідентична ділянка, корисна для ідентифікації де-О-ацетилованого серотипу 15B *S. pneumonia*. Відмічені положення сигналів кожного аномерного протона кожного моносахаридного залишку.

15 На фіг. 8 показана ¹H ЯМР-ідентична ділянка, корисна для ідентифікації серотипу 35B *S. pneumonia*. Відмічені положення сигналів кожного аномерного протона повторюваної ланки кожного моносахаридного залишку.

На фіг. 9A-9C показаний 600 МГц одновимірний ¹H ЯМР-спектр нативного капсульного полісахариду серотипу 15B *S. pneumonia* (фіг. 9A), де-О-ацетилованого капсульного полісахариду серотипу 15B *S. pneumonia* (фіг. 9B) і капсульного полісахариду серотипу 15C *S. pneumonia* (фіг. 9C). Спектри отримані в оксиді дейтерію (D₂O) при 50 °C. Відмічені сигнали, зумовлені внутрішніми стандартами (DMCO і DSS-d₆) і залишковою водою (HOD). Сигнали, відмічені *, зумовлені залишками клітинної стінки *S. pneumonia*, такими як C-полісахарид і/або пептидоглікани.
20

На фіг. 10A-10C показана аномерна область де-О-ацетилованого капсульного полісахариду серотипу 15B *S. pneumonia* (фіг. 10B) і капсульного полісахариду серотипу 15C *S. pneumonia* (фіг. 10C). На фіг. 10D-10F показані області спектра сигналів О-ацетил- і N-ацетилметилу нативного капсульного полісахариду серотипу 15B *S. pneumonia* (фіг. 10D), де-О-ацетилованого капсульного полісахариду серотипу 15B *S. pneumonia* (фіг. 10E) і капсульного полісахариду серотипу 15C *S. pneumonia* (фіг. 10F).
25

На фіг. 11 показаний вплив часу і температури (до 12 тижнів при 4 °C (ромби), до 4 тижнів при 25 °C (квадрати), до 4 тижнів при 37 °C (трикутники)) на концентрацію полісахариду в лікарських препаратах (0,084 мг/мл або 0,169 мг/мл), визначений за допомогою методів На фіг. 12 показаний вплив перемішування при горизонтальному обертанні і температури (1 тиждень при 4 °C, 25 °C або 37 °C) на концентрацію полісахариду в лікарських препаратах PCV16 (0,128 мг/мл) або PCV21 (0,084 мг/мл або 0,169 мг/мл), що знаходяться в попередньо заповнених шприцах (див. приклад 39).
30 35

На фіг. 13 показаний вплив концентрації PS залежно від часу і температури (до 4 тижнів при 4, 25 або 37 °C) на середню молекулярну масу (M_w і M_n) лікарських препаратів PCV16 (0,128 мг/мл) або На фіг. 14A і 14B показаний вплив часу і температури (до 1 тижня при 4 °C або 37 °C) на стабільність пневмококової кон'югатної вакцини (PCV15 або PCV16), приготованої з лікарськими речовинами, кон'югованими в А) протонному розчиннику (PCV15 отримана в результаті кон'югації в повністю водному середовищі) або В) апротонному розчиннику (PCV16, отримана в результаті кон'югації в DMCO при 0,064 мг/мл PnPs) за допомогою флуоресцентної спектроскопії з внутрішнім білком з довжиною хвилі збудження 280 нм (приклад 40).
40

На фіг. 15 показані титри розведення антитіл IgG за результатами ELISA (після введення дози 2) у кроликів, імунізованих моновалентними серотипами *S. pneumoniae*, кон'югованими з CRM197 і приготованими з ад'ювантом на основі фосфату алюмінію. Символи показують окремі титри, а планки погрешностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середніх геометричних титрів (GMT).
45

На фіг. 16 представлені специфічні для серотипу титри розведення OPA (після введення дози 2) у кроликів, імунізованих моновалентними серотипами *S. pneumoniae*, кон'югованими з CRM197 і приготованими з ад'ювантом на основі фосфату алюмінію (APA). Символи показують окремі титри, а планки погрешностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середніх геометричних титрів (GMT).
50

На фіг. 17 представлені титри розведення антитіл IgG за результатами ELISA (після введення дози 2) у кроликів, імунізованих моновалентними кон'югатами серотипу 15 *S. pneumoniae*. На осі X показана вакцина, що використовується для імунізації кроликів. Пунктирні лінії розділяють три окремих аналізи ELISA з використанням окремого пневмококового полісахариду як покривного антигена. Символи показують окремі титри, а планки погрешностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середніх геометричних титрів (GMT).
55 60

На фіг. 18 показані специфічні для серотипу титри розведення ОРА (до імунізації, після введення дози 1 (PD1), об'єднані) і після введення дози 2 (PD2)) у кроликів, імунізованих моновалентними кон'югатами серотипу 15 *S. pneumoniae*. На осі X показана вакцина, що використовується для імунізації кроликів. Пунктирні лінії розділяють три аналізи ОРА з використанням окремих бактеріальних штамів *S. pneumoniae*. Символи показують окремі титри, а планки погрішностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середніх геометричних титрів (GMT).

На фіг. 19A представлено порівняння відповідей антитіл PD1 у NZWR (5 на групу) після вакцинації 4, 2, 1, 0,4, 0,08 або 0,016 мкг/доза PCV21. Символи означають відношення середнього геометричного титру (GMT) PD1 (група 2 мкг/доза порівняно з групами, що отримали інші дози), а планки погрішностей представляють 95 % довірчий інтервал (CI). На фіг. 19B показані відношення GMT PD1 (95 % CI) для порівнюваних доз PCV21, які відповідають відношенням GMT на фіг. 19A, нижній 95 % довірчий інтервал яких, що перевищує 1,0, зафарбований світло-сірим, і відношенням GMT, верхній 95 % довірчий інтервал яких, що знаходиться нижче за 1,0, зафарбовані темно-сірим. Дані по серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 20A представлено порівняння відповідей (5 на групу) після вакцинації 4, 2, 1, 0,4, 0,08 або 0,016 мкг/доза PCV21. Символи означають відношення GMT PD2 (група 2 мкг/доза порівняно з групами, що отримали інші дози), а планки погрішностей представляють 95 % CI. На фіг. 20B показані відношення GMT PD2 (довірчий інтервал 95 %) для порівнюваних доз PCV21, які відповідають відношенням GMT на фіг. 20A, у яких нижній 95 % довірчий інтервал, що перевищує 1,0, заштрихований світло-сірим кольором. Дані по серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 21A показані специфічні для серотипу титри розведення ОРА PD1, у кроликів, імунізованих PCV21 (2 мкг/PnPs). Символи означають окремі титри, а планки погрішностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середніх геометричних титрів. На фіг. 21B показані титри розведення в точці PD2 за результатами ОРА у кроликів, імунізованих PCV21 (2 мкг/PnPs). Символи означають окремі титри, а планки погрішностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середніх геометричних титрів (GMT), **** $p < 0,0001$. Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 22A-C показано вплив часу і температури (тобто, 7 днів при 4 °C, 1 день при 37 °C або 7 днів при 37 °C) на стабільність трьох пневмококових кон'югатних вакцин приготованих з всіма лікарськими речовинами, кон'югованими або у водному розчиннику, або в розчиннику ДМСО, методом флуоресцентної спектроскопії з внутрішнім білком з довжиною хвилі збудження 280 нм. На фіг. 22D показаний вплив часу і температури (тобто 7 днів при 4 °C або 37 °C) на стабільність 21-валентної пневмококової кон'югатної вакцини (PCV21 при 0,084 мг/мл PnPs), приготованої з всіма лікарськими речовинами, кон'югованими в розчиннику ДМСО, методом флуоресцентної спектроскопії з внутрішнім білком з довжиною хвилі збудження 280 нм.

На фіг. 23 показаний вплив температури (7 днів при 4 °C або 37 °C) і перемішування при 4 °C на розподіл частинок по розмірах за результатами аналізу траєкторії наночастинок (NTA) для шести (6) вакцинних препаратів на основі пневмококового кон'югата PCV21, приготованих з PS-20 (0 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,15 % або 0,2 %; всі в одиницях мас./об.) при 0,084 мг/мл PnPs.

На фіг. 24 показаний вплив температури (4 °C і 37 °C) і перемішування на середню молекулярну масу трьох лікарських препаратів PCV21 за результатами аналізу HPSEC/UV/MALS/RI. Три вакцинні препарати на основі пневмококового кон'югата PCV21 готували з різними концентраціями PS-20 (0,05 %, 0,1 % і 0,15 % мас./об.) при 0,084 мг/мл PnPs.

На фіг. 25 показано, що миші, імунізовані PCV21, захищені від інтратрахеального зараження 24F *S. pneumoniae*.

На фіг. 26A-B показані титри розведення антитіл IgG до імунізації (об'єднані), PD1 (об'єднані) і PD2, визначені по ECL у кроликів, імунізованих PCV21, приготованої без ад'ювантів або з APA. Планки погрішностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середнього геометричного титру (GMT). Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 27A-C показані титри розведення антитіл IgG до імунізації (об'єднані), PD1 (об'єднані) і PD2, визначені по ECL у кроликів, імунізованих PCV8 без ад'ювантів, PCV16 без ад'ювантів і PCV31 з APA. Планки погрішностей представляють 95 % довірчі інтервали (CI) середнього геометричного титру (GMT). Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 28 показане порівняння PD2 рівнів синтезу антитіл за результатами ECL у NZWR (5 на групу) після вакцинації PCV21 з APA або без нього. Символи означають відношення GMT

PD2 з планками погрішностей, що представляють 95 % CI. Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На Фіг 29 показано порівняння PD2 рівнів синтезу антитіл за результатами ECL у NZWR (5 на групу) для загальних серотипів і перехресно захищеного серотипу 15B після вакцинації PCV21, PCV8 або PCV16. Символи означають відношення GMT PD2 за результатами ECL з планками погрішностей, що представляють 95 % CI.

На фіг. 30 показане порівняння PD2 рівнів синтезу антитіл за результатами ECL у NZWR (5 на групу) для загальних серотипів і перехресно захищеного серотипу 15B після вакцинації PCV21/APA або PCV31/APA. Символи означають відношення GMT PD2 за результатами ECL з планками погрішностей, що представляють 95 % CI.

На фіг. 31A-D показані серотип-специфічні титри розведення OPA до імунізації (об'єднані) у кроликів, імунізованих PCV. Планки погрішностей представляють 95 % CI GMT. PCV21 використовували як еталон для статистичних порівнянь, * $p < 0,05$. На фіг. A і C показані дані для 8 загальних серотипів у всіх оцінених PCV (6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B) і додаткових 8 загальних серотипів у PCV16, PCV21 та PCV31 (8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20B). На фіг. B і D показані дані для додаткових 16 серотипів, не представлених на фіг. A і C. П'ять з них також є загальними серотипами у PCV21 і PCV31 (3, 7F, 19A, 22F, 33F), десять серотипів містяться виключно в PCV31 (1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). Дані по серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 32 показані титри розведення IgG антитіл до імунізації, PD1, PD2 і PD3, визначені за результатами ECL у дорослих макак-резус ($n=8$), імунізованих PCV21. Планки погрішностей представляють 95 % CI GMT. Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 33 показані титри розведення OPA до імунізації, PD1 (об'єднані) і PD3 у макак-резус, імунізованих PCV21 ($n=8$). Планки погрішностей представляють 95 % CI GMT. Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 34 показані титри OPA до імунізації і PD3 (день 70) для чотирьох серотипів, що не містяться у вакцині PCV21, у дорослих макак-резус, імунізованих PCV21.

На фіг. 35 показане порівняння PD1 рівнів синтезу антитіл за результатами ECL у дорослих макак-резус (5 на групу) після вакцинації PCV21 з APA або без нього. Символи вказують на відношення GMT PD2 за результатами ECL (PCV21 проти PCV21/APA) з планками погрішностей, що представляють 95 % CI. Дані серотипу 15B включені для оцінки перехресного захисту.

На фіг. 36 показані PD1 рівні синтезу антитіл IgG на серотипи 3, 7F, 19A, 22F і 33F у дорослих макак-резус (2-5 на групу) після вакцинації PCV21 порівняно з PCV15 або Prevnar13. Символи означають відношення GMT PD2 за результатами ECL з планками погрішностей, що представляють 95 % CI.

На фіг. 37 показані титри розведення IgG антитіл за результатами ELISA на 6A, 6B і 6C ((до імунізації і PD1, об'єднані) і PD2) у кроликів, імунізованих лікарським препаратом на основі моновалентного (B). Стовпці вказують середні геометричні титри (GMT), а планки погрішностей - 95 % довірчі інтервали (CI) GMT.

На фіг. 38 показані специфічні для серотипів 6A, 6B і 6C титри розведення OPA ((до імунізації і PD1, об'єднані) і PD2) у кроликів, імунізованих лікарськими препаратами на основі одновалентного 6A-CRM197 (A) або 6B-CRM197 (B). Стовпці вказують середні геометричні титри (GMT), а планки погрішностей - 95 % довірчі інтервали (CI) GMT.

На фіг. 39 показані специфічні для серотипів 20A і 20B титри розведення OPA (до імунізації (об'єднані), PD1 і PD2) у кроликів, імунізованих 20A-CRM197/APA (A) або PCV21 (B). Стовпці вказують середні геометричні титри (GMT), а планки погрішностей - 95 % довірчі інтервали (CI) GMT.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даній винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, що містять пневмококові полісахарид-білкові кон'югати, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* є такими, як визначено в даній заявці. У деяких варіантах здійснення імуногенна композиція містить набір пневмококових серотипів, вибраних з групи, яка складається з: пневмококових серотипів, вибраних з групи, яка складається з: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 та 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, та 20; та (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, та 20. У деяких варіантах здійснення імуногенна композиція містить набір пневмококових серотипів, вибраних із групи, яка складається з: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F та 20B; та (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8,

9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F та 20B. У інших варіантах здійснення імуногенна композиція містить набір пневмококових серотипів, вибраних з групи, яка складається з: (a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B; (b) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F та 20A; та (c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F та 20A. У інших варіантах здійснення імуногенна композиція містить (i) серотип 6A; (ii) серотипи 6A і 6B; або (iii) серотип 6C. У конкретному варіанті здійснення винахід містить декілька пневмококових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F і 35B. Було виявлено, що вказана композиція є імуногенною у кроликів і генерує функціональне антитіло, яке вбиває бактеріальні штами вакцинного типу при всіх протестованих дозах (приклад 43). У іншому конкретному варіанті здійснення винахід містить декілька пневмококових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B. В іншому конкретному варіанті здійснення винахід містить декілька пневмококових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20B, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B. В іншому конкретному варіанті здійснення винахід містить декілька пневмококових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 15C, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B.

Полівалентні імуногенні композиції за винаходом корисні для імунізації пацієнта проти вакцинних серотипів *S. pneumoniae* і як компонент схеми лікування іншою(ними) комплементарною(ими) пневмококовою(ими) вакциною(ами). Відповідно, винахід стосується способу індукції захисної імунної відповіді у пацієнта-людини, який включає введення пацієнту полівалентної імуногенної композиції за винаходом і додатково включає введення пацієнту полівалентної пневмококової вакцини в будь-якому порядку. У інших варіантах здійснення полівалентні імуногенні композиції за винаходом вводять пацієнту, який раніше був імунізований іншою полівалентною пневмококовою вакциною.

У варіантах здійснення винаходу кон'югати щонайменше одного пневмококового серотипу отримують по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, такому як ДМСО. У інших варіантах здійснення полівалентна імуногенна композиція містить пневмококові кон'югати, кожний з яких був отриманий по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У даному описі показано, що лікарські препарати (визначені нижче), що містять лікарські речовини, кожна з яких була отримана по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, є стійкими до деполімеризації або хімічної деградації вуглеводу, а також є стійкими до агрегації білка в складі лікарського препарату (див. приклад 40 і приклад 45). Використання розчинника ДМСО посилює ковалентні зв'язки між полісахаридом і білком, утворені за безпосередньою участю залишків лізину на поверхні білка-носія. Поліпшені ковалентні зв'язки забезпечують безпосередню перевагу в значенні підвищення стабільності полісахарид-білкового кон'югата полівалентних імуногенних композицій, що містять полісахаридні антигени, кон'юговані в ДМСО.

I. Визначення і скорочення

У описі і прикладній формулі винаходу застосовуються наступні скорочення:

APA - ад'ювант на основі фосфату алюмінію

APC - антигенпрезентуюча клітина

CI - довірчий інтервал

ДМСО - диметилсульфоксид

DS - полісахарид-білкова лікарська речовина

GMC - геометрична середня концентрація

GMT - середній геометричний титр

HPSEC - високоефективна ексклюзійна хроматографія

IM - внутрішньом'язово

LOS - ліпоолігосахарид

LPS - ліпополісахарид

MALS - багатокутове розсіювання світла

MBC - моновалентний змішаний (загальний) кон'югат

MOPA - мультиплексний аналіз опсонофагоцитарних реакцій

MW - молекулярна маса

NMWCO - номінальне відсікання по молекулярній масі

NZWR - новозеландський білий кролик

5 OPA - аналіз опсонофагоцитозу

PCV - пневмококова кон'югатна вакцина

PD1 - після дози 1

PD2 - після дози 2

PnPs - пневмококовий полісахарид

10 Ps - полісахарид

PS-20 - полісорбат-20

RI - показник заломлення

UV - ультрафіолет

w/v - мас./об.

15 Для полегшення розуміння винаходу нижче спеціально наведене визначення деяких технічних і наукових термінів. Якщо в даному описі відсутнє спеціальне визначення, то всі інші технічні і наукові терміни, що використовуються в даному описі, мають значення, що звичайно розуміється фахівцем в галузі техніки, до якої належить даній винахід.

Використовувана в описі і в прикладеній формулі винаходу форма однини включають посилання на множину, якщо з контексту в явному вигляді не виходить інше.

20 Посилання на "або" вказує на одну або обидві можливостей, якщо з контексту в явному вигляді не виходить одна з вказаних можливостей. У деяких випадках використовується "і/або" для виділення однієї або обох можливостей.

25 Терміни "водний розчинник" або "водні умови", що використовуються застосовно до кон'югації, такої як відновне амінування, стосуються використання води як розчинника в реакції кон'югації. Вода може містити буфери і інші компоненти, за винятком органічного розчинника.

30 Терміни "апротонний розчинник", "розчинник ДМСО" або "умови ДМСО", що використовуються застосовно до кон'югації, такої як відновне амінування, стосуються застосування апротонного розчинника або комбінації апротонних розчинників (або ДМСО, залежно від випадку) як розчинник в реакції кон'югації. Апротонний розчинник може містити деяку кількість води, наприклад, до 1 %, 2 %, 5 %, 10 % або 20 %.

35 Термін "містить", що використовується застосовно до імуногенної композиції за винаходом, стосується включення будь-яких інших компонентів, таких як ад'юванти і наповнювачі, або додавання одного або більше полісахарид-білкових кон'югатів, які не вказані спеціальним чином. Термін "що складається з", що використовується застосовно до суміші полівалентного полісахарид-білкового кон'югата, стосується суміші, що містить ці конкретні *S. pneumoniae* полісахарид-білкові кон'югати, і яка при цьому не містить ніяких інших кон'югатів полісахариду іншого серотипу *S. pneumoniae* з білком. "По суті складається з" і варіанти, такі як "по суті складаються з" або "що по суті складається з", вказують на включення будь-якого з перерахованих елементів або груп елементів і на необов'язкове включення інших елементів, аналогічних або відмінних за природою від перерахованих елементів, які істотно не змінюють основні або нові властивості вказаного режиму дозування, способу або композиції.

40 "Ефективна кількість" композиції за винаходом стосується дози, необхідної для генерації антитіл, яка значно знижує імовірність вияву або серйозність інфікуючої здатності мікроба, наприклад *S. pneumoniae*, під час подальшого зараження.

45 Використовуваний в даному описі вираз "показане для профілактики пневмококової інфекції" означає, що вакцина або імуногенна композиція схвалена одним або більше регулюючими органами, такими як Управління по контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів США, для профілактики одного або більше захворювань, викликаних будь-яким серотипом *S. pneumoniae*, включаючи, без обмеження, в загальному випадку пневмококове захворювання, пневмококову пневмонію, пневмококовий менінгіт, пневмококову бактеріємію, інвазивне захворювання, викликане *S. pneumoniae*, і середній отит, викликаний *S. pneumoniae*.

50 "Полівалентна пневмококова вакцина" являє собою фармацевтичний препарат, що містить більше одного активного агента (наприклад, пневмококовий капсульний полісахарид або пневмококовий полісахарид-білковий кон'югат), який забезпечує активний імунітет до захворювання або патологічного стану, викликаного більше ніж одним серотипом *S. pneumoniae*.

55 Термін "полісахарид" означає включення будь-якого антигенного сахаридного елемента (або антигенної одиниці), що звичайно використовується в галузі імунологічних і бактеріальних вакцин, включаючи, без обмеження, "сахарид", "олігосахарид", "полісахарид", "ліпосахарид",

"ліпоолігосахарид (LOS)", "ліпополісахарид (LPS)", "глікозилат", "глікокон'югат" і т. п.

"PCV1" в контексті даного опису стосується 1-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить один *S. pneumoniae* полісахарид-білковий кон'югат, що включає капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотип *S. pneumoniae* являє собою серотип 3 (як показано в прикладах 38 і 45). У конкретних варіантах здійснення білок-носії являє собою CRM197.

"PCV7" в контексті даного опису стосується 7-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить сім *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульні полісахариди серотипів *S. pneumoniae*, кон'юговані з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* являють собою 3, 8, 9N, 11A, 19A, 15A і 10A. У конкретних варіантах здійснення білок-носії одного або більше *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення білок-носії кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197.

"PCV8" в контексті даного опису стосується 8-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить вісім *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* являють собою 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B. В конкретних варіантах здійснення білок-носії одного або більше *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення білок-носії кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197.

"PCV14" в контексті даного опису стосується 14-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить чотирнадцять *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульні полісахариди серотипу *S. pneumoniae*, кон'юговані з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* являють собою 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20, 22F і 33F. В конкретних варіантах здійснення білок-носії одного або більше *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення білок-носії кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197.

"PCV15" в контексті даного опису стосується 15-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить п'ятнадцять *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульні полісахариди серотипу *S. pneumoniae*, кон'юговані з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* являють собою 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F. В конкретних варіантах здійснення білок-носії одного або більше *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення білок-носії кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197.

"PCV16" в контексті даного опису стосується 16-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить шістнадцять *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* являють собою 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B, і щонайменше один з наступних серотипів серогрупи 15: 15B, 15C або де-О-ацетилований 15B. У конкретних варіантах здійснення серотип 15 являє собою серотип 15C або де-О-ацетилований 15B. Як показано в даному описі (див. приклад 3, нижче), де-О-ацетилований пневмококовий полісахарид серотипу 15B еквівалентний пневмококовому полісахариду серотипу 15C і має ідентичні спектри ЯМР. У конкретних варіантах здійснення білок-носії одного або більше *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення білок-носії кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197.

"PCV21" в контексті даного опису стосується 21-валентної пневмококової кон'югатної вакцини, що містить двадцять один *S. pneumoniae* полісахарид-білковий кон'югат, кожний з яких містить капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* являють собою 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F і 35B, і щонайменше один з наступних серотипів серогрупи 15: 15B, 15C або де-О-ацетилований-15B. У конкретних варіантах здійснення серотип 15 являє собою серотип 15C або де-О-ацетилований 15B. У конкретних варіантах здійснення білок-носії одного або більше *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення білок-носії кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів являє собою CRM197.

Серотипи 20A та 20B *S. pneumoniae* були ідентифіковані (Calix, J.J. et al., J. Biol. Chem. (2012) 287 (33): 27885-27894) в серогрупі 20 в 2012 році за допомогою генетичного аналізу. Як вказано Calix JJ et al., ці два серотипи не вдавалося ідентифікувати раніше за допомогою звичайних методів серотипування і комерційно доступних антитіл, і сьогодні є обмежена

інформація відносно спроб серотипування серотипів 20А і 20В. Крім того, поширеність захворювань, що викликаються 20А або 20В, серед виявлених захворювань, що викликаються серогрупою 20, залишається не зовсім зрозумілою. По суті, фахівець в даній галузі може вибрати один або обидва ці серотипи (20А і/або 20В) для включення в *S. pneumoniae* вакцинну композицію. Також можливо, що вакцина проти *S. pneumoniae*, що містить один полісахаридний антиген серотипу 20, може забезпечувати перехресний захист від іншого антигена (наприклад, вакцина, що включає кон'югати полісахариду серотипу 20А *S. pneumoniae*, а не серотипу 20В, з білком може забезпечувати перехресний захист від інфекції, що викликається серотипом 20В *S. pneumoniae*). Отже, термін "серотип 20", що використовується в даному описі, може стосуватися композиції, що містить кон'югати полісахариду серотипу 20А і/або серотипу 20В з білком.

"СрG-вмісний нуклеотид", "СрG-вмісний олігонуклеотид", "СрG-олігонуклеотид" і аналогічні терміни стосуються нуклеотидної молекули довжиною 6-50 нуклеотидів, яка містить неметилований фрагмент СрG. Див., наприклад, Wang et al., 2003, Vaccine 21:4297. СрG-вмісні олігонуклеотиди включають модифіковані олігонуклеотиди утворені за допомогою будь-яких синтетичних міжнуклеозидних зв'язків модифікованої основи і/або модифікованого цукру.

"Ад'ювант", в контексті даного опису, являє собою речовину, яка служить для посилення імуногенності імуногенної композиції за винаходом. Імунний ад'ювант може посилювати імунну відповідь на антиген, який при введенні окремо є слабкоімуногенним, наприклад, що не індукуює або що індукуює слабкі титри антитіл або клітинну імунну відповідь, може збільшувати титри антитіл до антигену і/або дозволяє знизити дозу антигену, ефективну для досягнення імунної відповіді у людини. Таким чином, ад'юванти часто застосовуються для посилення імунної відповіді і добре відомі фахівцям в даній галузі.

"Пацієнт" (альтернативно званий в даному описі "суб'єктом") стосується ссавця, здатного бути інфікованим *S. pneumoniae*. У переважних варіантах здійснення пацієнт є людиною. Пацієнт може отримувати профілактичне або терапевтичне лікування. Профілактичне лікування забезпечує достатній захисний імунітет для зниження імовірності виникнення або тяжкості пневмококової інфекції або її наслідків, наприклад пневмококової пневмонії. Терапевтичне лікування може застосовуватися для зменшення тяжкості або попередження рецидиву інфекції *S. pneumoniae* або її клінічних ефектів. Профілактичне лікування може здійснюватися за допомогою полівалентної імуногенної композиції за винаходом, розкритої в даному описі. Композицію за винаходом можна вводити населенню загалом або людям з підвищеним ризиком пневмококової інфекції, наприклад, немолодим людям або тим, хто живе з немолодими людьми або піклується про них.

Термін "потребуючий лікування" включає тих, що піддавались раніше впливу або інфікованих *S. pneumoniae*, раніше вакцинованих проти *S. pneumoniae*, а також схильних до інфекції, або будь-яких, відносно якого бажане зниження імовірності інфікування, наприклад, індивідуумів з ослабленим імунітетом, немолодих індивідуумів, дітей, дорослих або здорових індивідуумів.

"Стабільна" полівалентна імуногенна композиція являє собою композицію, яка не демонструє істотних змін, що спостерігаються при температурі охолодження (наприклад, 2-8 °C або 4 °C) протягом щонайменше 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців, 6 місяців, 12 місяців і/або 24 місяців. Крім того, "стабільна" композиція включає композицію, яка виявляє необхідні властивості при температурах, в тому числі при 25 °C і 37 °C, протягом періодів часу, включаючи 1 місяць, 3 місяці, 6 місяців, 12 місяців і/або 24 місяці. Типовими прийнятними критеріями стабільності є наступні: змінюваність не більше ніж на приблизно 5 %, приблизно 10 %, приблизно 15 % або приблизно 20 % по одному або більше показниках з наступних: (а) середньочислова молекулярна маса (Mn) *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції, (b) середньомасова молекулярна маса (Mw) *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції, (c) загальна концентрація полісахариду в композиції, (d) максимальне випромінювання композиції, виміряне методом флуоресцентної спектроскопії з внутрішнім білком при конкретній довжині хвилі збудження, наприклад, 280 нанометрів, і (e) інтенсивність флуоресценції композиції, виміряна методом флуоресцентної спектроскопії з внутрішнім білком при конкретній довжині хвилі збудження. Термін "стабільний" також може використовуватися для позначення конкретного пневмококового кон'югата в полівалентній імуногенній композиції. При такому використанні термін стосується кон'югату, який виявляє необхідні властивості з плином часу, при певній температурі, і такі властивості змінюються з плином часу і при деякій температурі не більше ніж на приблизно 5 %, на приблизно 10 %, на приблизно 15 % або на приблизно 20 %.

II. Полівалентні імуногенні композиції

Винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, що містять декілька *S.*

рнеупоніае полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. рнеупоніае*, кон'югований з білком-носієм. Нижче описані різні аспекти і варіанти полівалентних імуногенних композицій за винаходом.

У одному з варіантів здійснення (варіант E1) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульний полісахарид серотипу *S. рнеупоніае*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. рнеупоніае* складаються з або по суті складаються з:

(1) 15A,

(2) 16F,

(3) однієї або декількох серотипів серогрупи 23, вибраних з: (a) 23A і 23B, (b) 23A і 23F, (c) 23B і 23F, (d) 23A, (e) 23B і (f) 23F,

(4) 24F,

(5) 31, і

(6) 35B.

У підваріанті варіанту здійснення E1 один або більше серотипів серогрупи 23 являють собою 23A і 23B (тобто, відсутні будь-які інші серотипи серогрупи 23). У додатковому підваріанті варіанту здійснення E1 один або більше серотипів серогрупи 23 являють собою 23A і 23F. У іншому підваріанті варіанту здійснення E1 один або більше серотипів серогрупи 23 являють собою 23B і 23F. У ще одному підваріанті варіанту здійснення E1 23A є єдиним серотипом серогрупи 23. У додатковому підваріанті варіанту здійснення E1 23B є єдиним серотипом серогрупи 23. У ще одному додатковому підваріанті варіанту здійснення E1 23F є єдиним серотипом серогрупи 23.

У другому варіанті здійснення (варіант E2) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, що включають капсульний полісахарид серотипу *S. рнеупоніае*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. рнеупоніае* містять набір серотипів, представлений у варіанті здійснення E1 або в будь-якому підваріанті варіанту здійснення E1, і додатково містять серотип: (1) 6C, (2) 6A, або (3) 6A і 6B.

У підваріанті варіанту здійснення E2 композиція містить серотип 6C. У додатковому підваріанті варіанту здійснення E2 композиція містить серотипи 6A і 6B і не містить серотип 6C. У іншому підваріанті варіанту здійснення E2 композиція містить серотип 6A.

У третьому варіанті здійснення (варіант E3) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, що включають капсульний полісахарид серотипу *S. рнеупоніае*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. рнеупоніае* містять набір серотипів, наведений у варіантах здійснення E1 або в будь-яких підваріантах варіанту здійснення E1, або у варіанті здійснення E2 або будь-якому підваріанті варіанту здійснення E2, і додатково містять серотипи:

(1) 8,

(2) 9N,

(3) 11A

(4) 12F,

(5) 15B або 15C,

(6) 17F, і

(7) 20A і/або 20B.

У четвертому варіанті здійснення (варіант E4) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, що включають капсульний полісахарид серотипу *S. рнеупоніае*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. рнеупоніае* містять набір серотипів, наведений в будь-якому з варіантів здійснення E1-E3 або в їх будь-яких підваріантах здійснення, і додатково містять серотипи: 10A або 39.

У п'ятому варіанті здійснення (варіант E5) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. рнеупоніае* містять, складаються з або по суті складаються з: 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B.

У шостому варіанті здійснення (варіант E6) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. рнеупоніае* містять, складаються з або по суті складаються з: 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B.

У сьомому варіанті здійснення (варіант здійснення E7) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. рнеупоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. рнеупоніае* містять, складаються з або по суті складаються з: 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B.

В восьмому варіанті здійснення (варіант здійснення E8) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять, складаються з або по суті складаються з: 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B.

5 У дев'ятому варіанті здійснення (варіант здійснення E9) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи, наведені в будь-якому з варіантів здійснення E1-E8 (або будь-якому їх підваріанті), і додатково містять серотипи: 3, 7F і 19A.

10 У десятому варіанті здійснення (варіант здійснення E10) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи, наведені в будь-якому з варіантів здійснення E1-E9 (або будь-якому їх підваріанті), і додатково містять серотип 22F.

15 У одинадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E11) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять серотипи, наведені в будь-якому з варіантів здійснення E1-E10 (або будь-якому їх підваріанті), і додатково містять серотип 33F.

20 У дванадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E12) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять, складаються з або по суті складаються з набору серотипів *S. pneumoniae*, вибраних з групи, яка складається з:

- (1) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (2) 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (3) 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 і 35B,
- (4) 15A, 16F, 23A, 24F, 31 і 35B,
- 25 (5) 15A, 16F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (6) 15A, 16F, 23F, 24F, 31 і 35B,
- (7) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (8) 6C, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (9) 6C, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 і 35B,
- 30 (10) 6C, 15A, 16F, 23A, 24F, 31 і 35B,
- (11) 6C, 15A, 16F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (12) 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 і 35B,
- (13) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (14) 6A, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- 35 (15) 6A, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 і 35B,
- (16) 6A, 15A, 16F, 23A, 24F, 31 і 35B,
- (17) 6A, 15A, 16F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (18) 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 і 35B,
- (19) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- 40 (20) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (21) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23F, 24F, 31 і 35B,
- (22) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 24F, 31 і 35B,
- (23) 6A, 6B, 15A, 16F, 23B, 24F, 31 і 35B, і
- (24) 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 і 35B.

45 У тринадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E13) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять, складаються з або по суті складаються з набору серотипів *S. pneumoniae*, вибраних з групи, яка складається з:

- (1) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- 50 (2) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (3) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (4) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (5) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (6) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- 55 (7) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (8) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (9) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (10) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- (11) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- 60 (12) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,

- (13) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (14) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (15) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (16) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 5 (17) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (18) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (19) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (20) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (21) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 10 (22) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (23) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (24) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (25) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (26) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 15 (27) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (28) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (29) 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (30) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (31) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B, i
 20 (32) 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B.
- Тринадцятий варіант здійснення (варіант здійснення E13) додатково містить набір серотипів *S. pneumoniae*, рядки (1)-(32), де серотип 20A в кожному наборі замінений або серотипом 20, або серотипом 20B.
- У чотирнадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E14) винахід стосується
- 25 полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять, складаються з або по суті складаються з набору серотипів *S. pneumoniae*, вибраних з будь-якого набору серотипів, наведеного у варіанті здійснення E13, рядка (17)-(32), і додатково містять серотипи 23A і/або 23B.
- 30 У п'ятнадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E15) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. pneumoniae* містять, складаються з або по суті складаються з набору серотипів *S. pneumoniae*, вибраних з групи, яка складається з:
- (1) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 35 (2) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (3) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 40 (4) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (5) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (6) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 45 (7) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (8) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (9) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 50 (10) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (11) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (12) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 55 (13) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (14) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 60 (15) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,

- (16) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 i 35B,
 (17) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 5 (18) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (19) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (20) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6C, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (21) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 10 (22) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (23) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (24) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 15 (25) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (26) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (27) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (28) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 20 (29) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (30) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (31) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 6B, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 25 (32) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15B, 17F, 20A, 6A, 15A, 16F, 23F, 24F, 31 i 35B,
 (33) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20B,
 (34) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20A,
 30 (35) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20B,
 (36) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20B,
 (37) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20A,
 35 (38) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20B,
 (39) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20,
 40 (40) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20,
 (41) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20,
 45 (42) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20,
 (43) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20, i
 (44) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24B, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F i 20.

У шістнадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E16) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. пневмоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, описаних вище, де серотипи *S. пневмоніае* містять, складаються з або по суті складаються з набору серотипів *S. пневмоніае*, вибраних з будь-якого набору серотипів, наведеного у варіанті здійснення E15, рядка (17)-(32), і додатково містять серотипи 23A і/або 23B.

У сімнадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E17), винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. пневмоніае* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипу *S. пневмоніае*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. пневмоніае* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

- i. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B,
- ii. 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A, і
- iii. 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A;

5 У підваріантах варіанту здійснення E17 імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

У вісімнадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E18), винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипів *S. pneumoniae* 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 10 24F, 31 і 35B. У підваріантах варіанту здійснення E18 імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

У дев'ятнадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E19) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипів 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 15 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A. В підваріантах варіанту здійснення E19 імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

У двадцятому варіанті здійснення (варіант здійснення E20) винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипів *S. pneumoniae* 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 25A, 15C, 20 15C. У підваріантах варіанту здійснення E20 імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

У іншому варіанті здійснення винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипів 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 25 12F, 15C, 17F і 20A. У підваріантах варіанту здійснення (тобто, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A) імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

У іншому варіанті здійснення винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид з серотипів 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 30 11A, 12F, 15C, 17F і 20. У підваріантах варіанту здійснення (тобто, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20) імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

У іншому варіанті здійснення винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипів 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 35 12F, 15C, 17F і 20B. У підваріантах варіанту здійснення (тобто, 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20B) імуногенна композиція не містить ніяких додаткових *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів.

40 Як показано в даному описі (див. приклад 3, нижче), де-О-ацетилований пневмококовий полісахарид серотипу 15B еквівалентний пневмококовому полісахариду серотипу 15C і має ідентичні спектри ЯМР. Де-О-ацетилований пневмококовий полісахарид серотипу 15B, описаний і розкритий в даному описі, еквівалентний пневмококовому полісахариду серотипу 15C, і в обох цих серотипах вміст О-ацетилу в повторюваній ланці може знаходитися в діапазоні 45 0-5 % або в діапазоні 0-4 %, або в діапазоні 0-3 %, або в діапазоні 0-2 %, або в діапазоні 0-1 %, або в діапазоні 0-0,5 %, або в діапазоні 0-0,1 %, або О-ацетил може бути відсутнім. У доповіді Spencer B.L. та співавт., 15C може бути злегка О-ацетильованим (Spencer, B.L. et al., Clin. Vac. Immunol. (2017) 24 (8): 1-13). Таким чином, в будь-якому з варіантів здійснення полівалентних імуногенних композицій, наведених в даному описі, замість серотипу 15C можна 50 використовувати де-О-ацетилований серотип 15B. Способи де-О-ацетилювання відомі в даній галузі, наприклад, описані Rajam et al., Clinical i Vaccine Immunology, 2007, 14(9):1223-1227.

У деяких варіантах здійснення будь-яка з полівалентних імуногенних композицій за винаходом, включаючи варіанти здійснення E1-E20 і будь-який їх підваріант, додатково містить фармацевтично прийнятний носій.

55 **Пережесна реактивність**

У одному з варіантів здійснення винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, що містять *S. pneumoniae* полісахарид-білкові кон'югати, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, включаючи серотип 6C, кон'югований з білком-носієм, де серотип 6C *S. pneumoniae* забезпечує пережесний захист від серотипів 6A і 6B *S. pneumoniae*.

60 У іншому варіанті здійснення винахід стосується полівалентних імуногенних композицій, що

У конкретних варіантах здійснення даного винаходу CRM197 використовується як білок-носії. CRM197 являє собою нетоксичний варіант (тобто, анатоксин) дифтерійного токсину, що має наступну амінокислотну послідовність:

GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYYDDDW
 KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
 TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI
 NNWEQAKALS VELEINFETR GKRGQDAMY EYMAQACAGNR VRRSVGSSLS
 CINLDWDVIR DTKTKTIESL KEHGPIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF
 HQTALHPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
 TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
 VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFL HDGYAVSWNT
 VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
 SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH
 SNEISSDSIG VLGYQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS (SEQ ID NO:1)

У одному з варіантів здійснення CRM197 виділяють з культур штаму *Corynebacterium diphtheria* C7 (B197), вирощених в присутності казамінових кислот в середовищі на основі дріжджового екстракту. У іншому варіанті здійснення CRM197 отримують рекомбінантним методом відповідно до способів, описаних в США 5,614,382. Як правило, CRM197 очищають з допомогою комбінації методів ультрафільтрації, осадження сульфатом амонію і іонообмінною хроматографією. У деяких варіантах здійснення CRM197 отримують в *Pseudomonas fluorescens* з використанням Pfenex Expression Technology™ (Pfenex Inc., Дієго, Каліфорнія).

Інші відповідні білки-носії включають додаткові інактивовані бактеріальні токсини, такі як DT (дифтерійний анатоксин) або фрагмент В DT (DTFB), TT (правцевий анатоксин) або фрагмент С TT, коклюшний анатоксин, холерний анатоксин (наприклад, як описано в WO 2004/083251), *E. coli* LT, *E. coli* ST і екзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa*. Як білки-носії також можна використовувати білки зовнішньої мембрани бактерій, такі як комплекс білків зовнішньої мембрани (OMP), порини, трансферин-зв'язувальні білки, пневмококовий поверхневий білок А (PspA; див. WO 02/091998), пневмококовий адгезин (PsaA), пептидазу С5а зі стрептококів групи А або групи В або білок D *Haemophilus influenzae*, пневмококовий пневмолізін (Kuo et al., 1995, Infect Immun 63: 2706-13), включаючи детоксифікований ply, наприклад злитий білок dPLY-GMBS (див. WO 04/081515) або dPLY-формол, PhtX, включаючи PhtA, PhtB, PhtD, PhtE, і злиті білки Pht, наприклад також можуть бути використані злиті білки PhtDE, злиті PhtBE (див. WO 01/98334 і WO 03/54007). Також можна використовувати інші білки, такі як овальбумін, гемоціанін лімфи равлика (KLH), бичачий сироватковий альбумін (BSA) або похідне очищеного білка туберкуліну (PPD), PorB (*N. meningitidis*), PD (білок D *Haemophilus influenzae*; див., наприклад, EP 0 594 610 B) або їх імунологічні функціональні еквіваленти, синтетичні пептиди (див. EP0378881 і EP0427347), білки теплового шоку (див. WO 93/17712 і WO 94/03208), білки коклюшу (див. WO 98/58668 і EP0471177), цитокіни, лімфокіни, фактори росту або гормони (див. WO 91/01146), штучні білки, що містять декілька людських епітопів CD4+ Т-клітин з різних антигенів, отриманих з патогенів (див. Falugi et al., 2001, Eur J Immunol 31:3816-3824), таких як білок N19 (див. Baraldoi et al., 2004, Infect Immun 72:4884-7), білки, що поглинають залізо (див. WO 01/72337), токсин А або В *C. difficile* (див. WO 00/61761) та флагелін (див. Ben-Yedidia et al., 1998, Immunol Lett 64: 9) також можуть бути використані як білки-носії.

Інші мутанти DT можна використовувати як білок-носії, такі як CRM₁₇₆, CRM₂₂₈, CRM₄₅ (Uchida et al., 1973, J Biol Chem 218:3838-3844); CRM₉, CRM₄₅, CRM₁₀₂, CRM₁₀₃ і CRM₁₀₇ і з іншими мутаціями, описаними Nicholls і Youle в Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maescl Dekker Inc, 1992; делеціями або мутаціями Glu-148 до Asp, Gln або Ser і/або Ala 158 до Gly та інші мутації, розкриті в США 4 709 017 або США 4 950 740; мутаціями щонайменше одного або більше залишків Lys 516, Lys 526, Phe 530 і/або Lys 534 та іншими мутаціями, розкритими в US 5 917 017 або патенті США. 6 645 673; або фрагмент, розкритий у США 5 843 711. Такі мутанти DT також можна використовувати для створення варіантів DTFB, де варіанти містять фрагмент В, що містить області епітопу.

У певних варіантах здійснення білок-носії вибирають з групи, яка складається з комплексу білків зовнішньої мембрани (OMP), правцевого анатоксину, дифтерійного анатоксину, білка D і CRM197.

У деяких варіантах здійснення винаходу в полівалентній імуногенній композиції для одного або більше кон'югатів полісахаридного білка можна використовувати другий носій. Другий білок-носії переважно являє собою білок, який є нетоксичним і неореактогенним і може бути отриманий в достатній кількості і з достатнім ступенем чистоти. Другий білок-носії також кон'югований або сполучений з полісахаридом *S. pneumoniae* для посилення імуногенності

антигену. Білки-носії повинні піддаватися стандартним процедурам кон'югації. У одному з варіантів здійснення кожний капсульний полісахарид, не кон'югований з першим білком-носієм, кон'югований з тим же самим другим білком-носієм (наприклад, кожна молекула капсульного полісахариду кон'югована з одним білком-носієм). У іншому варіанті здійснення капсульні полісахариди, не кон'юговані з першим білком-носієм, кон'юговані з двома або більше білками-носіями (кожна молекула капсульного полісахариду кон'югована з одним білком-носієм). У таких варіантах здійснення кожний капсульний полісахарид одного і того ж серотипу звичайно кон'югований з одним і тим же білком-носієм.

У варіантах здійснення винаходу, включаючи будь-який з варіантів здійснення E1-E20 і будь-яких їх підваріанти, один або більше полісахаридів серотипів (включаючи 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, де це застосовне) кон'юговані з CRM197. У додаткових варіантах здійснення винаходу, включаючи будь-який з варіантів здійснення E1-E20 і будь-яких їх підваріанти, полісахарид кожного з серотипів кон'югований з CRM197.

Склад полісахарид-білкових кон'югатів за даним винаходом може бути отриманий за допомогою відомих в даній галузі способів. Наприклад, окремі пневмококові кон'югати можуть бути приготовані з використанням фізіологічно прийнятного носія для отримання композиції. Приклади таких носіїв включають, без обмеження, воду, буферний сольовий розчин, поліоли (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь, рідкий поліетиленгліколь) і розчини декстрази.

У переважному варіанті здійснення вакцинна композиція приготована в L-гістидиновому буфері з хлоридом натрію.

У деяких варіантах здійснення винаходу полівалентна імуногенна композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, що містять капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, і ад'ювант, де серотипи *S. pneumoniae* є такими, як розкрито в даному описі. Прийнятні ад'юванти для посилення ефективності композиції включають, без обмеження:

(1) солі алюмінію (галуни), такі як гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію, сульфат алюмінію і т. д.;

(2) склади на основі емульсії масло-в-воді (з або без інших специфічних імуностимулюючих агентів, таких як мурамілпептиди (визначені нижче) або компоненти бактеріальної клітинної стінки), такі як, наприклад, (a) MF59 (публікація міжнародної заявки на патент № WO 90/14837), що містить 5 % сквалену, 0,5 % твіну 80 і 0,5 % Span 85 (що необов'язково містить різні кількості MTP-PE), приготований у вигляді субмікронних частинок з допомогою мікрофлюїдизатора, такого як мікрофлюїдизатор моделі 110Y (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, що містить 10 % сквалену, 0,4 % твіну 80, 5 % полімеру, блокованого плуроніком L121, і thr-MDP, або мікрофлюїдизований в субмікронну емульсію, або перемішаний на вортексі з утворенням емульсії з великим розміром частинок, (c) ад'ювантна система RibitTM, що містить 2 % сквалену, 0,2 % Твін 80 і один або більше компонентів бактеріальної клітинної стінки з групи, яка складається з 3-О-деацильованого монофосфориліпиду А (MPLTM), описаного в патенті США 4,912,094, трегалозо-диміколату (TDM) і скелета клітинної стінки (CWS), переважно MPL+CWS (DetoxTM); і (d) Montanide ISA;

(3) сапонінові ад'юванти, такі як (див., наприклад, патент США 5,057,540) або частинки, отримані з них, такі як ISCOM (імуностимулюючі комплекси, утворені комбінацією холестерину, сапоніну, фосфоліпиду і амфіпатичних білків) і Iscomatrix® (що має по суті ту ж структуру, що і ISCOM, але без білка);

(4) бактеріальні ліпополісахариди, синтетичні аналоги ліпиду А, такі як аміноалкілглюкозамінфосфатні сполуки (AGP) або їх похідні або аналоги, які доступні від Corixa і які описані в патенті США 6,113,918; одним з таких AGP є 2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]етил 2-дезоксид-4-О-фосфоно-3-О-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїл]-2-[(R)-3-тетрадеканоїлокситетрадеканоїламіно]-b-D-глюкопіранозид, який також відомий як 529 (раніше відомий як RC529), приготований в формі водного розчину або у вигляді стабільної емульсії,

(5) синтетичні полінуклеотиди, такі як олігонуклеотиди, що містять мотив(и) CpG (патент США 6,207,646); і

(6) цитокіни, такі як інтерлейкіни (наприклад, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 і т. д.), інтерферони (наприклад, гамма-інтерферон), колонієстимулюючий фактор гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF), колонієстимулюючий фактор макрофагів (M-CSF), фактор некрозу пухлин (TNF), костимулюючі молекули B7-1 і B7-2 і т. д.; і

(7) комплемент, такий як тример компонента комплементу C3d.

У іншому варіанті здійснення ад'ювант являє собою суміш 2, 3 або більше з вищезгаданих ад'ювантів, наприклад, SBAS2 (емульсію масло-в-воді, також що містить 3-деацильований

монофосфорил-ліпід A і QS21).

Мурамільні пептиди включають, без обмеження, N-ацетил-мураміл-L-треоніл-D-ізоглутамін (thr-MDP), N-ацетил-нормураміл-L-аланін-2-(1'-2'-дипальмітоїл-sn)-гліцеро-3-гідроксифосфорилокси)етиламін (MTP-PE) і інш.

У певних варіантах здійснення ад'ювант являє собою сіль алюмінію. Ад'ювант на основі солі алюмінію може являти собою осажену галунами вакцину або адсорбовану галунами вакцину. Ад'юванти з сіллю алюмінію добре відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Harlow, E. і D. Lane (1988; *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory) і Nicklas, W. (1992; *Aluminum salts. Research in Immunology* 143:489-493). Сіль алюмінію включає, без обмеження, гідратований оксид алюмінію, гідрат оксиду алюмінію, тригідрат оксиду алюмінію (ATH), гідрат алюмінію, тригідрат алюмінію, альгідрогель, Superfos, амфогель, гідроксид алюмінію (III), гідроксифосфат сульфат алюмінію, ад'ювант на основі фосфату алюмінію (APA), аморфний оксид алюмінію, тригідратований оксид алюмінію або тригідроксіалюміній.

APA являє собою водну суспензію гідроксифосфату алюмінію. APA отримують змішуванням хлориду алюмінію і фосфату натрію в об'ємному відношенні 1:1 для осаження гідроксифосфату алюмінію. Після процесу змішування матеріал подрібнюють за допомогою змішувача з високим зсувним зусиллям для досягнення монодисперсного розподілу частинок по розмірах. Потім продукт піддають діалізації проти фізіологічного розчину і стерилізують парою.

У деяких варіантах здійснення для адсорбції білків використовується комерційно доступний $Al(OH)_3$ (наприклад, Alhydrogel або Superfos of Denmark/Accurate Chemical і Scientific Co., Westbury, NY) в співвідношенні 50-200 мкг білка/мг гідроксиду алюмінію. Адсорбція білка, в іншому варіанті здійснення, залежить від значення pI (ізоелектричного pH) білка і pH середовища. Білок з більш низьким значенням pI адсорбується на позитивно заряджений іон алюмінію сильніше, ніж білок з більш високим значенням pI . Солі алюмінію можуть утворювати депо антигену, який повільно вивільняється протягом 2-3 тижнів, брати участь в неспецифічній активації макрофагів і активації комплементу і/або стимулювати механізм природженого імунітету (можливо, за допомогою стимуляції сечової кислоти). Див., наприклад, Lambrecht et al., 2009, *Curr Opin Immunol* 21:23.

Вихідні водні розчини одновалентних кон'югатів, як правило, змішують разом і розбавляють до цільових значень, що становлять 4 мкг/мл для всіх серотипів, крім 6B, який розбавляють до цільового значення, що становить 8 мкг/мл. Після розбавлення партію стерилізують на фільтрі і додають асептично рівний об'єм ад'юванта на основі фосфату алюмінію для досягнення кінцевої концентрації алюмінію 250 мкг/мл. Приготовану партію з ад'ювантом розливають в одноразові флакони по 0,5 мл на дозу.

У деяких варіантах здійснення ад'ювант являє собою CpG-вмісну нуклеотидну послідовність, наприклад, CpG-вмісний олігонуклеотид, що зокрема CpG-містить олігодезоксинуклеотид (CpG ODN). У іншому варіанті здійснення ад'ювант являє собою ODN 1826, який можна придбати у Coley Pharmaceutical Group.

Способи застосування CpG-олігонуклеотидів добре відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Sur et al., 1999, *J Immunol.* 162:6284-93; Verthelyi, 2006, *Methods Mol Med.* 127:139-58; і Yasuda et al., 2006, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 23:89-110.

В альтернативних варіантах здійснення імуногенна композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, розкритих в даному описі, наприклад, в будь-якому з варіантів здійснення E1-E20 або в будь-якому їх підваріанті, і не містить ад'ювант.

Склади

Композиція за винаходом може бути надана у флаконах з одиничною дозою, флаконах з множиною доз або в попередньо заповнених скляних або пластикових шприцах.

У іншому варіанті здійснення композиції за даним винаходом вводять перорально і, таким чином, надають в формі, прийнятній для перорального введення, тобто у вигляді твердого або рідкого препарату. Тверді пероральні склади включають таблетки, капсули, пілулі, гранули, пелети і т. п. Рідкі пероральні склади включають розчини, суспензії, дисперсії, емульсії, масла і т. п.

Фармацевтично прийнятні носії для рідких складів являють собою водні або неводні розчини, суспензії, емульсії або масла. Прикладами неводних розчинників є пропіленгліколь, поліетиленгліколь і ін'єктовані органічні складні ефіри, такі як етилолеат. Водні носії включають воду, спиртові/водні розчини, емульсії або суспензії, включаючи фізіологічний розчин і забуферені середовища. Прикладами масел є масла тваринного, олії рослинного або масла синтетичного походження, наприклад, арахісова олія, соєва олія, оливкова олія, соняшникова олія, риба'чий жир, інше масло морського походження або ліпід з молока або яєць.

Фармацевтична композиція може бути ізотонічною, гіпотонічною або гіпертонічною. Однак часто переважно, щоб при введенні фармацевтична композиція для інфузії або ін'єкції була, по суті, ізотонічною. Отже, для зберігання фармацевтична композиція переважно може бути ізотонічною або гіпертонічною. Якщо для зберігання використовується гіпертонічна фармацевтична композиція, перед введенням вона може бути розбавлена до ізотонічного розчину.

Ізотонічний агент може являти собою іонний ізотонічний агент, такий як сіль, або неіонний ізотонічний агент, такий як вуглевод. Приклади іонних ізотонічних агентів включають, без обмеження, NaCl, CaCl₂, KCl і MgCl₂. Приклади неіонних ізотонічних агентів включають, без обмеження, маніт, сорбіт і гліцерин.

Також переважно, щоб щонайменше одна фармацевтично прийнятна добавка являла собою буфер. Для деяких цілей, наприклад, коли фармацевтична композиція призначена для інфузії або ін'єкції, часто бажано, щоб композиція містила буфер, який здатний буферизувати розчин до pH в діапазоні від 4 до 10, наприклад 5 до 9, наприклад від 6 до 8.

Буфер, наприклад, може бути вибраний з групи, яка складається з TRIS, ацетатного, глутаматного, лактатного, малеатного, тартратного, фосфатного, цитратного, карбонатного, гліцинатного, гістидинового, гліцинового, сукцинатного і триетаноламінового буфера.

Буфер може бути вибраний з USP-сумісних буферів для парентерального застосування, зокрема, коли фармацевтична композиція призначена для парентерального застосування. Наприклад, буфер може бути вибраний з групи, яка складається з одноосновних кислот, таких як оцтова, бензойна, глюконова, гліцерінова і молочна; двоосновних кислот, таких як аконитова, адипінова, аскорбінова, вугільна, глутамінова, яблучна, янтарна і винна, багатоосновних кислот, таких як лимонна і фосфорна; і основ, таких як аміак, діетаноламін, гліцин, триетаноламін і TRIS.

Парентеральні носії (для підшкірних, внутрішньовенних, внутрішньоартеріальних або внутрішньом'язових ін'єкцій) включають розчин хлориду натрію, декстрозу Рінгера, декстрозу і хлориду натрію, лактат Рінгера і жирні масла. Носії для внутрішньовенного введення включають рідини і поживні добавки, електролітні добавки, такі як основані на декстрозі Рінгера, і т. п. Прикладами є стерильні рідини, такі як вода і масла, з додаванням або без додавання поверхнево-активної речовини і інших фармацевтично прийнятних ад'ювантів. У загальному випадку, переважними рідкими носіями є вода, сольовий розчин, водні розчини декстрози і споріднених цукрів, гліколів, такі як пропіленгліколь або поліетиленгліколь, полісорбату 80 (PS-80), полісорбату 20 (PS-20) і полоксамера 188 (P188), зокрема, для розчинів для ін'єкцій. Прикладами масел є масла тваринного, олії рослинного або масла синтетичного походження, наприклад, арахісова олія, соєва олія, оливкова олія, соняшникова олія, риба'чий жир, інше масло морського походження або ліпід з молока або яєць.

Склади за винаходом також можуть містити поверхнево-активну речовину. Переважні поверхнево-активні речовини включають, без обмеження, поверхнево-активні речовини на основі складного ефіру поліоксіетиленсорбітану (які звичайно називаються Твінами), особливо PS-20 і PS-80; співполімери етиленоксиду (EO), пропіленоксиду (PO) і/або бутіленоксиду (BO), що продаються під торгової маркою DOWFAX™, такі як лінійні блок-співполімери EO/PO; октоксисіноли, які можуть відрізнятися по кількості повторюваних етоксі(оксі-1,2-етандііл) груп, при цьому практичний інтерес представляє октоксисінол-9 (тритон X-100 або трет-октилфеноксиполіетоксіетанол); (октилфеноксиполіетоксіетанол (40); фосфоліпіди, такі як фосфатидилхолін (лецитин); етоксилати нонілфенолу, такі як серії Tergitol™ NP; прості поліоксіетиленові ефіри жирних спиртів, отримані з лаурилових, цетилових, стеарилових і олеїлових спиртів (відомі як поверхнево-активні речовини Brij), такі як монолауриловий ефір триетиленгліколю (Brij 30); і складні ефіри сорбітану (звичайно відомі як SPAN), такі як сорбітантриолеат (Span 85) і сорбітанмонолаурат. Переважною поверхнево-активною речовиною для включення в емульсію є PS-80.

Можуть бути використані суміші поверхнево-активних речовин, наприклад, суміші PS-80/Span 85. Також придатна комбінація складного ефіру поліоксіетиленсорбітану, такого як моноолеат поліоксіетиленсорбітану (PS-80), і октоксисінолу, такого як трет-октилфеноксиполіетоксіетанол (Тритон X-100). Інша корисна комбінація включає лаурет 9 плюс складний ефір поліоксіетиленсорбітану і/або октоксисінолу.

Переважними кількостями поверхнево-активних речовин (% по масі) є: від 0,01 до 1 % для складного ефіру поліоксіетиленсорбітану (таких як PS-80), зокрема, приблизно 0,1 %; від 0,001 до 0,1 % для октил- або нонілфеноксиполіоксіетанолів (таких як Тритон X-100 або інші детергентів серії Тритон), зокрема від 0,005 до 0,02 %; від 0,1 до 20 % для простих ефірів поліоксіетилену (таких як лаурет 9), переважно від 0,1 до 10 % і, зокрема, від 0,1 до 1 % або

приблизно 0,5 %.

У деяких варіантах здійснення композиція по суті складається з гістидину (20 мМ), фізіологічного розчину (150 мМ) і 0,2 % PS-20 або 0,04 % PS-80 з pH=5,8 з 250 мкг/мл APA (ад'юванта на основі фосфату алюмінію). Вміст PS-20 може варіювати в межах від 0,005 % до 0,3 % (мас./об.), де присутність PS-20 або PS-80 в складі дозволяє контролювати агрегацію під час імітації приготування і транспортування з використанням первинної упаковки. У іншому варіанті здійснення PS-20 може знаходитися в діапазоні від 0,025 % до 0,8 % (мас./об.). У іншому варіанті здійснення PS-20 може складати від 0,05 % до 0,8 % (мас./об.). У іншому варіанті здійснення PS-20 може складати від 0,05 % до 0,2 % (мас./об.). Процес складається з комбінування до 24 серотипів в гістидині, фізіологічному розчині і PS-20 або PS-80, а потім комбінування цього змішаного матеріалу з APA і фізіологічним розчином з антимікробними консервантами або без них.

У конкретних варіантах здійснення полівалентна імуногенна композиція містить *S. pneumoniae* полісахарид-білкові кон'югати, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи в *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатах містять будь-який з наборів серотипів, наведених в даному описі, і додатково містять 20-80 мМ гістидину, pH 5,8 і 150 мМ NaCl. У деяких варіантах здійснення полівалентна імуногенна композиція додатково містить від 0,2 до 0,8 % мас./об. полісорбату 20.

Для оптимізації різних лікарських препаратів і лікарських речовин може бути потрібен вибір поверхнево-активної речовини. Для полівалентних вакцин, що мають 15 або більше серотипів, переважними є PS-20 і P188. Вибір хімічного складу, що використовується для отримання кон'югата, також може відігравати важливу роль в стабілізації складу. Зокрема, коли реакції кон'югації, що використовуються для отримання різних полісахарид-білкових кон'югатів в полівалентній композиції, включають як водний розчинник, так і розчинник ДМСО, стабільність в істотній мірі залежить від конкретної системи поверхнево-активних речовин. Підвищену стабільність полісахарид-білкових кон'югатів спостерігали з одним полісорбатом 20 або з поллоксамером 188 в поєднанні з поліолом.

Точний механізм того, яким чином конкретний детергент захищає біотерапевтичний засіб, погано вивчений і не може бути передбачений априорі. Можливі механізми стабілізації включають переважну гідратацію, переважне невідмкнення, конкуренцію на поверхні розділення повітря/рідини між біотерапевтичним засобом і поверхнею, поверхневий натяг і/або пряму асоціацію детергента з біотерапевтичним засобом для маскування гідрофобних плям, які служать як затравка агрегації.

У композиціях за винаходом також може бути використаний поллоксамер. Поллоксамер являє собою неіонну триблок-співполімер, що складається з центрального гідрофобного ланцюга поліоксипропілену (полі(пропіленоксиду)), фланкованого двома гідрофільними ланцюгами поліоксіетилену (полі(етиленоксиду)). Поллоксамери також відомі під торговою маркою Pluronic®. Оскільки довжини полімерних блоків можна регулювати, існує багато різних поллоксамерів, які злегка відрізняються по своїх властивостях. Співполімери, об'єднані загальним терміном "поллоксамер", звичайно означають буквою "P" (для поллоксамера), за якою йдуть три цифри, перші дві цифри x100 дають приблизну молекулярну масу поліоксипропіленового ядра, а остання цифра x10 дає процентний вміст поліоксіетилену (наприклад, P407=поллоксамер з молекулярною масою поліоксипропілену 4000 г/моль і 70 % вмістом поліоксіетилену). Для торгової марки Pluronic® кодування таких співполімерів починається з букви, що визначає фізичну форму співполімера при кімнатній температурі (L=рідина, P=паста, F=пластівці (тверда речовина)), за якою йдуть дві або три цифри. Перша цифра (дві цифри в тризначному числі) в числовому позначенні, помножена на 300, вказує приблизну молекулярну масу гідрофоба; і остання цифра x10 показує процентний вміст поліоксіетилену (наприклад, L61=Pluronic® з молекулярною масою поліоксипропілену 1800 г/моль і 10 % вмістом поліоксіетилену). Див. патент США 3740421.

Приклади поллоксамерів мають загальну формулу: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, де блоки a і b мають наступні значення:

Pluronic®	Поллоксамер	A	B:	Молекулярна маса
		2	16	1100 (середня)
				1900 (середня)
	124	12	20	2090-2360
				2900 (середня)
				2800 (середня)
				4400 (середня)

		20	70	5750 (середня)
	188	80	27	7680-9510
	237	64	37	6840-8830
	338	141	44	12700-17400
	407	101	56	9840-14600

Використовувані в даному описі одиниці вимірювання молекулярної маси подані в Дальтонах (Да) або г/моль.

5 Переважно полоксамер звичайно має молекулярну масу в діапазоні від Полоксамер може бути вибраний з полоксамера 188 або полоксамера 407. Кінцева концентрація полоксамера в складах складає від до 1 % мас./об. У певних аспектах поліол являє собою пропіленгліколь і знаходиться в кінцевій концентрації від 1 % до 20 % мас./об. У певних аспектах поліол являє собою поліетиленгліколь 400 і знаходиться в кінцевій концентрації від 1 % до 20 % мас./об.

10 Прийнятними поліолами для складів за винаходом є полімерні поліоли, зокрема прості поліефірдіоли, включаючи, без обмеження, пропіленгліколь і поліетиленгліколь, монометиліві ефіри поліетиленгліколю. Пропіленгліколь доступний в діапазоні молекулярної маси мономера від ~425 до ~2700. Поліетиленгліколь і монометиліві ефір поліетиленгліколю також доступні в діапазоні молекулярної маси від ~200 до ~35000, включаючи, без обмеження, PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 і PEG MME 4000. Переважним поліетиленгліколем є поліетиленгліколь 400. Кінцева концентрація поліола в складах за винаходом може складати від 1 до 20 % мас./об. або від 6 до 20 % мас./об.

20 Склад також містить рН-буферний сольовий розчин. Буфер може бути вибраний, наприклад, з групи, яка складається з тріс, ацетатного, глутаматного, лактатного, малеатного, тартратного, фосфатного, цитратного, карбонатного, гліцинатного, гістидинового, гліцинового, сукцинатного, HEPES (4-(2-гідроксietил)-1-піперазинетансульфонова кислота), MOPS (3-(N-морфоліно)пропансульфонова кислота), MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота) і триетаноламінного буферів. Буфер здатний буферизувати розчин до рН в діапазоні від 4 до 10, від 5,2 до 7,5 або від 5,8 до 7,0. У певному аспекті винаходу буфер вибирають з групи, яка складається з фосфату, сукцинату, гістидину, MES, MOPS, HEPES, ацетату або цитрату. Крім того, буфер може бути вибраний, наприклад, з USP-сумісних буферів для парентерального застосування, зокрема, коли фармацевтична композиція призначена для парентерального застосування. Концентрації буфера можуть варіювати від 1 мМ до 100 мМ. Концентрації буфера можуть варіювати від 10 мМ до 80 мМ. Концентрації буфера можуть варіювати від 1 до 50 мМ або від 5 до 50 мМ. У певних аспектах буфер являє собою гістидин в кінцевій концентрації від 5 мМ до 50 мМ або сукцинат в кінцевій концентрації від 1 мМ до 10 мМ. У певних аспектах гістидин має кінцеву концентрацію 20 мМ $\pm$ 2 мМ.

30 Хоча сольовий розчин (тобто розчин, що містить NaCl) є переважним, інші солі, які відповідають для приготування складу, включають, без обмеження, CaCl₂, KCl і MgCl₂ і їх комбінації. Замість солі можуть бути використані неіонні ізотонічні агенти, включаючи, без обмеження, сахарозу, трегалозу, маніт, сорбіт і гліцерин. Прийнятні діапазони вмісти солі включають, без обмеження, від 25 до 500 мМ або від 40 до 170 мМ. У одному з аспектів сольовий розчин являє собою NaCl, необов'язково присутній в концентрації від 20 мМ до 170 мМ.

40 У переважному варіанті здійснення композиції містять L-гістидиновий буфер з хлоридом натрію.

45 У іншому варіанті здійснення фармацевтичну композицію доставляють в системі з контрольованим вивільненням. Наприклад, агент можна вводити шляхом внутрішньовенної інфузії, за допомогою трансдермального пластиру, ліпосом або іншими способами введення. У іншому варіанті використовуються полімерні матеріали; наприклад, в мікросферах або імплантатах.

50 Кількість кон'югата в кожній дозі вакцини вибирають таким, щоб вона викликала імунотективну відповідь без значних побічних ефектів. Така кількість може варіювати залежно від пневмококового серотипу. Звичайно для полісахаридних кон'югатів кожна доза кожного полісахариду буде складати від 0,08 до 100 мкг. У деяких варіантах здійснення винаходу доза кожного полісахаридного кон'югата складає від 0,08 до 10 мкг. У інших варіантах здійснення доза складає від 1 до 5 мкг, від 0,4 до 4 мкг, від 0,4 до 3 мкг, від 0,4 до 2 мкг або від 0,4 до 1 мкг. У деяких варіантах здійснення доза одного або більше полісахаридних кон'югатів складає 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 або 750 мкг або 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 або 100 мкг.

55 В деяких варіантах здійснення композицій за винаходом всі полісахаридні кон'югати присутні

в композиції в однаковій кількості. У інших варіантах здійснення полісахаридні кон'югати присутні в композиції в різних кількостях (тобто, щонайменше, один полісахаридний кон'югат присутній в кількості, яка відрізняється від кількості одного або більше інших полісахаридних кон'югатів в композиції).

Оптимальна кількість компонентів для конкретної вакцини може бути встановлена за допомогою стандартних досліджень, що включають спостереження відповідних імунних відповідей у суб'єктів. Наприклад, в іншому варіанті здійснення дозу для вакцинації людини визначають шляхом екстраполяції даних, отриманих в проведених на тваринах дослідженнях, на людину. У іншому варіанті здійснення, дозу визначають дослідним шляхом.

У одному з варіантів здійснення доза солі алюмінію складає 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500 або 700 мкг, або 1, 1,2, 1,5, 2, 3, 5 мг або більше. У ще одному варіанті здійснення доза солі алюмінію, описана вище, наведена на мкг рекомбінантного білка.

Композиції за даним винаходом також можуть включати один або більше білків *S. pneumoniae*. Приклади білків *S. pneumoniae*, прийнятних для включення, включають білки, які ідентифіковані в публікаціях міжнародних заявок на патент WO 02/083855 і WO 02/053761.

В певних варіантах здійснення композиції за винаходом вводять суб'єкту одним або більше способами, відомими фахівцям в даній галузі, наприклад, парентерально, трансмукозально, трансдермально, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньонозально, підшкірно, внутрішньоочеревинно, і приготовані у вигляді відповідних складів. У одному з варіантів здійснення композиції за даним винаходом вводять шляхом епідермальної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, внутрішньовенної, внутрішньоартеріальної, підшкірної ін'єкції або інтра-респіраторної ін'єкції рідкого препарату в слизову оболонку дихального тракту. Рідкі склади для ін'єкцій включають розчини і т. п.

III. Способи приготування

Капсульні полісахариди *Streptococcus pneumoniae* можуть бути отримані стандартними способами, відомими фахівцям в даній галузі. Наприклад, полісахариди можуть бути виділені з бактерій і доведені до певного розміру відомими способами (див., наприклад, європейські патенти EP497524 і EP497525); і переважно мікрофлюїдизацією з допомогою гомогенізатора або хімічним гідролізом. У одному з варіантів здійснення кожний пневмококовий полісахаридний серотип вирощують в середовищі на основі сої. Потім окремі полісахариди очищають, використовуючи стандартні етапи, включаючи центрифугування, осадження і ультрафільтрацію. Див., наприклад, публікацію заявки на патент США № 2008/0286838 і патент США № 5,847,112. Розміри полісахаридів можуть бути змінені для зменшення в'язкості в зразках полісахаридів і/або для поліпшення фільтрованості кон'югованих продуктів за допомогою механічних або хімічних способів отримання потрібного розміру. Хімічний гідроліз можна виконувати за допомогою оцтової кислоти. Механічний спосіб отримання потрібного розміру може бути виконаний за допомогою гомогенізації під високим тиском.

Очищені полісахариди можуть бути хімічно активовані, щоб сахариди могли реагувати з білком-носієм. Очищені полісахариди можуть бути зв'язані з лінкером. Після активації або зв'язування з лінкером кожний капсульний полісахарид окремо кон'югують з білком-носієм з утворенням глікокон'югата. Полісахаридні кон'югати можуть бути отримані відомими методами поєднання.

Полісахарид може бути зв'язаний з лінкером з утворенням проміжної сполуки полісахарид-лінкер, в якій вільний кінець лінкера являє собою складноефірну групу. Отже, лінкер являє собою лінкер, в якому щонайменше один кінець є складноефірною групою. Інший кінець вибирають таким чином, щоб він міг реагувати з полісахаридом з утворенням проміжної сполуки полісахарид-лінкер.

Полісахарид може бути зв'язаний з лінкером через первинну аміногрупу в полісахариді. У цьому випадку лінкер звичайно має складноефірну групу на обох кінцях. Це дозволяє здійснювати зв'язування через взаємодію однієї з складноефірних груп з первинною аміногрупою полісахариду по механізму нуклеофільного заміщення в ацильній групі. В результаті реакції утворюється проміжна сполука полісахарид-лінкер, в якій полісахарид зв'язаний з лінкером через амідний зв'язок. Отже, лінкер являє собою біфункціональну лінкер, у якого перша складноефірна група бере участь в реакції з первинною аміногрупою полісахариду, а друга складноефірна група бере участь в реакції з первинною аміногрупою молекули-носія. Типовим лінкером є N-гідроксисукцинімідний діефір адипінової кислоти (SIDEA).

Зв'язування також може відбуватися опосередковано, тобто через додатковий лінкер, який використовується для дериватизації полісахариду перед зв'язуванням з лінкером.

Полісахарид зв'язують з додатковим лінкером з участю карбонільної групи на відновлювальному кінці полісахариду. Ця реакція поєднання складається з двох етапів: (a1)

взаємодія карбонільної групи з додатковим лінкером; і (а2) взаємодія вільного кінця додаткового лінкера з лінкером. У цих варіантах здійснення додатковий лінкер звичайно має первинну аміногрупу на обох кінцях, що дозволяє здійснити етап (а1) через взаємодію однієї з первинних аміногруп з карбонільною групою полісахариду по механізму відновного амінування.

Використовується первинна аміногрупа, яка реагує з карбонільною групою полісахариду. Прийнятними є гідразидні групи або гідроксиламіногрупи. На обох кінцях додаткового лінкера звичайно присутні однакові первинні аміногрупи. В результаті реакції утворюється проміжна сполука полісахарид-додатковий лінкер, в якій полісахарид зв'язаний з додатковим лінкером через зв'язок C-N.

Полісахарид може бути зв'язаний з додатковим лінкером за допомогою іншої групи в полісахариді, зокрема карбоксильної групи. Ця реакція поєднання складається з двох етапів: (а1) взаємодія групи з додатковим лінкером; і (а2) взаємодія вільного кінця додаткового лінкера з лінкером. У цьому випадку додатковий лінкер звичайно має на обох кінцях первинну аміногрупу, що дозволяє здійснити етап (а1) через взаємодію однієї з первинних аміногруп з карбоксильною групою полісахариду шляхом активації EDAC. Використовується первинна аміногрупа, яка реагує з EDAC-активованою карбоксильною групою в полісахариді. Підходить гідразидна група. На обох кінцях додаткового лінкера звичайно присутні однакові первинні аміногрупи. В результаті реакції утворюється проміжна сполука полісахарид-додатковий лінкер, в якій полісахарид зв'язаний з додатковим лінкером через амідний зв'язок.

У одному з варіантів здійснення хімічна активація полісахаридів і подальша кон'югація з білком-носієм по механізму відновного амінування може бути досягнута за допомогою засобів, описаних в патентах США 4,365,170, 4,673,574 і 4,902,506, публікаціях заявок на патент США 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 і 2007/0184071, і WO2006/110381, WO2008/079653, і WO2008/143709). Хімія може включати активацію пневмококового полісахариду через взаємодію з будь-яким окисником, який окиснює кінцеву гідроксильну групу до альдегіду, таким як періодат (включаючи періодат натрію, періодат калію або періодну кислоту). Реакція приводить до випадкового окиснювального розщеплення віцинальних гідроксильних груп вуглеводів з утворенням реакційноздатних альдегідних груп.

Реакція поєднання з білком-носієм протікає по механізму відновного амінування через пряме амінування в залишках лізину білка. Наприклад, кон'югування може бути здійснене через взаємодію суміші активованого полісахариду і білка-носія з відновником, таким як ціаноборогідрид натрію, в присутності нікелю. Реакція кон'югації може відбуватися у водному розчині або в присутності ДМСО. Див., наприклад, US2015/0231270, US2011/0195086 і EP 0471 177 B1. Потім альдегіди, які не прореагували, кепірують додаванням сильного відновника, такого як боргідрид натрію.

Відновне амінування включає два етапи: (1) окиснення полісахариду з утворенням реакційноздатних альдегідів, (2) відновлення іміну (основи Шиффа), що утворюється між активованим полісахаридом і білком-носієм, з утворенням стабільного амінного кон'югатного зв'язку. Перед окисненням розмір полісахариду необов'язково зменшується. Можуть використовуватися механічні методи (наприклад, гомогенізація) або хімічний гідроліз. Хімічний гідроліз може бути виконаний з використанням оцтової кислоти. Стадія окиснення може включати реакцію з періодатом. У контексті даного винаходу термін "періодат" включає як періодат, так і періодну кислоту; термін також включає як метаперіодат (IO_4^-), так і ортоперіодат (IO_6^-) і включає різні солі періодату (наприклад, періодат натрію і періодат калію). В одному з варіантів здійснення капсульний полісахарид окиснюється в присутності метаперіодату, переважно в присутності періодата натрію (NaIO_4). В іншому варіанті здійснення капсульний полісахарид окиснюється в присутності ортоперіодату, переважно в присутності періодної кислоти.

У одному з варіантів здійснення окиснювальний агент являє собою стабільне нітрокисильну або нітроксидну радикальну сполуку, таку як піперидин-N-окси- або піролідін-N-окси-сполука, в присутності окисника для селективного окиснення первинних гідроксилів (як описано в WO 2014/097099). У вказаній реакції дійсним окисником в каталітичному циклі є сіль N-оксоамонію. У одному з аспектів вказані стабільні нітрокисильні або нітроксидні радикальні сполуки являють собою піперидин-N-окси- або піролідін-N-окси-сполуки. У одному з аспектів вказана стабільна нітрокисильна або нітроксидна радикальна сполука має фрагмент TEMPO (2,2,6,6-тетраметил-1-піперидинілокси) або PROXYL (2,2,5,5-тетраметил-1-піролідинілокси). У одному з аспектів вказане стабільна сполука з нітрокисильним радикалом являє собою TEMPO або його похідне. У одному з аспектів вказаний окисник являє собою молекулу, що містить N-галоген-вмісний фрагмент. У одному з аспектів вказаний окисник вибирають з групи, яка складається з N-хлорсукциніміду, N-бромсукциніміду, N-йодосукциніміду, дихлоризоціанурової кислоти, 1,2,3-

трихлор-1,2,5-триазинан-2,4,6-триону, дибромизоціанурової кислоти, 1,5-трибром-1,2,3-триазинан-2,4,6-триону, діодизоціанурової кислоти і 3,5-трийод-1,3,5-триазинан-2,4,6-триону. Переважно, вказаний окисник являє собою N-хлорсукцинімід.

У певних аспектах окиснювальний агент являє собою вільний радикала 2,2,6,6-тетраметил-1-піперидинілокси (TEMPO) і N-хлорсукцинімід (NCS) як співокисник (як описано в WO 2014/097099). Отже, в одному з аспектів глікокон'югати *S. pneumoniae* можна отримати способом, що включає етапи: а) взаємодії сахариду з 2,2,6,6-тетраметил-1-піперидинілокси (TEMPO) і N-хлорсукцинімідом (NCS) у водному розчиннику з отриманням активованого сахариду; і b) взаємодії активованого сахариду з білком-носієм, що містить одну або більше аміногруп (нижче вказаний спосіб позначений як "TEMPO/NCS-відновне амінування").

Необов'язково реакцію окиснення зупиняють додаванням гасильного агента. Гасильний агент може бути вибраний з віцинальних діолів, 1-, 2-аміноспиртів, амінокислот, глутатіону, сульфату, бісульфату, дитіоніту, метабісульфату, тіосульфату, фосфітів, гіпофосфітів або фосфористої кислоти (наприклад, гліцерину, етиленгліколю, пропан-1-,2-діолу, бутан-1,2-діолу або бутан-2,3-діолу, аскорбінової кислоти).

У деяких варіантах здійснення даній винахід стосується способу отримання кон'югата полісахариду серотипу 8 *Streptococcus pneumoniae* з білком результаті реакції кон'югації в апротонному розчиннику, при цьому в реакції кон'югації не використовується ціаноборогідрид. У інших варіантах здійснення реакція кон'югації являє собою відновлення по Шиффу або відновне амінування. У інших варіантах здійснення білок являє собою правцевий анатоксин, дифтерійний анатоксин або CRM197. У інших варіантах здійснення білок являє собою CRM197. У інших варіантах здійснення реакція кон'югації являє собою відновне амінування. У інших варіантах здійснення відновне амінування проводять в диметилсульфоксиді (ДМСО).

У деяких варіантах здійснення окиснені полісахариди перед кон'югацією мають молекулярну масу від 30 кДа до 1000 кДа. Молекулярна маса може бути визначена методом ексклюзійної хроматографії (SEC) в комбінації з багатокутним детектором розсіювання світла (MALS) і детектором показника заломлення (RI). У деяких варіантах здійснення полісахарид має молекулярну масу від 50 кДа до 300 кДа. У деяких варіантах здійснення полісахарид має молекулярну масу від 50 кДа до 1000 кДа. У додаткових варіантах здійснення полісахарид має молекулярну масу від 70 кДа до 900 кДа. У інших варіантах здійснення полісахарид має молекулярну масу від 100 кДа до Другим етапом процесу кон'югації є відновлення імінного зв'язку (основа Шиффа) між активованим полісахаридом і білком-носієм з утворенням стабільного зв'язку кон'югата (так зване відновне амінування) з використанням відновника. Прийнятні відновники включають ціаноборогідриди (такі як ціаноборогідрид натрію або борогідрид натрію). У одному з варіантів здійснення відновник являє собою ціаноборогідрид натрію.

У певних варіантах здійснення реакцію відновного амінування проводять в апротонному розчиннику (або суміші апротонних розчинників). У одному з варіантів здійснення реакцію відновлення проводять в розчиннику ДМСО або ДМФА (диметилформамід). Розчинник ДМСО або ДМФА може бути використаний для відновлення активованого полісахариду і білка-носія, якщо він ліофілізований. У одному з варіантів здійснення апротонний розчинник являє собою ДМСО.

У кінці реакції відновлення в кон'югатах можуть залишатися альдегідні групи, які не прореагували, які можуть бути кепіровані відповідним кепірувальним агентом. У одному з варіантів здійснення кепірувальний агент являє собою борогідрид натрію (NaBH_4). Прийнятні альтернативи включають триацетоксиборогідрид натрію або борогідрид натрію або цинку в присутності кислот Бренстеда або Льюїса, аміні борани, такі як піридин-боран, 2-піколін-боран, 2,6-диборан-метанол, диметиламін-боран, або 5-етил-2-метилпіридинборан (PEMB), або борогідридні обмінні смоли. Після кон'югації (реакції відновлення і, необов'язково, кепірування) глікокон'югати можуть бути очищені (збагачені по кількості полісахарид-білкового кон'югата) різними методами, відомими фахівцеві в даній галузі. Ці методи включають діаліз, операції концентрування/діафільтрації, фільтрацію в тангенціальному потоці, осадження/елюювання, колонкову хроматографію (іонообмінну хроматографію, мультимодальну іонообмінну хроматографію, DEAE або хроматографію гідрофобної взаємодії) і глибинну фільтрацію. У одному з варіантів здійснення глікокон'югати очищають діафільтрацією або іонообмінною хроматографією, або ексклюзійною хроматографією.

Глікокон'югати, отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, звичайно використовуються в полівалентних пневмококових кон'югатних вакцинах. Таким чином, в певних варіантах здійснення для полівалентних композицій, в яких не всі серотипи отримують в апротонному розчиннику, реакцію відновлення серотипів, що залишилися,

проводять у водному розчиннику (наприклад, вибраному з PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота), HEPES (4-(2-гідроксietил)-1-піперазинетансульфонова кислота), біс-тріс, ADA (N-(2-ацетамідо)імінодіоцтова кислота), PIPES (піперазин-N,N'-біс(2-етансульфонова кислота)), MOPSO (3-морфоліно-2-гідроксипропансульфонова кислота), BES (N,N'-біс(2-гідроксietил)-2-аміноетансульфонова кислота), MOPS (3-(N-морфоліно)пропансульфонокислота), DIPSO (3-біс(2-гідроксietил)аміно-2-гідроксипропан-1-сульфонокислота), MOBS (4-(N-морфоліно)бутансульфонокислота), HEPPSO (N-(2-гідроксietил)піперазин-N-(2-гідроксипропансульфонова кислота)), POPSO (піперазин-1,4-біс(2-гідрокси-3-пропансульфонова кислота)), TEA (триетаноламін), EPPS (4-(2-гідроксietил)піперазин-1-пропансульфонова кислота), біцину при pH від 6,0 і 8,5, 7,0 і 8,0 або 7,0 ідо 7,5).

Кон'югати капсульного полісахариду *S. pneumoniae* і білка, які можуть бути отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, включають, без обмеження, серотипи: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B і 39. Кон'югати капсульного полісахариду *S. pneumoniae* і білка, які можуть бути отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, включають, без обмеження, серотипи: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B і 39. Кон'югати капсульного полісахариду *S. pneumoniae* і білка, які можуть бути отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, включають, без обмеження, серотипи: 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B і 39. Полісахариди можуть бути використані в формі олігосахаридів. Їх зручно отримувати шляхом фрагментації очищеного полісахариду (наприклад, шляхом гідролізу), за яким звичайно йде очищення фрагментів необхідного розміру.

У деяких варіантах здійснення пневмококові полісахарид-білкові кон'югати одного або більше серотипів 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B і 39 отримують по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У деяких варіантах здійснення пневмококові полісахарид-білкові кон'югати одного або більше серотипів 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B і 39 отримують по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У деяких варіантах здійснення пневмококові полісахарид-білкові кон'югати одного або більше серотипів 3, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 31, 33F, 35B і 39 отримують по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У певних варіантах здійснення кожний з серотипів в полівалентній імуногенній композиції отримують по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У деяких варіантах здійснення полісахариди одного або більше серотипів в полівалентній композиції кон'юговані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику, і полісахариди одного або більше серотипів кон'юговані по механізму відновного амінування у водному розчиннику. У деяких варіантах здійснення полісахариди двох або більше серотипів в полівалентній композиції кон'юговані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У інших варіантах здійснення полісахариди трьох або більше, чотирьох або більше, п'яти або більше, шести або більше, семи або більше, восьми або більше, дев'яти або більше, десяти або більше, одинадцяти або більше, дванадцяти або більше, тринадцяти або більше, чотирнадцяти або більше, п'ятнадцяти або більше, шістнадцяти або більше, сімнадцяти або більше, вісімнадцяти або більше, дев'ятнадцяти або більше, двадцяти або більше або двадцяти одного або більше серотипів в полівалентній композиції кон'юговані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. У певних варіантах здійснення полісахариди одного або більше серотипів в полівалентній композиції кон'юговані за допомогою інших хімічних сполук, які можуть знаходитися в апротонному розчиннику або у водному розчиннику.

Таким чином, винахід стосується полівалентної імуногенної композиції, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, кожний з яких містить капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* є такими, як розкрито в даному описі (тобто в розділі II, "Полівалентні імуногенні композиції"), при цьому реакція кон'югації, в результаті якої відбувається кон'югація полісахариду одного або більше полісахарид-білкових кон'югатів з білком-носієм, відбувається в апротонному розчиннику. У деяких варіантах здійснення, щонайменше, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 % серотипів в полівалентній композиції отримують в апротонному розчиннику. Інші серотипи отримують з використанням альтернативної хімії і/або у водному розчиннику.

Несподівано було встановлено, що застосування ДМСО як розчинник під час відновного

амінування полісахарид-білкових кон'югатів приводить до високої стабільності і підвищеної імуногенності цих серотипів порівняно з тими ж кон'югатами, отриманими у водних умовах (див. заявки США № 62/463,216 і 62/555,444). Як показано в даному описі (див. приклад 40), склади лікарських препаратів, які містять пневмококові кон'югати за винаходом, отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО), забезпечували високу фізичну і хімічну стабільність порівняно з вакциною, в якій використовувалися лікарські речовини, отримані в протонних (тобто водних) розчинниках під час відновного амінування в процесі кон'югації. Таким чином, в деяких варіантах здійснення всі кон'югати пневмококового полісахариду в полівалентній композиції отримують в апротонному розчиннику.

У певних варіантах здійснення винаходу загальна концентрація полісахариду в композиції складає від приблизно 0,02 до приблизно 0,175 мг/мл. У певних варіантах здійснення винаходу загальна концентрація полісахариду в композиції складає від приблизно 0,03 до приблизно 0,175 мг/мл. У певних варіантах здійснення винаходу загальна концентрація полісахариду в композиції складає від приблизно 0,04 до приблизно 0,175 мг/мл. У інших варіантах здійснення загальна концентрація полісахариду в композиції складає від приблизно 0,065 до приблизно 0,085 мг/мл, від приблизно 0,070 до приблизно 0,080 мг/мл, від приблизно 0,065 до приблизно 0,080 мг/мл, від приблизно 0,070 до приблизно 0,085 мг/мл, від приблизно 0,110 до приблизно 0,128 мг/мл, від приблизно 0,110 до приблизно 0,175 мг/мл, від приблизно 0,10 до приблизно 0,175 мг/мл, від приблизно 0,110 до приблизно 0,170 мг/мл, від приблизно 0,115 до приблизно 0,15 мг/мл, від приблизно 0,110 до приблизно 0,15 мг/мл, від приблизно 0,110 до приблизно 0,125 мг/мл, від приблизно 0,150 до приблизно 0,170 мг/мл, від приблизно 0,150 до приблизно 0,165 мг/мл, від приблизно 0,140 до приблизно 0,170 мг/мл, від приблизно 0,130 до приблизно 0,170 мг/мл, від приблизно 0,150 до приблизно 0,175 мг/мл, від приблизно 0,070 до приблизно 0,170 мг/мл, від приблизно 0,065 до приблизно 0,175 мг/мл або від приблизно 0,065 до приблизно 0,180 мг/мл.

У варіантах здійснення винаходу, де один або більше або всі полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику, загальна концентрація полісахариду в композиції стабільна протягом 4 тижнів або більше при 37 °С, 4 тижнів або більше при 25 °С і 12 тижнів або більше при 4 °С.

У певних варіантах здійснення винаходу, де один або більше або всі полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику, середньовагова молекулярна маса (Mw) всіх *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції (середнє значення для всіх кон'югатів в композиції) складає від приблизно 3500 до приблизно 4700 кДа, від приблизно 3500 до приблизно 4600 кДа, від приблизно 3500 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 3500 до приблизно 4400 кДа, від приблизно 3500 до приблизно 4300 кДа, від приблизно 3500 до приблизно 4200 кДа, від приблизно 3600 до приблизно 4700 кДа, від приблизно 3600 до приблизно 4600 кДа, від приблизно 3600 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 3600 до приблизно 4400 кДа, від приблизно 3600 до приблизно 4300 кДа, від приблизно 3600 до приблизно 4200 кДа, від приблизно 3700 до приблизно 4700 кДа, від приблизно 3700 до приблизно 4600 кДа, від приблизно 3700 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 3700 до приблизно 4400 кДа, від приблизно 3700 до приблизно 4300 кДа, від приблизно 3700 до приблизно 4200 кДа, від приблизно 3800 до приблизно 4700 кДа, від приблизно 3800 до приблизно 4600 кДа, від приблизно 3800 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 3800 до приблизно 4400 кДа, від приблизно 3800 до приблизно 4300 кДа, від приблизно 3800 до приблизно 4200 кДа, від приблизно 3900 до приблизно 4700 кДа, від приблизно 3900 до приблизно 4600 кДа, від приблизно 3900 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 3900 до приблизно 4400 кДа, від приблизно 3900 до приблизно 4300 кДа або від приблизно 3900 до приблизно 4200 кДа.

У деяких варіантах здійснення винаходу, в яких полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику, Mw кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції (для одного серотипу) складає від приблизно 1000 до приблизно 10000 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 5500 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 5600 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 5700 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 5800 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 5900 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 6000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 5500 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 5000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 4000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 4000 кДа або від приблизно 1000 до приблизно 3500 кДа. У інших варіантах здійснення Mw кон'югата одного серотипу в композиції становить приблизно 1000 кДа, приблизно 1100 кДа, приблизно 1200 кДа, приблизно 1300 кДа, приблизно 1400 кДа, приблизно 1500 кДа, приблизно 1600 кДа, приблизно

1700 кДа, приблизно 1800 кДа, приблизно 1900 кДа, приблизно 2000 кДа, приблизно 2100 кДа, приблизно 2200 кДа, приблизно 2300 кДа, приблизно 2400 кДа, приблизно 2500 кДа, приблизно 2600 кДа, приблизно 2700 кДа, приблизно 2800 кДа, приблизно 2900 кДа, приблизно 3000 кДа, приблизно 3100 кДа, приблизно 3200 кДа, приблизно 3300 кДа, приблизно 3400 кДа, приблизно 3500 кДа, приблизно 3600 кДа, приблизно 3700 кДа, приблизно 3800 кДа, приблизно 3900 кДа, приблизно 4000 кДа, приблизно 4100 кДа, приблизно 4200 кДа, приблизно 4200 кДа, приблизно 300 кДа, приблизно 4400 кДа, приблизно 4500 кДа, приблизно 4600 кДа, приблизно 4700 кДа, приблизно 4800 кДа, приблизно 4900 кДа, приблизно 5000 кДа, приблизно 5100 кДа, приблизно 5200 кДа, приблизно 5300 кДа, приблизно 5400 кДа або приблизно 5500 кДа.

У певних варіантах здійснення винаходу полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику. Композиції, що містять більш високий процент полісахаридів *S. pneumoniae*, кон'югованих з білком-носієм в апротонному розчиннику (на відміну від отримання в протонному розчиннику), можуть бути переважними. У деяких варіантах здійснення процент (розрахований як кількість полісахаридних серотипів, отриманих в апротонному розчиннику, ділене на загальну кількість полісахаридних серотипів, де загальна кількість включає серотипи, отримані в апротонному розчиннику або протонному розчиннику) кон'югатів певних серотипів *S. pneumoniae*, отриманих в апротонному розчиннику, може складати більше 50 % або більше 60 %, або більше 70 %, або більше 80 %, або більше 90 %, або становлять 100 %.

У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югат полісахариду серотипу 3 з білком в композиції отримують в апротонному розчиннику, і Mw вказаного кон'югата складає від приблизно 1000 до приблизно 5000 кДа або від приблизно 1000 до приблизно 4000 кДа, або від приблизно 1000 до приблизно 3000 кДа, або від приблизно 1000 до приблизно 2500 кДа, або від приблизно 1000 до приблизно 2000 кДа.

У певних варіантах здійснення винаходу, в яких один або більше або всі полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику, середньочислова молекулярна маса (Mn) *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції (середня для всіх кон'югатів в композиції) складає від приблизно 900 до приблизно 3000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 3000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 2500 кДа, від приблизно 1500 до приблизно 2500 кДа, від приблизно 1800 до приблизно 2500 кДа від приблизно 1900 до приблизно 2500 кДа або від приблизно 2000 до приблизно 2500 кДа.

У певних варіантах здійснення винаходу, в яких один або більше або всі полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику, Mn кожного з *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції (для одного серотипу) складає від приблизно 700 до приблизно 7000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 6000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 5000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 4000 кДа, від приблизно 1000 до приблизно 3000 кДа, від приблизно 900 до приблизно 5500 кДа, від приблизно 900 до приблизно 5000 кДа, від приблизно 900 до приблизно 4500 кДа, від приблизно 900 до приблизно 4000 кДа, від приблизно 900 до приблизно 3500 кДа або від приблизно 900 до приблизно 3000 кДа.

У варіантах здійснення винаходу Mw і/або Mn *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів в композиції залишається стабільним протягом 4 тижнів або більше при 37 °C, 4 тижнів або більше при 25 °C і/або 12 тижнів або більше при 4 °C.

У варіантах здійснення винаходу концентрацію полісахариду, Mw і/або Mn визначають з допомогою HPSEC UV/MALS/RI.

В деякому варіанті здійснення винаходу, в яких один або більше або всі полісахарид-білкові кон'югати в полівалентних імуногенних композиціях отримують в апротонному розчиннику, максимум випромінювання композиції, виміряний методом флуоресцентної спектроскопії з внутрішнім білком з довжиною хвилі збудження 280 нанометрів (нм), складає від приблизно 335 нм до приблизно 342 нм. У деяких варіантах здійснення максимум випромінювання зберігається в діапазоні від приблизно 335 нм до приблизно 342 нм, і інтенсивність флуоресценції залишається стабільною протягом щонайменше 1 тижня при 37 °C. У деяких варіантах здійснення максимум випромінювання зберігається в межах від приблизно 335 нм до приблизно 342 нм, і інтенсивність флуоресценції залишається стабільною протягом 1 тижня при 37 °C.

У деяких варіантах здійснення все кон'югати пневмококового полісахариду в полівалентній композиції отримують по механізму відновного амінування в ДМСО. У деяких підваріантах полівалентна композиція, що містить полісахаридні кон'югати, всі з яких були отримані в середовищі ДМСО, не містить ад'ювант.

Не обмежуючись якою-небудь теорією, один з можливих механізмів посилення імуногенності, що спостерігається у глікокон'югатів, отриманих в ДМСО, включає збільшення

кількості зв'язків між вуглеводом (капсульним полісахаридом) і залишками лізину на поверхні білка-носія, що може привести до додаткових точок приєднання білка до полісахариду, забезпечуючи стабільність і протидію хімічній деполімеризації або розриву пептидного вуглеводного зв'язку. Див., наприклад, Hsieh, Characterization of Saccharide-CRM197 Conjugate Vaccines in Brown F, Corbel M, Griffiths E (eds): *Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines*. Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol 103, pp. 93-104. Додатковою перевагою збільшення кількості полісахаридно-білкових зв'язків, які утворюються під час кон'югації в розчиннику ДМСО, можуть забезпечувати додаткові можливості для успішної презентації пептид-вуглеводів Т-клітинам. Потрібно розуміти, що через генетичну змінюваність в людській популяції, що приводить до появи різних здібностей і чутливості навантаження або зв'язків з конкретними пептидними послідовностями, кон'югованими з вуглеводними антигенами, такі додаткові точки приєднання до білка-носія дозволять збільшити шанси успішної презентації антигену на поверхні антигенпрезентуючої клітини (АРС), забезпечуючи Т-клітинно-залежну відповідь на інший Т-клітинно-незалежний антиген. Інший можливий механізм посилення імуногенності, що спостерігається при кон'югації в розчиннику ДМСО, може бути пов'язаний з денатурацією CRM197 в органічному розчиннику, в результаті якої оголюються додаткові залишки лізину, приводячи до утворення полісахаридних зв'язків, що збільшує шанси для презентації глікопептиду на поверхні АРС для Т-клітинно-залежної відповіді до різних пептидних епітопів. Див. Avci et al., 2011, *Nature Medicine* 17: 1602-1610.

Ще однією перевагою кон'югації в органічному розчиннику, що генерує денатурований CRM197 в кон'югатах, може бути зниження імунологічної інтерференції антитіл до нативних епітопів CRM197. Додатковою перевагою збільшення кількості полісахарид-білкових зв'язків, які утворюються під час кон'югації в розчиннику ДМСО, може бути утворення полісахарид-білкових кон'югатів більшого розміру, що приводить до посилення імуногенності. Вважається, що композиції за винаходом забезпечують значні переваги в ініціації реакції у людини.

У деяких варіантах здійснення реакцію кон'югації виконують по механізму відновного амінування, в якій використовується нікель для забезпечення більш ефективної реакції кон'югації і для видалення вільного ціаніду. Відомо, що перехідні метали утворюють стабільні комплекси з ціанідом і, як відомо, поліпшують відновне метилування аміногруп білка і формальдегіду за допомогою ціаноборогідриду натрію (S Gidley et al., *Biochem J.* 1982, 203: 331-334; Jentoft et al. *Anal Biochem.* 1980, 106: 186-190). Завдяки утворенню комплексу залишкового інгібуючого ціаніду додавання нікелю збільшує витрату білка під час кон'югації і приводить до утворення більших, потенційно більш імуногенних кон'югатів.

Відмінності у початкових рівнях ціанідів в партіях реагентів ціаноборогідриду натрію також приводять до суперечливих характеристик кон'югації, що приводить до різних характеристик продукту, таких як розмір кон'югата і відношення Ps-до-CRM197. Додавання нікелю зменшує змінюваність результатів реакції кон'югації за рахунок комплексоутворення ціаніду, усуваючи відмінності в партіях ціаноборогідриду натрію.

Прийнятні альтернативні хімічні сполуки включають активацію сахариду тетрафторборатом 1-ціано-4-диметиламінопіридинію (CDAP) з утворенням ефіру ціанату. Таким чином, активований сахарид може бути зв'язаний безпосередньо або через спейсерну (лінкерну) групу з аміногрупою на білку-носії. Наприклад, спейсер може являти собою цистамін або цистеамін для отримання тіолованого полісахариду, який може бути зв'язаний з носієм через тіоефірний зв'язок, отриманий в результаті реакції з малеїмід-активованим білком-носієм (наприклад, з використанням GMBS) або галогеном-ацетилованим білком-носієм (наприклад, з використанням йодацетиміду [наприклад, етил-йодоацетиміду HCl] або N-сукцинімідилбромацетату або SIAB, або SIA, або SBAP). Переважно ціанатний складний ефір (необов'язково отриманий за допомогою хімії CDAP) зв'язують з дигідазидом гександіаміну або адипінової кислоти (ADH), і амінопохідний сахарид кон'югують з білком-носієм з використанням хімії карбодіїміду (наприклад, EDAC або EDC) через карбоксильну групу на білку-носії. Такі кон'югати описані в публікаціях Міжнародних заявках на патент WO 93/15760, WO 95/08348 і WO 96/29094; і Chu et al., 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256.

В інших відповідних методах використовуються карбодіїміди, гідразиди, активний ефір, норборан, п-нітробензойна кислота, N-гідроксисукцинімід, S--NHS, EDC, TSTU. Багато з них описані в публікації міжнародної патентної заявки № WO 98/42721. Процес кон'югації може включати карбонільний лінкер, який може бути утворений в результаті реакції вільної гідроксильної групи сахариду CDI (Див. Bethell et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn et al., 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18) з подальшою реакцією з білком з утворенням карбаматного зв'язку. Це може включати відновлення аномерного кінця до первинної гідроксильної групи, необов'язковий захист/зняття захисту з первинної гідроксильної групи, реакцію первинної

гідроксильної групи з CDI з утворенням проміжної сполуки карбамату CDI і зв'язування проміжної сполуки карбамату CDI з аміногрупою білка.

Після кон'югації капсульного полісахариду з білком-носієм полісахарид-білкові кон'югати очищують (збагачують по кількості полісахарид-білкового кон'югата) одним або більше з множини способів. Приклади цих способів добре відомі фахівцям в даній галузі і включають операції концентрування/діафільтрації, ультрафільтрації, осадження/елюювання, колонкову хроматографію і глибинну фільтрацію. Див., наприклад, патент США № 6,146,902.

Після очищення окремих глікокон'югатів їх змішують з отриманням імуногенної композиції за даним винаходом. Ці пневмококові кон'югати отримують кожний окремо і змішують у вигляді складу одиничної дози.

Альтернативний спосіб характеристики глікокон'югатів за винаходом полягає в кількості залишків лізину в білку-носії (наприклад, CRM197), які стають кон'югованими з сахаридом, і цю кількість кон'югованих лізинів можна охарактеризувати у вигляді діапазону (ступінь кон'югації). Докази модифікації залишків лізину білка-носія за рахунок утворення ковалентних зв'язків з полісахаридами можуть бути отримані за допомогою амінокислотного аналізу за допомогою звичайних методів, відомих фахівцям в даній галузі. Кон'югація приводить до зменшення кількості відновлених залишків лізину порівняно з вихідним матеріалом білка-носія, що використовується для отримання кон'югатних матеріалів. У переважному варіанті здійснення ступінь кон'югації глікокон'югату за винаходом складає від 2 до 15, від 2 до 13, від 2 до 10, від 2 до 8, від 2 до 6, від 2 до 5, від 2 до 4 від 3 до 15, від 3 до 13, від 3 до 10, від 3 до 8, від 3 до 6, від 3 до 5, від 3 до 4, від 5 до 15, від 5 до 10, від 8 до 15 від 8 до 12, від 10 до 15 або від 10 до 12. У одному з варіантів здійснення ступінь кон'югації глікокон'югату за винаходом становить приблизно 2, приблизно 3, приблизно 4, приблизно 5, приблизно 6, приблизно 7, приблизно 8, приблизно 9, приблизно 10, приблизно 11, приблизно 12, приблизно 13 приблизно 14 або приблизно 15. У переважному варіанті здійснення ступінь кон'югації глікокон'югату за винаходом складає від 4 до 7. В деяких таких варіантах здійснення білок-носії являє собою CRM197.

Глікокон'югати композицій за винаходом також можуть бути охарактеризовані відношенням (мас./мас.) сахариду до білка-носія (Ps:Pr). У деяких варіантах здійснення відношення полісахариду до білка-носія в глікокон'югатах (мас./мас.) в композиції складає від 0,5 до 3,0 (наприклад, приблизно 0,5, приблизно 0,6, приблизно 0,7, приблизно 0,8, приблизно 0,9, приблизно 1,0, приблизно 1,1, приблизно 1,2, приблизно 1,3, приблизно 1,4, приблизно 1,5, приблизно 1,6, приблизно 1,7, приблизно 1,8, приблизно 1,9, приблизно 2,0, приблизно 2,1, приблизно 2,2, приблизно 2,3, приблизно 2,4, приблизно 2,5, приблизно 2,6, приблизно 2,7, приблизно 2,8, приблизно 2,9 або приблизно 3,0). У інших варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) складає від 0,5 до 2,5, від 0,5 до 1,5, від 0,8 до 2,5, від 0,5 до 1,0, від 1,0 до 1,5, від 1,0 до 2,0, від 0,8 до 2,4 від 0,8 до 2,3, від 0,8 до 2,2, від 0,8 до 2,1, від 0,8 до 2,0, від 0,8 до 1,9, від 0,8 до 1,8, від 0,8 до 1,7, від 0,8 до 1,6, від 0,8 до 1,5, від 0,8 до 1,4 від 0,8 до 1,3, від 0,9 до 2,4, від 0,9 до 2,3, від 0,9 до 2,2, від 0,9 до 2,1, від 0,9 до 2,0, від 0,9 до 1,9, від 0,9 до 1,8, від 0,9 до 1,7, від 0,9 до 1,6 від 0,9 до 1,5, від 0,9 до 1,4, від 0,9 до 1,3, від 0,9 до 1,2, від 1,0 до 2,4, від 1,0 до 2,3, від 1,0 до 2,2, від 1,0 до 2,1, від 1,0 до 2,0, від 1,0 до 1,9 від 1,0 до 1,8, від 1,0 до 1,7, від 1,0 до 1,6, від 1,0 до 1,5, від 1,0 до 1,4, від 1,0 до 1,3 або від 1,0 до 1,2. У інших варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) складає від 0,8 до 1,2. У деяких таких варіантах здійснення білок-носії являє собою CRM197. Глікокон'югати і імуногенні композиції за винаходом можуть містити вільний сахарид, який не кон'югований ковалентно з білком-носієм, але проте присутній в глікокон'югатній композиції. Вільний сахарид може бути нековалентно зв'язаний (тобто нековалентно приєднаний до, адсорбований або захоплений) з глікокон'югатом.

У конкретних варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для кон'югата серотипу 15A складає від приблизно 1,0 до приблизно 2,0, від приблизно 1,25 до приблизно 1,75 або від приблизно 1,3 до приблизно 1,7. У інших варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для серотипу 15A становить приблизно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 або 1,8.

У конкретних варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для кон'югата серотипу 15C складає від приблизно 1,0 до приблизно 2,0, від приблизно 1,25 до приблизно 1,75 або від приблизно 1,3 до приблизно 1,7. У інших варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для серотипу 15C становить приблизно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 або 1,8.

У конкретних варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для кон'югата серотипу 33F складає від приблизно 1,0 до приблизно 2,0, від приблизно 1,25 до приблизно 1,75 або від приблизно 1,3 до приблизно 1,7. У інших варіантах здійснення

відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для серотипу 33F становить приблизно 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7 або 1,8.

У конкретних варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для кон'югата серотипу 35В складає від приблизно 1,25 до приблизно 2,25, від приблизно 1,25 до приблизно 2,0 або від приблизно 1,3 до приблизно 1,8. У інших варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для серотипу 33В становить приблизно 1,2, 1,3, 1,3, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 або 2,0.

У конкретних варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для кон'югата серотипу 24F складає від приблизно 0,5 до приблизно 1,5, від приблизно 0,75 до приблизно 1,25 або від приблизно 0,8 до приблизно 1,0. У інших варіантах здійснення відношення сахариду до білка-носія (мас./мас.) для серотипу 24F становить приблизно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 або 1,0.

У переважному варіанті здійснення глікокон'югат містить менше приблизно 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 % або 15 % вільного полісахариду відносно загальної кількості полісахариду. У переважному варіанті здійснення глікокон'югат містить менше приблизно 25 % вільного полісахариду відносно загальної кількості полісахариду. У переважному варіанті здійснення глікокон'югат містить менше приблизно 20 % вільного полісахариду відносно загальної кількості полісахариду. У переважному варіанті здійснення глікокон'югат містить менше приблизно 15 % вільного полісахариду відносно загальної кількості полісахариду.

IV. Способи застосування

Варіанти здійснення винаходу також включають одну або більше полівалентних імуногенних композицій, розкритих в даному описі, (i) для застосування, (ii) для застосування як лікарський засіб або композиція для, або (iii) для застосування в приготуванні лікарського засобу для: (a) терапії (наприклад, людського організму); (b) в медицині; (c) інгібування інфекції *Streptococcus pneumoniae*; (d) індукції імунної відповіді або захисної імунної відповіді проти *S. pneumoniae*; (e) профілактики інфекції *S. pneumoniae*; (f) запобігання рецидиву інфекції *S. pneumoniae*; (g) зниження прогресування, появи або серйозності патологічних симптомів, пов'язаних з інфекцією *S. pneumoniae*, включаючи профілактику пов'язаних з цим ускладнень, таких як ураження мозку, втрата слуху і судоми, (h) зменшення імовірності інфікування *S. pneumoniae* або (i) лікування, профілактики або затримок початку появи, тяжкості або прогресування пневмококового захворювання(захворювань), включаючи, без обмеження: пневмококову пневмонію, пневмококову бактеремію, пневмококовий менінгіт, отит і синусит. У цих застосуваннях полівалентні пневмококові полісахаридні кон'югатні композиції за винаходом необов'язково можуть використовуватися в комбінації з одним або більше ад'ювантами або без ад'юванта.

Відповідно, винахід стосується способів профілактичного лікування (тобто захисту від) інфекції *S. pneumoniae* або пневмококового захворювання, що включає введення однієї або більше полівалентних імуногенних пневмококових полісахарид-білкових кон'югатів за винаходом потребуючому лікування пацієнту.

Композиції і склади за даним винаходом можуть бути використані для захисту або лікування людини, сприйнятливою до інфекції, наприклад, пневмококової інфекції, шляхом введення композиції за винаходом системним шляхом або через слизову.

У одному з варіантів здійснення винахід стосується способу індукції імунної відповіді на *S. pneumoniae*, що включає введення пацієнту імунологічно ефективної кількості полівалентної імуногенної композиції за винаходом. У іншому варіанті здійснення винахід стосується способу вакцинації людини проти пневмококової інфекції, що включає етап введення людині імуногенно ефективної кількості полівалентної імуногенної композиції за винаходом.

Таким чином, в одному з аспектів винахід стосується способу (1) індукції імунної відповіді у пацієнта-людини, (2) індукції захисної імунної відповіді у пацієнта-людини, (3) вакцинації пацієнта-людини проти інфекції *S. pneumoniae* або (4) зниження імовірності зараження пацієнта-людини *S. pneumoniae*, причому спосіб включає введення пацієнту полівалентної імуногенної композиції за винаходом (тобто будь-якої полівалентної імуногенної композиції, розкритої в даному описі, такої як полівалентні імуногенні композиції, описані в розділі II, озаглавленому "Полівалентні імуногенні композиції", див. вище).

У одному з варіантів здійснення винахід стосується способу профілактики пневмококової пневмонії і інвазивного захворювання у дорослих у віці 18 років і старше. У іншому варіанті здійснення винахід стосується способу профілактики пневмококової пневмонії і інвазивного захворювання, викликаного 24 штамами *Streptococcus pneumoniae* (3, 6A, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F і 35B).

У одному з варіантів здійснення вищезазначених способів композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид

серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A. У одному з варіантів здійснення вказаних вище способів композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20. У одному варіанті здійснення вищезазначених способів композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з кон'югатів містить полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, причому серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів: 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20B. У іншому варіанті здійснення вищезазначених способів композиція додатково містить кон'югат полісахариду серотипу 6A або 6C *S. pneumoniae* з білком.

Було показано, що пневмококова кон'югатна вакцина, що містить серотип 6A, може забезпечувати деякий перехресний захист від серотипу 6C (Cooper et al., Vaccine 29 (2011) 7207-7211). Отже, в деяких варіантах здійснення вищезазначених способів, винахід також стосується застосування полівалентних імуногенних композицій, які не містять серотип 6C, але замість нього містять серотип 6A або серотипи 6A і 6B. У інших варіантах здійснення імуногенна композиція містить кон'югати пневмококових серотипів 6A, 6B і 6C. У конкретних варіантах здійснення вищезазначених способів серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

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

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

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

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

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного набору серотипів (I-a-I-d) серотип 20 або 20B може бути замінений серотипом 20A.

У інших варіантах здійснення вищезазначених способів, серотипи *S. pneumoniae* включають набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

II-a) 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B;

II-b) 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B;

II-c) 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B;

II-d) 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B;

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

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

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

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

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного набору серотипів (II-e-II-h) серотип 20 або 20B може бути замінений серотипом 20A.

У додаткових варіантах здійснення вищезазначених способів серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вказаних в будь-якому з варіантів здійснення Ia), II-a) або II-e), і додатково містять серотипи 6A, 6B і 6C.

Також було показано, що пневмококова кон'югатна вакцина, що містить серотип 10A, може забезпечувати деякий перехресний захист від серотипу 39 (див. WO 2017/085586). Отже, в деяких варіантах здійснення вищезазначених способів винахід також стосується застосування полівалентних імуногенних композицій, які не містять серотип 10A, але замість нього містять серотип 39. У інших варіантах здійснення імуногенна композиція містить пневмококові кон'югати серотипів 10A і 39. У конкретних варіантах здійснення вищезазначених способів серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

III-a) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A;

III-b) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A;

III-c) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 6B, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A;

III-d) 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 39, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A;

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

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного набору серотипів (II-a-III-h) серотип 20 або 20B може бути замінений серотипом 20A.

У додаткових варіантах здійснення вищезазначених способів серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вказаних в будь-якому з варіантів здійснення III-a) - III-h), і додатково містять серотип 10A.

Також було показано, що імуногенні кон'югати, що містять капсульний полісахарид серотипу 15B *S. pneumoniae*, ковалентно зв'язаний з білком-носієм, можуть забезпечувати деякий перехресний захист проти серотипу 15C і/або серотипу 15A (див. WO 2015/110942). Отже, в деяких варіантах здійснення вищезазначених способів винахід також стосується застосування полівалентних імуногенних композицій, які не містять серотип 15C (або де-О-ацетилований 15B), але замість нього містять серотип 15B (тобто полісахарид серотипу 15B, який не є О-ацетилованим). У інших варіантах здійснення імуногенна композиція містить пневмококові кон'югати серотипів 15B і 15C (або де-О-ацетилований 15B). У конкретних варіантах здійснення вищезазначених способів серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вибраних з групи, яка складається з:

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

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

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

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

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

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

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

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

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного набору серотипів (IVa-IVh) серотип 20 або 20B може бути замінений серотипом 20A.

У додаткових варіантах здійснення вищезазначених способів серотипи *S. pneumoniae* містять набір серотипів, вказаний в будь-якому з варіантів здійснення IV-a) - VI-h), і додатково містять серотип 15C (і/або де-О-ацетилований 15B).

Композиції за винаходом можна використовувати в способах забезпечення додаткового захисту від *S. pneumoniae* у пацієнтів, які раніше отримували полівалентну пневмококову вакцину. При такому застосуванні композиції за винаходом можуть забезпечувати захист від конкретних серотипів *S. pneumoniae*, проти яких пацієнт раніше не був вакцинований, або можуть забезпечувати додатковий захист проти серотипів *S. pneumoniae*, проти яких пацієнт був раніше вакцинований, або можуть забезпечувати захист проти серотипів *S. pneumoniae*, проти яких пацієнт раніше не був вакцинований, і проти серотипів *S. pneumoniae*, проти яких пацієнт був раніше вакцинований.

Таким чином, винахід стосується способу індукції імунної відповіді, вакцинації або індукції захисної імунної відповіді проти *S. pneumoniae* у пацієнта, який включає введення полівалентної імуногенної композиції пацієнту, причому композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, причому полісахарид-білкові кон'югати включають капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, при цьому пацієнт раніше був вакцинований проти *S. pneumoniae*. У варіантах здійснення цього аспекту винаходу полівалентна імуногенна композиція може являти собою будь-яку полівалентну імуногенну композицію, розкриту в даному описі. У конкретних варіантах здійснення способів за винаходом полівалентну імуногенну композицію вводять пацієнту, якого раніше лікували полівалентною пневмококовою вакциною. Полівалентна імуногенна вакцина може бути будь-якою вакциною, яка показана для профілактики пневмококової інфекції, викликаної більше ніж одним серотипом *S. pneumoniae*.

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта раніше лікували полівалентною пневмококовою вакциною, яка показана для профілактики пневмококової інфекції, викликаної серотипами *S. pneumoniae*, вибраними з групи, яка складається з:

а) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F і 23F;

b) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F і 19A;

c) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F і 23F;

d) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F і 33F;

5 e) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20; і

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

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентна пневмококова вакцина містить капсульні полісахариди серотипів *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20A. У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентна пневмококова вакцина містить капсульні полісахариди серотипів *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20. В конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентна пневмококова вакцина містить капсульні полісахариди серотипів *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20B.

15 В конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентна пневмококова вакцина містить декілька полісахарид-білкових кон'югатів, що містять полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм. У інших варіантах здійснення полівалентна пневмококова вакцина містить декілька капсульних полісахаридів *S. pneumoniae*, які не кон'юговані з білком-носієм.

20 У додаткових варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта раніше лікували Pnevpar® 13 (пневмококова 13-валентна кон'югатна вакцина [білок CRM197 дифтерійного токсину], Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA).

У інших варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта раніше лікували PNEUMOVAX® 23 (пневмококова полівалентна вакцина, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA).

25 У інших варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта раніше лікували SYNFLORIX™ (пневмококова полісахаридна-кон'югатна вакцина (адсорбована), GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgium).

У варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентну імуногенну композицію за винаходом вводять пацієнту в будь-який час після того, як пацієнт отримав полівалентну пневмококову вакцину, відповідно до режиму лікування, призначеного медичним працівником, наприклад лікарем. У конкретних варіантах здійснення полівалентну імуногенну композицію за винаходом вводять пацієнту через від 1 місяця до 5 років після того, як пацієнт отримав полівалентну пневмококову вакцину, альтернативно, через від 1 місяця до 1 року, від 1 місяця до 2 років, від 1 місяця до 3 років, від 1 місяця до 4 років, від 1 місяця до 6 місяців, від 2 місяців до 6 місяців, від 2 місяців до 1 року, від 1 року до 5 років, від 6 місяців до 5 років, від 6 місяців до 4 років, від 6 місяців до 3 років, від 6 місяців до 2 років, від 6 місяців до 1 року, від 1 року до 4 років, від 1 року до 3 років або від 1 року до 2 років, після того, як пацієнт отримав полівалентну пневмококову вакцину. У інших варіантах здійснення полівалентну імуногенну композицію вводять пацієнту через приблизно 1 місяць, приблизно 2 місяці, приблизно 3 місяці, приблизно 4 місяці, приблизно 5 місяців, приблизно 6 місяців, приблизно 7 місяців, приблизно 8 місяців, приблизно 9 місяців, приблизно 10 місяців, приблизно 11 місяців, приблизно 1 рік, приблизно 1,25 року, приблизно 1,5 року, приблизно 1,75 року, приблизно 2 року, приблизно 2,25 року, приблизно 2,5 року, приблизно 2,75 року, приблизно 3 року, приблизно 3,25 року, приблизно 3,5 року, приблизно 3,75 року, приблизно 4 року, приблизно 4,25 року, приблизно 4,5 року, приблизно 4,75 року або приблизно 5 років після того, як пацієнт отримав полівалентну пневмококову вакцину.

У додаткових варіантах здійснення винахід стосується способу (1) індукції імунної відповіді у пацієнта-людини, (2) індукції захисної імунної відповіді у пацієнта-людини, (3) вакцинації пацієнта-людини проти інфекції *S. pneumoniae* або (4) зниження імовірності інфекції *S. pneumoniae* у пацієнта-людини, причому спосіб включає введення полівалентної імуногенної композиції за винаходом і введення полівалентної пневмококової вакцини пацієнту в будь-якому порядку. Полівалентна пневмококова вакцина може являти собою будь-яку вакцину, показану для профілактики пневмококової інфекції, викликаної більше ніж одним серотипом *S. pneumoniae*.

55 У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта лікують полівалентною імуногенною композицією за винаходом і полівалентною пневмококовою вакциною, яка показана для профілактики пневмококової інфекції, викликаної серотипами *S. pneumoniae*, вибраними з групи, яка складається з:

a) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F і 23F;

60 b) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F і 19A;

с) 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F і 23F;

д) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 22F і 33F;

е) 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20; і

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

У конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентна пневмококова вакцина містить капсульні полісахариди серотипів *S. pneumoniae* 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 7F, 19A, 22F, 33F, 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20A.

10 В конкретних варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентна пневмококова вакцина містить декілька полісахаридно-білкових кон'югатів, що містять полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм. У інших варіантах здійснення полівалентна пневмококова вакцина містить декілька капсульних полісахаридів *S. pneumoniae*, які не кон'юговані з білком-носієм.

15 У додаткових варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта лікують полівалентною імуногенною композицією за винаходом і Prevnar® 13 (пневмококова 13-валентна кон'югована вакцина (Diphtheria CRM197 Protein), Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA), в будь-якому порядку. У одному з варіантів здійснення пацієнту спочатку вводять Prevnar® 13, а потім вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом. У альтернативних варіантах здійснення пацієнту спочатку вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом, а

20 потім вводять PREVNAV® 13. В додаткових варіантах здійснення вищезазначеного способу, пацієнта лікують полівалентною імуногенною композицією за винаходом і PNEUMOVAX® 23 (пневмококова полівалентна вакцина, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA), в будь-якому порядку. У одному з варіантів здійснення пацієнту спочатку вводять Prevnar® 23, а потім вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом. У альтернативних варіантах здійснення пацієнту спочатку

25 вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом і потім вводять PNEUMOVAX® 23. У інших додаткових варіантах здійснення вищезазначеного способу пацієнта лікують полівалентною імуногенною композицією за винаходом і SYNFLORIX™ (пневмококова полісахаридна кон'югована вакцина (адсорбована), GlaxoSmithKline Biologicals s. a., Rixensart, Бельгія), в будь-якому порядку. У одному з варіантів здійснення пацієнту спочатку вводять SYNFLORIX™, а потім вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом. У альтернативному варіанті здійснення пацієнту спочатку вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом, а потім вводять SYNFLORIX™.

30 У деяких варіантах здійснення вищезазначеного способу полівалентну імуногенну композицію і полівалентну пневмококову вакцину вводять одночасно. Як використовується в даному описі, "одночасне введення" не обмежено введенням доз двох композицій одночасно і включає послідовне (один за одним) введення в будь-якому порядку. У деяких варіантах здійснення полівалентну імуногенну композицію і полівалентну пневмококову вакцину вводять внутрішньом'язово або підшкірно в окремі анатомічні ділянки, наприклад, дві різні руки.

40 У деяких варіантах здійснення вищезгаданого способу тимчасовою інтервал між введенням полівалентної імуногенної композиції за винаходом і полівалентної пневмококової вакцини складає від 4 тижнів до приблизно 1 року. У альтернативних варіантах здійснення тимчасовою інтервал складає від приблизно 1 місяця до приблизно 5 років.

45 У одному з варіантів здійснення пацієнту вводять спочатку полівалентну пневмококову вакцину, а потім полівалентну імуногенну композицію за винаходом. У альтернативних варіантах здійснення пацієнту спочатку вводять полівалентну імуногенну композицію за винаходом, а потім вводять полівалентну пневмококову вакцину.

Також надається спосіб індукування імунної відповіді, вакцинації або індукування захисної імунної відповіді проти *S. pneumoniae* у пацієнта, що включає:

50 (1) введення полівалентної імуногенної композиції пацієнту, що містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, причому кожний з полісахаридно-білкових кон'югатів містить капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм,

(2) очікування закінчення попередньо заданого проміжку часу і

55 (3) введення пацієнту полівалентної пневмококової вакцини.

У цьому способі полівалентна імуногенна композиція може містити будь-яку комбінацію *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, розкритих в даному описі, при цьому полівалентна пневмококова вакцина може бути будь-якою вакциною, показаною для профілактики захворювань, що викликаються більш ніж одним серотипом *S. pneumoniae*.

60 Винахід також стосується способу індукції імунної відповіді, вакцинації або індукції захисної

імунної відповіді проти *S. pneumoniae* у пацієнта, що включає:

- (1) введення полівалентної пневмококової вакцини пацієнту,
- (2) очікування закінчення попередньо заданого проміжку часу, і

5 (3) введення полівалентної імуногенної композиції пацієнту, причому композиція містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де кожний з полісахарид-білкових кон'югатів містить капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм.

У цьому способі полівалентна імуногенна композиція може містити будь-яку комбінацію *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, розкритих в даному описі, при цьому полівалентна пневмококова вакцина може являти собою будь-яку вакцину, показану для профілактики захворювання, що викликається більш ніж одним серотипом *S. pneumoniae*.

У деяких варіантах здійснення описаних вище способів полівалентна пневмококова вакцина містить декілька *S. pneumoniae* полісахарид-білкових кон'югатів, де полісахарид-білкові кон'югати містять капсульний полісахарид серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм. У альтернативних варіантах здійснення полівалентна пневмококова вакцина містить капсульні полісахариди *S. pneumoniae*, які не кон'юговані з білком-носієм.

У будь-яких варіантах здійснення способів за винаходом (тобто будь-якому з способів, розкритих в даному описі), спосіб може додатково включати введення пацієнту однієї або більше додаткових доз полівалентної імуногенної композиції за винаходом. У таких способах пацієнт, можливо, вже отримував полівалентну пневмококову вакцину до отримання першої дози полівалентної імуногенної композиції за даним винаходом або, можливо, не був вакцинований проти *S. pneumoniae* до отримання полівалентної імуногенної композиції винахід. Таким чином, в одному з варіантів здійснення пацієнту, який отримав полівалентну пневмококову вакцину, показану для профілактики пневмококового захворювання, викликаного *S. pneumoniae*, вводять дві або більше доз полівалентної імуногенної композиції за винаходом. У альтернативних варіантах здійснення пацієнту, якого раніше не лікували якою-небудь вакциною, показаною для профілактики пневмококового захворювання, вводять дві або більше доз полівалентної імуногенної композиції за винаходом.

У варіантах здійснення описаного вище способу дві або більше доз являють собою одну і ту ж полівалентну імуногенну композицію за винаходом. У альтернативних варіантах здійснення дві або більше доз являють собою різні полівалентні імуногенні композиції за винаходом.

У конкретних варіантах здійснення будь-якого з цих способів пацієнту вводять дві, три або чотири дози полівалентної імуногенної композиції за винаходом. У конкретних варіантах здійснення пацієнт має ослаблений імунітет (наприклад, знаходиться в стані імуносупресії після трансплантації стовбурових клітин), і кількість доз дорівнює трьом.

У деяких варіантах здійснення проміжок часу між введенням кожної дози полівалентної імуногенної композиції за винаходом складає від приблизно 4 тижнів до приблизно 1 року. У альтернативному варіанті здійснення проміжок часу між введенням кожної дози полівалентної імуногенної композиції за винаходом складає від приблизно 1 місяця до приблизно 5 років.

40 У варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнтом, якого лікують композицією(ями) за винаходом, є людина. У певних варіантах здійснення пацієнтом-людиною є немовля (приблизно від 12 до 24 місяців) або дитина молодшого віку (приблизно від 2 до 5 років). Композиції за даним винаходом також підходять для введення дітям старшого віку, підліткам і дорослим (наприклад, у віці від 18 до 45 років, у віці від 18 до 50 років, у віці від 18 до 55 років, у віці від 18 до 60 років або від 18 до 65 років). У інших варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом вік пацієнта складає від 2 до 18 років. У інших варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнту 18 років або більше.

У інших варіантах здійснення способів за винаходом пацієнт-людина є пацієнтом немолодого віку. У деяких варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнту 50 років або більше. У деяких варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнту 55 років або більше. У деяких варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнту 60 років або більше. У інших варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнту 65 років. У додаткових варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнту 70 років або більше.

55 У деяких варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом пацієнт, що підлягає лікуванню імуногенної композицією за винаходом, має ослаблений імунітет.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з способів за винаходом полівалентну імуногенну композицію вводять одночасно з вакциною проти грипу. У деяких варіантах здійснення вакцина проти грипу являє собою "вакцину проти грипу для немолодих людей", вакцину проти грипу високої дози, призначену для немолодих людей, наприклад людей у віці 65 років і старше.

Винахід стосується способу індукції захисної імунної відповіді у пацієнта проти пневмококової інфекції, що включає етап введення пацієнту імунологічно ефективної кількості будь-якої з полівалентних імуногенних пневмококових полісахарид-білкових кон'югатних композицій, розкритих в даному описі. Оптимальна кількість компонентів для конкретної вакцини (тобто полівалентної імуногенної композиції) може бути встановлена за допомогою стандартних досліджень, що включають спостереження відповідних імунних відповідей у суб'єктів. Наприклад, в іншому варіанті здійснення дозу для вакцинації людини визначають шляхом екстраполяції даних, отриманих в експериментах на тваринах, на людину. У іншому здійсненні, дозу визначають дослідним шляхом.

Способи за винаходом можна використовувати для профілактики і/або зменшення тяжкості основних клінічних виявів синдромів, викликаних мікробами, наприклад *S. pneumoniae*, включаючи як інвазивні інфекції (менінгіт, пневмонія і бактеріємія), так і неінвазивні інфекції (гострий середній отит, і синусит).

Введення композицій за винаходом може включати одне або більше з наступного: внутрішньом'язову, внутрішньоочеревинну, внутрішньошкірну або підшкірну ін'єкцію; або введення через слизову оболонку в ротову/травну або дихальну систему або сечостатевої шляхи. У одному з варіантів здійснення для лікування пневмонії або середнього отиту використовується інтраназальне введення (оскільки носоглоткове носійство пневмококів може бути більш ефективно відвернений, приводячи до ослаблення інфекції на самої ранній стадії). У конкретних варіантах здійснення композиції за винаходом вводять пацієнту внутрішньом'язово або підшкірно.

Всі публікації, згадані в даному описі, включені у вигляді посилання для опису і розкриття методів і матеріалів, які можуть бути використані в зв'язку з даним винаходом.

Незважаючи на наведений опис різних варіантів здійснення винаходу з посиланням на прикладені креслення, потрібно розуміти, що винахід не обмежений цими точними варіантами здійснення і що фахівець в даній галузі техніки може внести різні зміни і модифікації без відступу від об'єму або суті винаходу, які визначені в прикладеній формулі винаходу.

Наведені нижче приклади ілюструють, але не обмежують винахід.

ПРИКЛАД 1

Приготування капсульних полісахаридів *S. pneumoniae*

Способи культивування пневмококів добре відомі в даній галузі. Див., наприклад, Chase, 1967, *Methods of Immunology i Immunochimistry* 1:52. Способи отримання пневмококових капсульних полісахаридів також добре відомі в даній галузі. Дивись, наприклад, європейський патент №. EP 0497524 B1. Процес, описаний нижче, як правило відповідає методу, описаному в європейському патенті №. EP 0497524 B1 і загалом застосовний до всіх пневмококових серотипів.

Ізоляти пневмококових штамів серотипів 6C, 23B і 31 отримували з Центрів по контролю і профілактиці захворювань (Атланта, Джорджія). Штами серотипів 3, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F та 33F отримували від Університету Пенсильванії (Dr. Robert Austrian). Штами серотипів 17F і 19A отримували з FDA Office of Biologics (Dr. John Robbins). Серотип 7F отримували з Державного університету штату Нью-Йорк, Медичного центра штату Нью-Йорк (Dr. Gerald Schiffman). Не перераховані вище ізоляти пневмококових серотипів отримували з Американської колекції типових культур (Manassas, VA). При необхідності підтипи диференціювали на основі реакції Квеллунга з використанням специфічної антисироватки. Див., наприклад, патент США № 5,847,112. Додатково виконували клональне виділення отриманих ізолятів шляхом висівання послідовно в два етапи на чашках з агаром, що складається з середовища, вільного від тваринного компонента, що містить соєвий пептон, дріжджовий екстракт і глюкозу без геміну. Для серотипу 7F використані чашки з агаром також містили гемін. Клональні ізоляти кожного серотипу додатково розмножували в рідкій культурі, використовуючи середовище, що не містить тваринних компонентів, яке містить соєвий пептон, дріжджовий екстракт, HEPES, хлорид натрію, бікарбонат натрію, фосфат калію, глюкозу і гліцерин, щоб підготувати попередні маточні банки клітин.

Отримання кожного серотипу пневмококового полісахариду складалося з розмноження клітин і періодичної ферментації з подальшою хімічною інактивацією перед подальшим очищенням. Банк відталих клітин кожного серотипу з пробірки розмножували, використовуючи струшувану колбу або культуральний бутель, що містить попередньо стерилізоване середовище для вирощування без тваринних компонентів, що містить соєвий пептон або ультрафільтрат соєвого пептону, дріжджовий екстракт або ультрафільтрат дріжджового екстракту, HEPES, хлорид натрію, бікарбонат натрію, фосфат калію і глюкозу. Культуру клітин для розмноження вирощували в герметичній струшуваній колбі або бутлі для мінімізації

газообміну в умовах контролю температури і перемішування. Для серотипів 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 19A, 20, 22F і 33F, банки відталих клітин з пробірок розмножували з допомогою ферментера, що містить ті ж середовища. Під час розмноження клітин цих серотипів контролювали температуру, pH, тиск і перемішування. Повітряний потік в поверхневому шарі також контролювали, оскільки барботування не використовували. Після досягнення заданої щільності культури, виміряної по оптичній густині при 600 нм, частину культури для розмноження клітин переносили у виробничий ферментер, що містить попередньо стерилізоване середовище для росту без тваринних компонентів, що містить соєвий пептон або ультрафільтрат соєвого пептону, дріжджовий екстракт або ультрафільтрат дріжджового екстракту, хлорид натрію, фосфат калію і глюкозу. Температуру, pH, тиск і перемішування контролювали. Повітряний потік в поверхневому шарі також контролювали, оскільки барботування не використовували.

Періодичну ферментацію припиняли шляхом додавання хімічного інактивуючого агента, фенолу, коли практично вся глюкоза була використана. Чистий фенол додавали до кінцевої концентрації 0,8-1,2 % для інактивації клітин і вивільнення капсульного полісахариду з клітинної стінки. Первинну інактивацію здійснювали протягом певного часу в ферментері, в якому також контролювали температуру і перемішування. Після первинної інактивації партію переносили в іншу посудину, де її витримували протягом додаткового певного часу при контрольованій температурі і перемішуванні для повної інактивації. Інактивацію підтверджували або чашковими методами підрахунку колоній, або перевіркою концентрації фенолу і встановленого часу. Потім інактивованій бульйон очищали.

ПРИКЛАД 2

Очищення пневмококових полісахаридів

Процес очищення пневмококових полісахаридів складався з декількох процесів: центрифугування, глибокої фільтрації, концентрування/діафільтрації і осадження. Всі процедури виконували при кімнатній температурі, якщо не вказане інше.

Інактивованій бульйон з культур *S. pneumoniae* з ферментера флокулювали з катіонним полімером (таким як BPA-1000, TRETOLITE® (Baker Hughes Inc., Хьюстон, Техас), Spectrum 8160, полі(етиленіміном) і Millipore pDADMAC). Катіонні полімери зв'язуються з домішками білків, нуклеїнових кислот і клітинного дебрису. Після стадії флокуляції і періоду дозрівання флокуловані тверді речовини видаляли з допомогою центрифугування і декількох стадій глибокої фільтрації. Освітлений бульйон концентрували і піддавали діафільтрації з використанням фільтра MWCO (відсікаючого молекулярну масу) від 100 кДа до 500 кДа. Діафільтрацію здійснювали, використовуючи тріс, $MgCl_2$ буфер і натрій-фосфатний буфер. Діафільтрація видаляла залишкову нуклеїнову кислоту і білок.

Видалення інших домішок здійснювали повторним осадженням полісахариду в ацетаті натрію і фенолі з денатурованим спиртом і/або ізопропанолом. Під час етапу осадження фенолом ацетат натрію в натрій-фосфатному буферному розчині і фенол (зріджені феноли або тверді феноли) завантажували в діафільтрований ретентат. Потім виконували спиртове фракціонування полісахариду в дві стадії. На першій стадії до препарату додавали спирт з низьким процентним вмістом для осадження клітинного дебрису і інших небажаних домішок, в той час як неочищений полісахарид залишався в розчині. Домішки видаляли центрифугуванням з подальшою стадією глибокої фільтрації. Потім полісахарид витягували з розчину шляхом додавання в партію додаткової кількості ізопропанолу або денатурованого спирту. Осаджений осад полісахариду діставали центрифугуванням, розтирали і висушували у вигляді порошку і зберігали замороженим при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ПРИКЛАД 3

Аналіз структурної ідентичності деяких пневмококових серотипів методом ЯМР

Зразки для ЯМР-аналізу готували шляхом розчинення порошку полісахариду в оксиді дейтерію (D_2O), що містить 0,01 % диметилсульфоксиду (ДМСО) і 0,01 % натрієвої солі 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонату- d_6 (DSS- d_6) в концентрації 5 мг порошку на мл розчину. ДМСО був внутрішнім стандартом, який використовувався для кількісного аналізу, а DSS- d_6 використовувався для установки шкали хімічного зсуву на 0 ppm. Набір даних одновимірної ЯМР для протонів отримували при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, і частину спектра, що містить аномерні резонанси, потім вибірково записували у вигляді координат x, y в файл ASCII для аналізу з використанням робочої книги Microsoft Excel. Потім координати Y (тобто спектральний профіль) порівнювали зі спектральними профілями капсульних бактеріальних полісахаридів в еталонній базі даних. Еталонні профілі отримували аналогічним чином на відібраних препаратах кожного серотипу, які потім визначили як еталонну партію. Попарне порівняння виконували для y-значень зразка і еталонних спектрів для отримання коефіцієнта кореляції ($\rho_{x,y}$) у вигляді ступеню схожості між

спектрами. Значення $\geq 0,95$ для будь-якого з еталонних спектрів приймали за позитивну ідентифікацію структури полісахариду.

На фіг. 1-4 представлені 600 МГц одновимірні спектри ^1H ЯМР капсульних полісахаридів серотипів 6С, 15А, де-О-ацетилованого 15В і 35В *S. pneumonia*, відповідно. Области ідентичності ^1H ЯМР, що використовуються для ідентифікації серотипів 6С, 15А, де-О-ацетилованого 15В і 35В *S. pneumonia*, представлені на фіг. 5-8, відповідно.

Структура капсульних полісахаридів серотипів де-О-ацетилованого 15В і 15С *S. pneumonia*

Дослідження імуногенності виконували шляхом введення PCV21 новозеландським білим кроликам (див. приклад 43, нижче). У цих дослідженнях замість серотипу 15С в полівалентній композиції використовували де-О-ацетилований полісахарид серотипу 15В. Для підтвердження того, що де-О-ацетилований полісахарид 15В є еквівалентним полісахариду серотипу 15С, виконували ЯМР дослідження.

Структурні відмінності між серотипами капсульного полісахариду виявляються у вигляді відмінностей в хімічному зсуві в спектрі ЯМР. Аномерна область (приблизно від 4,4 до 6,0 ppm) чутлива до кожної структурної ознаки в повторюваній ланці полісахариду. Відмінності в стереохімії, складі моносахаридів, О-ацетилюванні і глікозидного зв'язку впливають на хімічні зсуви аномерних сигналів, залишаючи цю область спектра унікальною для кожного серотипу. Для де-О-ацетилованого полісахариду серотипу 15В повний спектр ^1H ЯМР виявився ідентичним ^1H ЯМР спектру полісахариду серотипу 15С, вказуючи на те, що повторювана ланка обох полісахаридів складається з одних і тих же моносахаридних замісників і ділянок глікозидного зв'язку (див. фіг. 9В-9С і 10В-10С). Також ясно показано, що стадія де-О-ацетилювання видаляє О-ацетатну групу, присутню в полісахариді 15В, і що О-ацетатні групи, по суті, не спостерігаються (див. фіг. 10А-10F).

ПРИКЛАД 4

Приготування кон'югата серотипу 3 кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 380 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,25 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 12 годин при 22 °C.

Активованій продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 2 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 10 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і

CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,3. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на

5

моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1 години при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідром натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1,6 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали

10

калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфату калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

15

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

20

Таблиця 1

Характеристика кон'юга 3, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
186/253 кДа	862/1468 кДа	1,16	8,2	<1 %	<1 %

ПРИКЛАД 5

Приготування кон'югата серотипу 6С кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

25

Полісахарид розчиняли, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в ДМСО. Потім розчинені розчини полісахариду і CRM197 об'єднували і кон'югували, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

30

Окиснення полісахариду

Очищений порошок пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Відфільтрований розчинений полісахарид концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним

35

потоком. Потім розчин полісахариду нагрівали до до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,10 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

40

Активований продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

45

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий шляхом експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний

50

фільтр. Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з

концентрацією сахарози 5 % мас./об. CRM197 готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Рг/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 2,2 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,4. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду і CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) і кон'югацію виконували протягом 15 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розводили в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, використовуючи 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С, використовуючи 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Ретентатну порцію фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, розподіляли по аліквотах і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 2

Характеристика кон'юга 6С, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
144/229 кДа	2038/4182 кДа	1,20	9,2	3,1 %	5,8 %

ПРИКЛАД 6

Приготування кон'югата серотипу 6С кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в ДМСО. Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югант очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Окиснення полісахаридів

Очищений порошок пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45-мікронний фільтр. Відфільтрований розчинений полісахарид концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням метаперіодату натрію 100 мМ. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,10 моля метаперіоду натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активований продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахаридів з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як

описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,9 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,4. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і виконували кон'югацію протягом 15 годин при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориду натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 3

Характеристика кон'юга 6С, отриманого кон'югацій в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
144/229 кДа	2104/5006 кДа	1,11	8,4	4,9 %	2,2 %

Приготування кон'югата серотипу 6А для дослідження моновалентного кон'югата, отриманого кон'югацією в ДМСО

Полісахарид розчиняли, хімічно активували. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в ДМСО. Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували, і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югант очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів. Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,10 моля метаперіоду натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активований продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з

подальшою діафільтрацією проти води через ультрафільтраційну мембрану. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,5 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,4. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 15 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім для нейтралізації рН додавали калій-фосфатний буфер. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 3А

Характеристика кон'юга 6А, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/ загальний білок
238/278 кДа	2565/6310 кДа	1,021	9,2	3 %	5 %

ПРИКЛАД 7

Приготування кон'югата серотипу 7F кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 150 бар/7 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-

ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,24 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 4 години при 4 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 2,6 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 4

Характеристика кон'юга 7F, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
76/118 кДа	1817/4026 кДа	1,55	6,7	<1 %	3,2 %

ПРИКЛАД 8

Приготування кон'югата серотипу 8 кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 600 бар/5 проходів.

5 Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили pH до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метaperiodату натрію. 10 Кількість доданого метaperiodату натрію становила 0,18 моль метaperiodату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 4 години при 22 °C.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

15 Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, 20 ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

25 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 4,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °C. Ціаноборогідрид натрію не додавали в реакцію кон'югації, оскільки було зазначено, що додавання ціаноборогідриду натрію під час реакції кон'югації може привести до безповоротного осадження серотипу 8. Виключення ціаноборогідриду натрію з реакції дозволяє уникнути осадження без значного впливу на характеристики кон'югата.

35 Відновлення боргидридом натрію

Боргидрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації pH. Партію концентрували і піддавали діалізації при 40 приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, pH 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 300 кДа 45 NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр (з попереднім фільтруванням через 0,5 мікронний фільтр), потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, pH 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Таблиця 5

Характеристика кон'югата серотипу 8, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
110/128 кДа	1479/2196 кДа	1,17	10,3	3,7 %	<1 %

ПРИКЛАД 9

Приготування кон'югата серотипу 9N кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали 250 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,16 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 4 години при 22 °C.

Активований продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,25 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1 години при 22 °C.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 градусах Цельсія. 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, 30 кДа NMWCO через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Таблиця 6

Характеристика кон'югата серотипу 9N, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
195/226 кДа	1407/3134 кДа	1,33	10,1	1,9 %	<1 %

ПРИКЛАД 10

5 Приготування кон'югата серотипу 10A кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинили полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

15 Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів потім на рівні 600 бар/5 проходів для досягнення цільової молекулярної маси.

20 Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. 25 Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,15 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

30 Активованій продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

35 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

40 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 5,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 2,0. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °C.

Відновлення боргідридом натрію

50 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партию розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партию концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа

NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 7

Характеристика кон'югата серотипу 10А, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
76/111 кДа	5137/7061 кДа	1,13	10,1	<1 %	15 %

ПРИКЛАД 11

Приготування кон'югата серотипу 10А кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 600 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метaperiodату натрію. Кількість доданого метaperiodату натрію становила 0,16 моля метaperiodату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 4,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,75. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на

моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 8

Характеристика кон'югата серотипу 10А, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
94/130 кДа	1540/3000 кДа	1,54	7,7	8,5 %	<1 %

ПРИКЛАД 12

Приготування кон'югата серотипу 11А кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розмір розчиненого полісахариду зменшували кислотним гідролізом, додаючи оцтову кислоту до 200 мМ, інкубуючи при 92 °С протягом 75 хвилин, потім нейтралізувати шляхом додавання холодного калій-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становив 0,13 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 Ps/мл з концентрацією

сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Рг/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,5 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 9

Характеристика кон'югата серотипу 11А, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
63/96 кДа	1584/2804 кДа	0,89	7,4	2,2 %	2,8 %

ПРИКЛАД 13

Приготування кон'югата серотипу 12F кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розмір розчиненого полісахариду зменшували кислотним гідролізом, додаючи оцтову кислоту до 200 мМ, інкубуючи при 90 °С протягом 45 хвилин, потім нейтралізувати шляхом додавання холодного калій-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,26 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з

тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197.

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Пс/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Рг/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Пс і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Пс і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,0 г Пс/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблица 10

Характеристика кон'югата серотипу 12F, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
54/73 кДа	1766/3119 кДа	1,20	9,6	1,3 %	1,5 %

ПРИКЛАД 14

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходить.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 1,75 моля метаперіодату натрію на моль

повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 20 годин при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 6,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 2.0. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2,5 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 11

Характеристика кон'югата серотипу 15A, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
158/200 кДа	6949/9235 кДа	1,05	9,7	10 %	5,0 %

ПРИКЛАД 15

Приготування кон'югата серотипу 15A кон'югацією у водному середовищі для дослідження перехресного захисту 15A/B/3

Полісахарид розчиняли, зменшували розмір, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Потім очищений CRM197 кон'югували з активованим полісахаридом, використовуючи хлорид нікелю у водній реакційній суміші, і отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів для досягнення цільової молекулярної маси. Потім полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO

ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,45 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду. Реакція окиснення тривала 20 годин при 22 °С. Активовані продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С. Подальшу активацію отримували шляхом нагрівання ультрафільтрованого продукту до 22 °С і доведенням рН до 5. Активацію виконували шляхом додавання 100 мМ розчину метаперіодату натрію з концентрацією 2,0 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 20 годин при 22 °С. Другий активований продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4 через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Розчин окисненого полісахариду змішували з водою і 1,5 М фосфатом калію, рН 6,0. РН буфера вибирали для поліпшення стабільності активованого полісахариду під час реакції кон'югації. Очищений CRM197, отриманим в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), фільтрували через 0,2 мікронний фільтр і об'єднували із забуференим розчином полісахариду при масовому відношенні полісахариду до CRM197., що дорівнює 0,6. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду і CRM197 в отриманому кон'югаті. Концентрації полісахариду і фосфату становили 9,75 г/л і 100 мМ, відповідно. Концентрацію полісахариду вибирали для контролю розміру отриманого кон'югата. Хлорид нікелю додавав до концентрації приблизно 2 мМ, використовуючи 100 мМ розчин хлориду нікелю. Додавали ціаноборогідрид натрію (2 моля на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакцію кон'югації проводили протягом 148 годин при 10 °С, щоб максимізувати споживання полісахариду і білка.

Відновлення боргідридом натрію

Після реакції кон'югації партію розбавляли до концентрації полісахариду приблизно 3,0 г/л, охолоджували до 2-8 °С і фільтрували через 1,2 мкм фільтр. Партію піддавали діалізації проти 100 мМ фосфату калію, рН 7,0, при 2-8 °С через 100 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Партію, витягнуту з ретентату, потім розбавляли до концентрації приблизно 2,0 г полісахариду/л, і доводили рН шляхом додавання 1,2 М бікарбонату натрію, рН 9,4. Додавали боргідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду). Потім додавали 1,5 М фосфат калію, рН 6,0.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. У партію ретентату додавали полісорбат 20 до концентрації 0,05 % (мас./об.), потім партію фільтрували через 0,2 мікронний фільтр (з попереднім фільтруванням через 0,5 мікронний фільтр).

Партію доводили до концентрації полісахариду 1,0 г/л шляхом додавання 10 мМ L-гістидинового буфера з 150 мМ хлориду натрію, рН 7,0, в присутності 0,03 % (мас./об.) полісорбату 20. Партію аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 12

Характеристика кон'югата серотипу 15A, отриманого кон'югацією у водному середовищі, для дослідження перехресного захисту 15A/B/C

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
118/154 кДа	465/695 кДа	0,99	4,5	9,6 %	<1 %

ПРИКЛАД 16

Приготування кон'югата серотипу 3 кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної

вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 1,75 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 20 годин при 22 °C.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197.

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (ВО 2012/173876 А1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО, які попередньо нагрівали до 34 °C. У розчин полісахариду додавали хлорид натрію до концентрації 50 мМ. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 5,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 2,0. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 34 °C.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Характеристика кон'югата серотипу 15А, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
214/231 кДа	1628/3518 кДа	1,57	7,3	17 %	7,8 %

ПРИКЛАД 17

5 Приготування кон'югата серотипу 15В кон'югацією в ДМСО для дослідження перехресного захисту 15А/В/С

Полісахарид розчиняли, зменшували розмір, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованний полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і розчиняли в ДМСО. Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

15 Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 300 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діяфільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

20 Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,20 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 4 години при 22 °С.

Активованний продукт піддавали діяфільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діяфільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

30 Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діяфільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

35 Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

40 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 2,0. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 5 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

45 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партию розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партию концентрували і піддавали діяфільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

50 Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

- Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблица 14

Характеристика кон'югата серотипу 15В, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження перехресного захисту 15А/В/С

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
203/255 кДа	2329/3881 кДа	1,67	7,9	3,6 %	4,4 %

ПРИКЛАД 18

- Приготування кон'югата серотипу 15С кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини і дослідження перехресного захисту 15А/В/С

- Полісахарид, отриманий з серотипу 15В *Streptococcus pneumoniae*, розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, піддавали м'якому гідролізу в лужному середовищі для вивільнення О-ацетильних груп, хімічно активували і міняли буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинили полісахариду і CRM197 об'єднували, і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру полісахаридів, гідроліз в лужному середовищі і окиснення

- Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 300 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

- Розчин полісахариду нагрівали до 60 °С і додавали натрій-бікарбонатний буфер, рН 9, до кінцевої концентрації 50 мМ. Партію інкубували при перемішуванні протягом 13 годин при 60 °С для вивільнення О-ацетильних груп. Калій-фосфатний буфер, рН 6, додавали до кінцевої концентрації 136 мМ для нейтралізації рН, і розчин охолоджували до температури навколишнього середовища. Потім розчин концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

- Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,20 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активований продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

- Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

- Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 2,0. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення

5

полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

10

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

15

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

20

Таблиця 15

Характеристика кон'югата серотипу 15С, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження моновалентної вакцини і дослідження перехресного захисту 15А/В/С

О-ацетил/Ps	Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/ загальний білок
Не обнаружен	182/246 кДа	1962/4019 кДа	1,31	4,8	3,8 %	13 %

ПРИКЛАД 19

Приготування кон'югата серотипу 15С кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

25

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинили полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

30

Зменшення розміру, гідроліз в лужних умовах і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps серотипу 15В розчиняли у воді і фільтрували через 0,45-мікронний фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 300 бар/5 проходів.

35

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

40

Розчин полісахариду нагрівали до 60 °С, і додавали натрій-бікарбонатний буфер, рН 9, до кінцевої концентрації 50 мМ. Партію інкубували при перемішуванні протягом 13 годин при 60 °С для вивільнення О-ацетильної групи. Додавали калій-фосфатний буфер, рН 6, до кінцевої концентрації 136 мМ для нейтралізації рН, і розчин охолоджували до температури навколишнього середовища. Потім розчин сконцентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

45

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію.

Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,2 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

5 Активований продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

10 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

15 Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

20 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,3. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1 години при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

25 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

30 Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

35 Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 16

Характеристика кон'югата серотипу 15С, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

О-ацетил/Ps	Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
Не обнаружен	182/246 кДа	1540/3230 кДа	1,34	6,6	9,2 %	5,7 %

ПРИКЛАД 20

40 Приготування кон'югата серотипу 16F кон'югацією у водному середовищі для дослідження моновалентної вакцини

45 Полісахарид розчиняли, зменшували розмір, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Потім очищений CRM197 кон'югували з активованим полісахаридом, використовуючи хлорид нікелю у водній реакційній суміші, і отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси

Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів потім 500 бар/5 проходів для досягнення цільової молекулярної маси. Потім полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили pH до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,15 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, pH 6,4, з подальшою діалізацією проти води через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Розчин окисненого полісахариду змішували з водою і 1,5 М фосфати калію, pH 7,0. Вибрана величина pH буфера повинна була поліпшити стабільність активованого полісахариду під час реакції кон'югації. Очищений CRM197, отриманим в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), фільтрували через 0,2 мікронний фільтр і об'єднували із забуференим розчином полісахариду при масовому відношенні полісахариду до CRM197., що дорівнює 0,7. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду і CRM197 в отриманому кон'югаті. Концентрації полісахариду і фосфатів становили 7,5 г/л і 100 мМ, відповідно. Концентрацію полісахариду вибирали для контролю розміру отриманого кон'югата. Потім розчин фільтрували через 0,2 мікронний фільтр. Хлорид нікелю додавав до концентрації приблизно 2 мМ, використовуючи 100 мМ розчин хлориду нікелю. Додавали ціаноборогідрид натрію (2 моля на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакцію кон'югації проводили протягом 122 годин при 22 °C, щоб максимізувати споживання полісахариду і білка.

Відновлення боргідридом натрію

Після реакції кон'югації партію розбавляли до концентрації полісахариду приблизно 3,0 г/л, охолоджували до 2-8 °C і фільтрували через 1,2 мкм фільтр. Партію піддавали діалізації проти 100 мМ фосфату калію, pH 7,0, при 2-8 °C через 100 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Партію, витягнуту з ретентату, потім розбавляли до концентрації приблизно 2,0 г полісахариду/л, і доводили pH шляхом додавання 1,2 М бікарбонату натрію, pH 9,4. Додавали боргідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду). Потім додавали 1,5 М фосфат калію, pH 6,0.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, pH 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. У партію ретентату додавали полісорбат 20 до концентрації 0,05 % (мас./об.), потім партію фільтрували через 0,2 мікронний фільтр (з попереднім фільтруванням через 0,5 мікронний фільтр).

Партію доводили до концентрації полісахариду 1,0 г/л шляхом додавання 10 мМ L-гістидинового буфера з 150 мМ хлориду натрію, pH 7,0, в присутності 0,03 % (мас./об.) полісорбату 20. Партію аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Таблиця 17

Характеристика кон'югата серотипу 16F, отриманого кон'югацією у водному середовищі, для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
90/139 кДа	1860/5539 кДа	1,10	3,3	7,0 %	<1 %

ПРИКЛАД 21

Приготування кон'югата серотипу 16F кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно

активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною
 5 фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через
 10 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 1000 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через
 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,15 моль метаперіодату натрію на моль
 15 повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

Активований продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

25 Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

30 Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і
 35 CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 2,0 г Ps/L г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °C.

40 Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при
 45 приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 300 кДа
 50 NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Характеристика кон'югата серотипу 16F, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
91/177 кДа	2075/3966 кДа	1,29	11,0	<1 %	<1 %

ПРИКЛАД 22

5 Приготування кон'югата серотипу 17F кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

15 Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів.

20 Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,11 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

30 Активованій продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

35 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

40 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 2,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °C.

45 Відновлення боргідридом натрію

50 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

- 5 Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С

Таблица 19

Характеристика кон'югата серотипу 17F, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
179/216 кДа	2630/4632 кДа	1,20	8,0	1,9 %	4,5 %

10 ПРИКЛАД 23

Приготування кон'югата серотипу 17F кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

- Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

- Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

- Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,11 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

- 35 Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

- 40 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

- 45 Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

- 50 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 2,1 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,3. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 20

Характеристика кон'югата серотипу 17F, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Мп/Mw окисненого Ps	Мп/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
150/212 кДа	2650/4110 кДа	1,10	7,7	2,8 %	1,5 %

ПРИКЛАД 24

Приготування кон'югата серотипу 19A кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 380 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,26 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 20 годин при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6

мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,8 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,33. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1,5 годин при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 21

Характеристика кон'югата серотипу 19A, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
96/186 кДа	1714/3585 кДа	1,22	9,1	7,0 %	1,4 %

ПРИКЛАД 25

Приготування кон'югата серотипу 20A кон'югацією в ДМСО дослідження моновалентної вакцини

Полісахариду раніше визначений як серотип 20A (розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчиняли полісахариду і CRM197 об'єднуючи і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 200 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метaperiodату натрію. Кількість доданого метaperiodату натрію становила 0,11 моля метaperiodату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 2,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 6 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію.

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 22

Характеристика кон'югата серотипу 20А, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
165/215 кДа	5159/7778 кДа	1,17	6,1	<1 %	6,5 %

ПРИКЛАД 26

Приготування кон'югата серотипу 20А кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 220 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію.

Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,16 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

5 Активований продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

10 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

15 Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

20 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,4 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °C.

Відновлення боргідридом натрію

25 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

30 Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

35 Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Таблиця 23

Характеристика кон'югата серотипу 20A, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
178/215 кДа	2478/3863 кДа	1,10	8,3	1,0 %	1,0 %

ПРИКЛАД 27

40 Приготування кон'югата серотипу 22F кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

45 Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

50 Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси

Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 400 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили pH до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,12 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

Активованний продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, pH 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, pH 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,8 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,3. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1 години при 22 °C.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації pH. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, pH 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, pH 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, pH 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Таблиця 24

Характеристика кон'югата серотипу 22F, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
170/196 кДа	1800/3970 кДа	1,13	7,0	<1 %	1,1 %

ПРИКЛАД 28

Приготування кон'югата серотипу 23A кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованний полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинили полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як

описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

5 Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розмір розчиненого полісахариду зменшували з допомогою кислотного гідроліза шляхом додавання оцтової кислоти до 200 мМ, інкубації при 90 °С протягом 1,5 годин, потім нейтралізації шляхом додавання холодного калій-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

10 Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метaperiodату натрію. 15 Кількість доданого метaperiodату натрію становила 0,20 моля метaperiodату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

20 Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

25 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

30 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. У розчин полісахариду додавали хлорид натрію до концентрації 50 мМ. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до 35 CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

40 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 3 годин при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

45 Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблица 25

Характеристика кон'югата серотипу 23А, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
70/97 кДа	2183/3837 кДа	1,20	11,8	<1 %	<1 %

ПРИКЛАД 29

Приготування кон'югата серотипу 23A кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розмір розчиненого полісахариду зменшували з допомогою кислотного гідроліза шляхом додавання оцтової кислоти до 200 мМ, інкубації при 90 °С протягом 1,5 годин, потім нейтралізації шляхом додавання холодного калію-фосфату буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,20 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,5 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діафільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Характеристика кон'югата серотипу 23А, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
116/175 кДа	2156/4933 кДа	1,12	6,3	3,3 %	2,1 %

ПРИКЛАД 30

5 Приготування кон'югата серотипу 23В кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

15 Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 400 бар/5 проходів.

20 Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діафільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,10 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

30 Активований продукт піддавали діафільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діафільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

35 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діафільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

40 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. У розчин полісахариду додавали хлорид натрію до кінцевої концентрації 50 мМ. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 5,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

50 Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діафільтрації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа

NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діяфільтрації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 27

Характеристика кон'югата серотипу 23В, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
155/179 кДа	1322/3299 кДа	1,28	6,2	13 %	5,1 %

Приклад 31

Приготування кон'югата серотипу 23В кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованний полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 400 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діяфільтрації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,13 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованний продукт піддавали діяфільтрації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діяфільтрацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діяфільтрації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 5,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на

моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 28

Характеристика кон'югата серотипу 23В, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
172/197 кДа	1076/2514 кДа	1,26	7,4	12 %	3,2 %

ПРИКЛАД 32

Приготування кон'югата серотипу 24F кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розмір розчиненого полісахариду зменшували з допомогою кислотного гідролізу шляхом додавання оцтової кислоти до 200 мМ, інкубації при 92 °С протягом 50 хвилин, потім нейтралізації шляхом додавання холодного калій-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метaperiodату натрію. Кількість доданого метaperiodату натрію становила 0,18 моля метaperiodату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 2 мг Ps/мл з

концентрацією сахарози 10 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. У розчин полісахариду додавали хлорид натрію до кінцевої концентрації 50 мМ. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,5 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2 годин при 22 °С.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації проти приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 29

Характеристика кон'югата серотипу 24F, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
56/100 кДа	2233/4875 кДа	0,94	7,3	4,4 %	1,4 %

ПРИКЛАД 33

Приготування кон'югата серотипу 31 кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчиняли полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розмір розчиненого полісахариду зменшували з допомогою кислотного гідроліза шляхом додавання оцтової кислоти до 200 мМ, інкубацією при 90 °С протягом 30 хвилин, потім нейтралізації шляхом додавання холодного калій-фосфатного буфера, рН 7, до 400 мМ.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,16 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованний продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 4,0 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1 години при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 30

Характеристика кон'югата серотипу 31, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
96/119 кДа	1818/2999 кДа	1,15	9,5	<1 %	<1 %

ПРИКЛАД 34

Приготування кон'югата серотипу 3 кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованний полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 400 бар/5 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °С і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,12 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (молів альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °С.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °С.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 3,5 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 1 години при 22 °С.

Відновлення боргідром натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °С. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °С. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °С проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблиця 31

Характеристика кон'югата серотипу 31, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
149/186 кДа	2354/5971 кДа	1,26	8,9	<1 %	1,8 %

ПРИКЛАД 35

Приготування кон'югата серотипу 33F кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид гомогенізували для зменшення молекулярної маси Ps. Тиск при гомогенізації і кількість проходів через гомогенізатор контролювали, підтримуючи на рівні 350 бар/4 проходів.

Полісахарид зменшеного розміру концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,12 моль метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 1,8 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,75. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 4 годин при 22 °C.

Відновлення боргідридом натрію

Боргідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.

Таблиця 32

Характеристика кон'югата серотипу 33F, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
186/220 кДа	1630/2470 кДа	1,28	8,4	1,3 %	5,4 %

ПРИКЛАД 36

Приготування кон'югата серотипу 35B кон'югацією в ДМСО для дослідження моновалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно

активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активованій полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинених полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною
 5 фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через
 10 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метaperiodату натрію.
 15 Кількість доданого метaperiodату натрію становила 0,05 моля метaperiodату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

Активованій продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і
 25 фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 10 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 1,3. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 2,5 годин при 22 °C.
 35 Під час інкубації в реакції кон'югації борогідрид натрію додавали два рази (0,025 моля на ланку, що повторюється полісахариду).

Відновлення борогідридом натрію

Борогідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1,5 годин при 22 °C. Партію розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партію концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °C через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °C.
 50

Характеристика кон'югата серотипу 35В, отриманого кон'югацією в ДМСО,
для дослідження моновалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
48/82 кДа	5494/7385 кДа	1,26	4,5	1,8 %	11 %

ПРИКЛАД 37

5 Приготування кон'югата серотипу 35В кон'югацією в ДМСО для дослідження полівалентної вакцини

Полісахарид розчиняли, доводили розмір до цільової молекулярної маси, хімічно активували і замінювали буфер ультрафільтрацією. Активований полісахарид і очищений CRM197 ліофілізували окремо і повторно розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім розчини повторно розчинили полісахариду і CRM197 об'єднували і виконували кон'югацію, як описано нижче. Отриманий кон'югат очищали ультрафільтрацією перед остаточною фільтрацією через 0,2-мікронний фільтр. Декілька параметрів процесу на кожній стадії, таких як рН, температура, концентрація і час, контролювали для отримання кон'югатів з необхідними характеристиками.

Зменшення розміру і окиснення полісахаридів

15 Порошок очищеного пневмококового капсульного Ps розчиняли у воді і фільтрували через 0,45 мкм фільтр. Розчинений полісахарид концентрували і піддавали діалізації проти води через 10 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Потім розчин полісахариду нагрівали до 22 °C і доводили рН до 5 за допомогою натрій-ацетатного буфера, щоб мінімізувати зменшення розміру полісахариду в результаті активації. Активацію полісахариду ініціювали додаванням 100 мМ розчину метаперіодату натрію. Кількість доданого метаперіодату натрію становила 0,05 моля метаперіодату натрію на моль повторюваної ланки полісахариду для досягнення цільового рівня активації полісахариду (моль альдегіду на моль повторюваної ланки полісахариду). Реакція окиснення тривала 2 години при 22 °C.

25 Активований продукт піддавали діалізації проти 10 мМ фосфату калію, рН 6,4, з подальшою діалізацією проти води через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком. Ультрафільтрацію виконували при 2-8 °C.

Кон'югація полісахариду з CRM197

30 Очищений CRM197, отриманий в результаті експресії в *Pseudomonas fluorescens*, як описано раніше (WO 2012/173876 A1), піддавали діалізації проти 2 мМ фосфатного буфера, рН 7,2, через 5 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком і фільтрували через 0,2 мікронний фільтр.

35 Активовані полісахариди готували для ліофілізації в концентрації 6 мг Ps/мл з концентрацією сахарози 5 % мас./об. Готували склад CRM197 для ліофілізації в концентрації 6 мг Pr/мл з концентрацією сахарози 1 % мас./об.

40 Приготовані розчини Ps і CRM197 ліофілізували окремо. Ліофілізовані матеріали Ps і CRM197 повторно розчиняли окремо в однакових об'ємах ДМСО. Розчини полісахариду і CRM197 змішували до досягнення концентрації полісахариду 5,25 г Ps/л і масового відношення полісахариду до CRM197 3,5. Масове відношення вибирали для контролю співвідношення полісахариду до CRM197 в отриманому кон'югаті. Додавали ціаноборогідрид натрію (1 моль на моль повторюваної ланки полісахариду), і кон'югацію проводили протягом 3 годин при 22 °C. Під час інкубації в реакції кон'югації борогідрид натрію додавали два рази (0,0375 моля на ланку, що повторюється полісахариду).

Відновлення борогідридом натрію

45 Борогідрид натрію (2 моль на моль повторюваної ланки полісахариду) додавали після реакції кон'югації і інкубували протягом 1 години при 22 °C. Партию розбавляли в 150 мМ хлориді натрію з приблизно 0,025 % (мас./об.) полісорбатом 20 при приблизно 4 °C. Потім додавали калій-фосфатний буфер для нейтралізації рН. Партию концентрували і піддавали діалізації при приблизно 4 °C проти 150 мМ хлориду натрію, 25 мМ фосфати калію, рН 7, через 30 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Остаточна фільтрація і зберігання продукту

Потім партію концентрували і піддавали діалізації проти 10 мМ гістидину в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20 при 4 °С через 300 кДа NMWCO ультрафільтраційну мембрану з тангенціальним потоком.

Партію ретентату фільтрували через 0,2 мікронний фільтр, потім розбавляли 10 мМ гістидином в 150 мМ хлориді натрію, рН 7,0, в присутності 0,015 % (мас./об.) полісорбату 20, аліквотували і заморожували при ≤ -60 °С.

Таблица 34

Характеристика кон'югата серотипу 35В, отриманого кон'югацією в ДМСО, для дослідження полівалентної вакцини

Mn/Mw окисненого Ps	Mn/Mw кон'югата	Ps:Pr	Витрата лізину (мол/мол CRM197)	Вільний Ps/загальний Ps	Вільний білок/загальний білок
48/82 кДа	1287/2585 кДа	2,1	6,9	7,8 %	4,6 %

Деякі методи кон'югації у водному середовищі не були описані для всіх серотипів, що використовуються в прикладах 38-51. Для методів кон'югації у водному середовищі, які не розкриті в даній заявці, аналогічні методи можна знайти в WO2018/156491.

ПРИКЛАД 38

Склад пневмококових кон'югатних вакцин

Індивідуальні пневмококові полісахарид-білкові кон'югати, приготовані з використанням різних хімії, як описано у вище наведених прикладах використовували для отримання складів 1-, 7-, 8-, 14-, 15-, 16-, 21- і 31-валентних пневмококових кон'югатних вакцин, позначених відповідно PCV1, PCV7, PCV8, PCV14, PCV15, PCV16, PCV21 і PCV31.

Вакцинний лікарський препарат PCV1 складався з серотипу 3, кон'югованого по механізму відновного амінування або в протонному (водному) розчиннику, або в апротонному (ДМСО) розчиннику, і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,1 % (мас./об.) PS-20 з цільовою кінцевою концентрацією у вакцині 84 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs).

Вакцинний лікарський препарат PCV7 складався з серотипів 3, 8, 9N, 10A, 11A, 15A і 19A, кон'югованих по механізму відновного амінування або в протонному (водному) розчиннику, або в апротонному (наприклад, ДМСО) розчиннику і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,1 % (мас./об.) PS-20. Кожний полісахарид-білковий кон'югат в PCV7 використовували в концентрації 12 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 84 мкг/мл PnPs.

Вакцинний лікарський препарат PCV8 складався з серотипів 6C, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B, кон'югованих по механізму відновного амінування або в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО), і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20. Кожен полісахарид-білковий кон'югат в PCV8 використовували в концентрації 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 32 мкг/мл PnPs.

Вакцинний лікарський препарат PCV14 складався з серотипів 3, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F і 33F, кон'югованих по механізму відновного амінування або в протонному (водному) розчиннику, або в апротонному (наприклад, ДМСО) розчиннику і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,1 % (мас./об.) PS-20. Кожен полісахарид-білковий кон'югат в PCV14 використовували в концентрації 6 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 84 мкг/мл PnPs.

Вакцинний лікарський препарат PCV15 складався з серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кон'югованих в протонному (водному) розчиннику і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20. Кожен полісахарид-білковий кон'югат використовували в концентрації 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs), за винятком 6B, який використовували в концентрації 8 мкг/мл, з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 64 мкг/мл PnPs.

Вакцинний лікарський препарат PCV16 складався із серотипів 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B, кон'югованих по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО) і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20. Кожний полісахарид-білковий кон'югат

використовували в концентрації 4 мкг/мл (мас./об.) або 8 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 64 мкг/мл або 128 мкг/мл PnPs.

Вакцинний лікарський препарат PCV21 складався з серотипів 3, 6С, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20А, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F і 35В, кон'югованих по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО) і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і PS-20 різної концентрації, як визначено в кожному прикладі. Кожний полісахарид-білковий кон'югат використовували в концентрації 4 мкг/мл (мас./об.) або 8 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 84 мкг/мл або 168 мкг/мл PnPs. У деяких прикладах PCV21 містила 250 мкг [Al]/мл у вигляді фосфату алюмінію.

Вакцинний лікарський препарат PCV31 складався з серотипів 1, 3, 4, 5, 6А, 6В, 6С, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11А, 12F, 14, 15А, 15С, 16F, 17F, 18С, 19А, 19F, 20А, 22F, 23А, 23В, 23F, 31, 33F і 35В, кон'югованих по механізму відновного амінування або в протонному (водному) розчиннику, або апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО) і був приготований в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8 150 мМ NaCl і 0,2 % PS-20. Кожний полісахарид-білковий кон'югат використовували в концентрації 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs), за винятком 6В, який використовували в концентрації 8 мкг/мл PnPs, з отриманням цільової кінцевої концентрації у вакцині 128 мкг/мл PnPs. У деяких прикладах PCV31 містив 250 мкг [Al]/мл у вигляді фосфату алюмінію.

Додаткові складі лікарських препаратів моновалентних PCV отримували з використанням кон'югата пневмококових полісахарид-білкових серотипів 6А, 6В, 6С, 10А, 15А, 15В, 15С, 16F, 17F, 20А, 23А, 23В, 24F, 31 або 35В. Додаткові подробиці описані в конкретних прикладах для цих складів.

Для приготування складу лікарського препарату PCV необхідні об'єми вихідних кон'югатів, необхідні для отримання вказаної кінцевої концентрації (мас./об.) пневмококового полісахариду (який також називається PnPs), розраховували, виходячи з об'єму партії і концентрації вихідного полісахариду.

Процес приготування складу складався з приготування початкової суміші кон'югатів з 1Х-4Х кінцевою концентрацією сумішей PnPs в 10-80 мМ гістидину, 0,0-0,8 % (мас./об.) PS-20 та 150 мМ хлориду натрію, рН 5,8.

Гістидин рН 5,8, PS-20 (якщо використовувався) і 150 мМ розчину хлориду натрію готували і додавали в посудину для приготування препарату. Окремі пневмококові полісахарид-білкові кон'югати, що зберігаються в замороженому вигляді, відморожували при 2-8 °С і потім додавали в посудину для приготування препарату. Під час додавання полісахарид-білкового кон'югата в буфер для приготування складу (суміші кон'югатів) вміст посудини перемішували до отримання гомогенної суміші за допомогою магнітного стрижня або магнітного колеса. Після внесення всіх добавок і перемішування розчину суміш кон'югатів пропускали через стерилізуючі фільтри і збирали в посудину з ад'ювантом на основі фосфату алюмінію або без нього. У деяких випадках стерилізуючі фільтри чергували з 150 мМ хлориду натрію для доведення партії до цільової концентрації.

Композиції заливали в пластикові шприци, скляні шприци або флакони.

ПРИКЛАД 39

Оцінка стабільності пневмококових кон'югатних вакцин

PCV16 (128 мкг/мл PnPs) або два лікарських препарати пневмококової кон'югатної вакцини PCV21 (PnPs 84 мкг/мл або 168 мкг/мл) заливали в шприци або флакони. Полісахарид-білкові кон'югати отримували по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО) і готували в складі з 20 мМ L-гістидину, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20. Ці лікарські препарати витримували при 25 °С або 37 °С терміном до чотирьох тижнів і при 4 °С терміном до дванадцяти тижнів. У деяких випадках шприци вміщували на платформу з горизонтальним обертанням і струшували протягом до 18 годин після зберігання протягом 1 тижня при 4, 25 або 37 °С. Таким чином імітували стрес, який виникає при транспортуванні і обробці, який може супроводжувати виробництво і розподіл лікарського препарату. Для оцінки стабільності лікарських препаратів високоефективну ексклюзійну хроматографію (HPSEC) з двома колонками Shodex (803 і 806), з'єднаними разом послідовно, і УФ-детектування багатокутного розсіювання світла (MALS) і показника заломлення (RI) для вимірювання концентрації і молярної маси складів лікарських препаратів PCV при зберіганні. Концентрацію розраховували для кожного часового інтервалу по ширині піка і потім інтегрували по всіх інтервалах для отримання кінцевого значення концентрації. Розсіювання світла пропорційне добутку молекулярної маси і концентрації аналіту. Молярну масу або молекулярну

масу в кожному інтервалі розраховували з сигналів детектора. Середньозважену (M_w) або середньочислову (M_n) молекулярну масу розраховується по всіх інтервалах для піка і записували у вигляді середньої молекулярної маси.

Зберігання може привести до пошкодження білка і/або вуглеводів в кон'югатній вакцині. Вуглеводні антигени, які містять фосфодієфірні зв'язки в основному ланцюгу або інші нестабільні елементи в повторюваній ланці полісахариду, під час зберігання протягом тривалого часу і під впливом температури можуть піддаватися деполімеризації через гідроліз. Крім того, під час зберігання і під впливом фізичних навантажень білок-носіїв або вуглевод, який використовується в кон'югатній вакцині, можуть агрегувати.

Як показано на фіг. 11, лікарські препарати PCV16 і PCV21 були стабільними протягом 4 тижнів при 25 °C і 37 °C і аж до 12 тижнів при 4 °C незалежно від концентрації полісахариду. Більше того, при горизонтальному перемішуванні після термічного стресу лікарські препарати PCV16 і PCV21 виявилися стабільними. Втрати кількості антигену при цих термічних і фізичних навантаженнях через неспецифічну адсорбцію на стінках контейнерів або посудин не спостерігалось. Крім того, не спостерігалось агрегації лікарського препарату, яка могла б вплинути на його ефективність на колонії (наприклад, безповоротне зв'язування з колонкою або неможливість входу/виходу з розділювальних колонок) при оцінці загальної дози вакцини (фіг. 12).

HPSEC UV/MALS/RI використовували для вимірювання молекулярної маси полісахарид-білкового кон'югата. Якщо полісахарид-білкові кон'югати в лікарському препараті розкладаються або деполімеризуються, зменшення молекулярної маси буде очевидним, і, якщо відбувається агрегація лікарського препарату, станеться збільшення молекулярної маси. Це вимірювання дозволяє отримати додаткову характеристику якості вакцинного лікарського препарату або проміжного продукту. Як показано на фіг. 13, лікарські препарати PCV16 і PCV21, що містять лікарські речовини, кожен з яких отримували по схемі відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО), були стійкі до деполімеризації або хімічної деградації вуглеводу і стійкі до агрегації білка в складі лікарського препарату. Це вказує на те, що лікарські препарати, в яких використовуються полісахарид-білкові кон'югати, отримані по схемі відновного амінування в апротонному розчиннику, такому як ДМСО, є стабільними при підвищеній температурі і фізичних навантаженнях. Склади демонструють високу стабільність як в кількісному, так і якісному відношеннях. Склад не втрачає загальну дозу через неспецифічну адсорбцію на бічній поверхні контейнерів або інших поверхнях, і склад не деградує і не агрегує, про що свідчить стабільна молекулярна маса вакцинного лікарського препарату (середньовагова молекулярна маса (M_w) і середньочислова молекулярна маса (M_n)).

ПРИКЛАД 40

Вплив імії кон'югації на стабільність пневмококової кон'югатної вакцини

Для приготування 15- і 16-валентних пневмококових кон'югатних вакцин, позначених PCV15 і PCV16, з концентрацією 64 мкг/мл використовували окремі пневмококові полісахарид-білкові кон'югати, отримані з використанням різних хімічних середовищ, як описано вище в прикладах. Вакцинний лікарський препарат PCV15 містив серотипи 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кон'юговані по механізму відновного амінування в протонному розчиннику (всі водні) і був приготований в 20 mM L-гістидині, pH 5,8, 150 mM NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20 (див. приклад 38). Лікарський препарат PCV16 містив серотипи 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 і 35B, кон'юговані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, всі ДМСО) і був приготований в 20 mM L-гістидині, pH 5,8, 150 mM NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20 (див. приклад 38). Кожний полісахарид-білковий кон'югат використовували в концентрації 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) за винятком 6B в PCV15, який використовували в концентрації при 8 мкг/мл, з отриманням в кожній вакцині кінцевої концентрації 64 мкг/мл PnPs.

Заповнені вакциною контейнери вміщували при 4 °C або 37 °C на термін до 1 тижня. Флуоресцентну спектроскопію з внутрішнім білком (IPFS) використовували для оцінки стабільності білка-носія, CRM197, кон'югованого з пневмококовим полісахаридом, в композиціях PCV15 або PCV16 при зберіганні протягом до 1 тижня при 4 °C і 37 °C. Спектри флуоресцентного випромінювання (Em 290-400 нм) нерозбавлених зразків збирали з допомогою спектрофлуориметра Jasco FP-6500 при кімнатній температурі в кварцовій кюветі з довжиною шляху 1 см. Використовували довжину хвилі збудження 280 нм зі швидкістю сканування 100 нм/хв. і смугою пропускання збудження і випромінювання 3 нм.

Як показано на фіг. 14, склад лікарського засобу, що містить лікарські речовини, приготовані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, всі в ДМСО), показав чудову фізичну і хімічну стабільність порівняно з вакциною, в якій використовувалися

лікарські речовини, приготовані в протонному розчиннику під час кон'югації по механізму відновного амінування (всі водні кон'югати). Інтенсивність флуоресценції лікарського препарату PCV15 при концентрації 64 мкг/мл PnPs, приготованого по механізму відновного амінування в протонному розчиннику (повністю водному) в процесі кон'югації, знизилася усього за 16 годин при 37 °C, а максимальне випромінювання вакцини змістилася з 332 нм в бік 338 нм. Вакцинний лікарський препарат PCV16 при концентрації 64 мкг/мл PnPs, в якому використовувалися лікарські речовини, приготовані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, всі в ДМСО), не показав зміни інтенсивності флуоресценції або максимуму випромінювання 338 нм. Потрібно розуміти, що результуюча інтенсивність сигналу і максимум випромінювання, отримані в результаті вимірювання IPFS, зумовлені загальною стабільністю окремих лікарських речовин в полівалентному комплексному лікарському препараті. Було показано, що вакцинний лікарський препарат, в якому використовуються лікарські речовини, приготовані в апротонному розчиннику, залишаються стабільним, в той час як вакцинний лікарський препарат, в якому використовуються лікарські речовини, приготовані в протонному розчиннику, є нестабільним.

Не обмежуючись якою-небудь конкретною теорією, така стабільність могла бути пов'язана з кон'югацією в ДМСО, що приводить до розгортання і денатурації білка-носія. Кон'югація з денатурованим білком-носієм блокувала б конформацію в денатурованому стані після кон'югації. Якщо це так, то дослідження, що розглядається, також вказує на те, що в експериментах по вивченню впливу стресу, описаних в даному описі, остаточна конформація залишається стабільною. Тому переважно використовувати вакцину з кон'югатом, в основному приготовану в апротонних розчинниках, для забезпечення адекватного і стабільного вакцинного лікарського препарату.

Якщо до складу вакцинного лікарського препарату входить суміш лікарських речовин, глікокон'югатів або полісахарид-білкових кон'югатів, отриманих в процесі кон'югації в різних розчинниках по механізму відновного амінування (водні або ДМСО), то середній максимум або інтенсивність випромінювання, виміряні для складу лікарського препарату, будуть зваженими через внесок випромінювання кожного водного полісахарид-білкового кон'югата при 332 нм і випромінювання кожного неводного полісахарид-білкового кон'югата при 338 нм. Можна очікувати, що зміна буде спостерігатися в максимумах або інтенсивності, або випромінювання при підвищеній температурі, отриманих для такої суміші в складі полівалентного лікарського препарату, в якій використовуються полісахарид-білкові кон'югати, не всі з яких були отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику. Тому переважно використовувати вакцину з кон'югатом, в основному приготовану в апротонних розчинниках, для забезпечення адекватного і стабільного вакцинного лікарського препарату.

ПРИКЛАД 41

Узагальнені дослідження імуногенності у кроликів моновалентних препаратів вибраних серотипів

Дорослих новозеландських білих кроликів (NZWR, n=3/група) імунізували внутрішньом'язово (IM) 0,25 мл або 0,5 мл (тільки для 15C) відповідною моновалентною кон'югатною вакциною в день 0 і день 14 (з чергуванням сторін). Моновалентні пневмококові вакцини, приготовані в 20 mM L-гістидину, pH 5,8, 150 mM NaCl та 0,2 % (мас./об.) PS-20 та способом приготування, описаним в прикладі 38, дозували таким чином: (1) 1 мкг PnP (6C, 10A, 15A, 16F, 17F, 20A, 23A, 23B, 24F, 31 або 35B, кожний з яких кон'югований з CRM197) з 62,5 мкг ад'юванта на основі фосфату алюмінію (APA) на кожну імунізацію або (2) 2 мкг PnP (15C-CRM197 з 125 мкг APA на імунізацію. Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації) і в дні 14 (після введення дози 1, PD1) і 28 (після введення дози 2, PD2). NZWR знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Склади вакцин вважалися безпечними і добре переносимими NZWR, оскільки не було відмічено побічних ефектів, пов'язаних з вакцинами. Всі експерименти на тваринах проводилися відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол проведення експериментів з NZWR був схвалений інституційними комітетами по догляду за тваринами і їх використанню в Merck & Co., Inc. (Кенілворт, Нью-Джерсі) і Covance (Денвер, Пенсильванія).

Сироватки, отримані від NZWR, тестували в аналізах ELISA для оцінки імуногенності IgG з використанням концентрації покриття 1-2 мг/мл відповідного PnPs. Функціональні антитіла визначали за допомогою аналізів опсонофагоцитозу (OPA) на основі раніше описаних протоколів, доступних онлайн в Довідковій лабораторії по бактеріальних респіраторних патогенах в Університеті Алабами в Бірмінгемі за допомогою програмного забезпечення

Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar et al. Відмінності імуногенності 15-валентної пневмококової полісахаридної кон'югатної вакцини (PCV15) на основі дози вакцини, шляху імунізації та штаму миші. Вакцина 35 (6): 865-72 (2017); Burton et al. Розробка та підтвердження чотириразового мультиплексного аналізу опсонізації (MOPA4) для пневмококових антитіл. Clin Vaccine Immunol 13 (9): 1004-9 (2006)).

Було виявлено, що всі моновалентні пневмококові кон'югатні вакцини є імуногенними для кроликів (фіг. 15) і генерують функціональне антитіло, яке вбиває відповідний бактеріальний штам (фіг. 16).

ПРИКЛАД 42

Оцінка перехресного захисту серотипів 15A, 15B, 15C

Кроликів імунізували 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA або 15C-CRM197/APA для оцінки перехресної реактивності між кожним серотипом.

Дорослих новозеландських білих кроликів (NZWR, n=3/група) імунізували внутрішньом'язово (IM) 0,5 мл відповідної моновалентної кон'югатної вакциною в день 0 і день 14 (з чергуванням сторін). Моновалентну пневмококову кон'югатну вакцину, приготувану в 20 mM L-гістидині, pH 5,8, 150 mM NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20 способом приготування, описаним в прикладі 38, вводили в дозі 2 мкг PnPs (15A, 15B або 15C, кожний кон'югований з CRM197) з 125 мкг APA на імунізацію. Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації) і в дні 14 (після введення дози 1, PD1) і 28 (після введення дози 2, PD2). NZWR знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Склади вакцин були визнані безпечними і добре переносимими NZWR, оскільки не було відмічено яких-небудь побічних явищ, пов'язаних з вакциною. Всі експерименти на тваринах проводилися відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол проведення експериментів з NZWR був схвалений інституційними комітетами по догляду за тваринами і використанню в обох компаніях Merck & Co., Inc і Covance (Denver, PA).

Сироватки, отримані від NZWR, тестували в аналізах ELISA для оцінки імуногенності IgG з використанням концентрації покриття 1-2 мг/мл відповідного PnPs. Функціональне антитіло визначали з допомогою OPA на основі раніше описаних протоколів, доступних онлайн в Довідковій лабораторії по бактеріальних респіраторних патогенах в Університеті Алабами в Бірмінгемі за допомогою програмного забезпечення Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation (Caro-Aguilar et al., 2017; Burton et al., 2006)).

Всі три моновалентні пневмококові кон'югатні вакцини серогрупи 15 були визнані імуногенними у кроликів (фіг. 17) і генерували функціональні антитіла, які вбивали відповідний бактеріальний штам (фіг. 18). Крім того, кролики, імунізовані моновалентними пневмоковими кон'югованими вакцинами серогрупи 15, мали еквівалентні титри PD2 IgG та OPA до гомологічного і гетерологічного полісахариду і бактеріального штаму, відповідно. Кролики, імунізовані 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA або 15C-CRM197/APA, мали перехресну реактивність до кожного пневмококового полісахариду (15A, 15B, 15C) (ФІГУРА 17). Аналіз log-перетворених даних IgG, отриманих після введення дози 2 (PD2), одностороннім ANOVA з тестом Тьюкі множинного порівняння (P-значення 0,354) не показав істотних відмінностей в титрах IgG серогрупи 15. Крім того, кролики, імунізовані 15A-CRM197/APA, 15B-CRM197/APA або 15C-CRM197/APA мали перехресну реактивність до кожного штаму бактерій *S. pneumoniae* (15A, 15B, 15C), оскільки всі гіперімунні кролячі сироватки мали функціональні антитіла до кожного оцінюваного штаму і вбивали бактерії (фіг. 18). Аналогічно, аналіз log-перетворених OPA даних, отриманих після введення дози 2 (PD2), одностороннім ANOVA з тестом Тьюкі множинного порівняння (P-значення=0,054) не показав істотних відмінностей в титрах OPA серогрупи 15.

ПРИКЛАД 43

Імуногенність PCV21 у новозеландських білих кроликів

Дорослих новозеландських білих кроликів (NZWR, n=5/група) імунізували внутрішньом'язово 0,1-0,5 мл пневмококової кон'югованої вакцини в дні 0 і 14 (з чергуванням сторін). Пневмококову вакцину PCV21, приготувану в 20 mM L-гістидині, pH 5,8, 150 mM NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20, способом приготування, описаним в прикладі 38, вводили в дозах 4, 2, 1, 0,4, 0,08 або 0,016 мкг на PnP (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F або 35B, кожний кон'югований з CRM197) на імунізацію. Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації) і в дні 14 (після дози 1, PD1) і 28 (після дози 2, PD2). NZWR знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Склади вакцин були визнані безпечними і добре переносимими NZWR, оскільки не було відмічено яких-небудь побічних

явищ, пов'язаних з вакциною. Всі експерименти на тваринах проводилися відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол проведення експериментів з NZWR був схвалений інституційними комітетами по догляду за тваринами і використанню в обох компаніях Merck і Co., Inc. і Covance (Денвер, Пенсильванія).

Сироватки, отримані від NZWR оцінювали на імуногенність IgG за допомогою мультиплексного аналізу електрохемілюмінесценції (ECL). Цей аналіз був розроблений для роботи з сироваткою кролика на основі аналізу людської сироватки, описаного Marchese et al. (Optimization i validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. Clin Vaccine Immunol. 16(3): 387-96 (2009)) за допомогою способу, розробленого MesoScale Discovery (підрозділ MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), в якому використовується мітка SULFO-TAG™, яка випромінює світло у відповідь на електрохімічну стимуляцію. Мічений SULFO-TAG™ антикроплячий IgG використовували як вторинне антитіло для тестування зразків сироватки NZWR. Функціональні антитіла визначали за допомогою мультиплексного аналізу опсонофагоцитарних реакцій (MOPA) на основі раніше описаних протоколів, доступних онлайн в Довідковій лабораторії по бактеріальних респіраторних патогенах в Університеті Алабами в Бірмінгемі за допомогою програмного забезпечення Opsotiter® 3 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar et al., 2017, supra, Burton et al., 2006, вище).

Було виявлено, що PCV21 пневмококові кон'югатні вакцини є імуногенними у кроликів (фіг. 19A, 19B, 20A і 20B) і генерують функціональні антитіла, які вбивають бактеріальні штами вакцинного типу (фіг. 21A і 21B) у всіх перевірених дозах.

Порівнянню імуногенність PD1 спостерігали для PCV21 в дозах 4, 2, 1 і 0,4 мкг на PnPs, за винятком 24F, який мав вищу імуногенність в дозі 2 мкг порівняно з дозами 4 або 1 мкг, і 15A, 15B і 15C, які мали вищу імуногенність в дозі 0,4 мкг порівняно з дозою 2 мкг (фіг. 19A і 19B). Таким чином, при вищих дозах PnPs (0,4-4 мкг/PnPs) реакція на дозу вакцини була незначною. Більш низька імуногенність спостерігалася при дозах вакцини 0,08 і 0,016 мкг PnPs, оскільки вміст багатьох серотипів був значно нижчим, ніж в 2 мкг дозі вакцини.

Порівнянню імуногенність PD2 спостерігали для PCV21 в дозах 4, 2, 1 і 0,4 мкг на PnPs (фіг. 20A і 20B).

Загалом для PCV21 в дозах 4, 2, 1 і 0,4 мкг на PnPs спостерігали порівнянні титри MOPA PD2 з тенденцією, що спостерігається у титрів MOPA, до зниження для доз PnPs вакцини 0,08 і 0,016 мкг, хоча багато з них не досягли статистичної значущості (дані не показані). PCV21 в дозі 2 мкг на PnPs був вибраний як репрезентативний набір даних для MOPA. Зокрема, кролики, імунізовані PCV21 в дозі 2 мкг, мали значно вищі титри MOPA PD1 для всіх серотипів порівняно з сироватками кроликів до імунізації, за винятком серотипу 3 (фіг. 21A). Потрібно зазначити, що сироватки кроликів до імунізації з цього дослідження мали вищі фонові титри для серотипів 16F, 31 і 35B. Кролики, імунізовані PCV21 в дозі 2 мкг, мали значно вищі титри MOPA PD2 для всіх серотипів порівняно з сироватками кроликів до імунізації (фіг. 21B). Log-перетворені дані аналізували одностороннім ANOVA за допомогою критерію Даннетта для визначення значущості.

ПРИКЛАД 44

Матеріали і методи

Тестування вільних полісахаридів

Вільний полісахарид (полісахарид, який не кон'югований з CRM197) в зразку кон'югата вимірювали спочатку осадженням вільного білка і кон'югатів дезоксихолатом (DOC) і соляною кислотою. Потім осаді фільтрували, і фільтрати аналізували на концентрацію вільного полісахариду з допомогою HPSEC/UV/MALS/RI. Вільний полісахарид розраховували у вигляді процента від загального полісахариду, виміряного з допомогою HPSEC/UV/MALS/RI.

Тестування вільного білка

Вільний полісахарид, кон'югат полісахарид-CRM197 і вільний CRM197 в зразках кон'югата розділяли з допомогою капілярного електрофорезу в режимі міцелярної електрокінетичної хроматографії (МЕКС). Коротко, зразки змішували з робочим буфером МЕКС, що містить 25 мМ борату, 100 мМ SDS, pH 9,3, і розділяли в попередньо підготовленому капілярі з плавненого кремнію без покриття. Розділення контролювали при 200 нм, і виконували кількісне визначення вільного CRM197 з допомогою стандартної кривої CRM197. Результати по вільному білку представлені у вигляді процента від загального вмісту білка, визначеного за допомогою процедури HPSEC/UV/MALS/RI.

Аналіз молекулярної маси і концентрації кон'югатів за допомогою аналізу HPSEC/UV/MALS/RI

Зразки кон'югата ін'єктували і розділяли з допомогою високоефективної ексклюзійної хроматографії (HPSEC). Детектування здійснювали послідовно за допомогою ультрафіолетового (UV) детектора, детекторів багатокутного розсіювання світла (MALS) і показника заломлення (RI). Концентрацію білка розраховували по UV280, використовуючи коефіцієнт екстинкції. Концентрацію полісахариду деконволютували з сигналу RI (що забезпечується як білком, так і полісахаридом), використовуючи коефіцієнти dn/dc , які являють собою зміну показника заломлення розчину із зміною концентрації розчиненої речовини, вираженої в мл/г. Середню молекулярну масу зразків розраховували за допомогою програмного забезпечення Astra (Wyatt Technology Corporation, Санта-Барбара, Каліфорнія), використовуючи інформацію про вимірювану концентрацію і розсіювання світла по всьому піку зразка. Є декілька форм вираження середніх значень молекулярної маси для полідисперсних молекул. Наприклад, середньочислова молекулярна маса M_n , середньовагова молекулярна маса M_w і z -середня молекулярна маса (Molecules, 2015, 20, 10313-10341). Якщо не указано інше, молекулярна маса являє собою середньовагову молекулярну масу.

Визначення витрати лізину в кон'югованому білку як спієнню кількості ковалентних зв'язків між полісахаридом і білком-носієм

Амінокислотний аналіз Waters AccQ-Tag (AAA) використовували для вимірювання ступеню кон'югації в зразках кон'югата. Зразки гідролізували з допомогою кислотного гідролізу в паровій фазі на робочій станції Eldex для розділення білків-носіїв на амінокислоти, які їх складають. Вільні амінокислоти дериватизували з використанням 6-амінохіноліл-N-гідроксисукцинімідил карбамату (AQC). Потім дериватизовані зразки аналізували з допомогою UPLC з УФ-детектування на колонці C18. Середню концентрацію білка отримували з використанням репрезентативних амінокислот, відмінних від лізину. Витрату лізину під час кон'югації (тобто втрату лізину) визначали по різниці між середньою вимірюваною кількістю лізину в кон'югаті і очікуваною кількістю лізину у вихідному білку.

ПРИКЛАД 45

Вплив процесу кон'югації на стабільність пневмококової кон'югатної вакцини

Окремі пневмококові полісахарид-білкові кон'югати, приготовані з використанням різних розчинників (водного або ДМСО) по механізму відновного амінування, як описано в прикладах вище, використовували для приготування 1-, 7-, 14- і 21-валентних пневмококових кон'югатних вакцинних лікарських продуктів, позначених як PCV1, PCV7, PCV14 і PCV21, в концентрації 84 мкг/мл.

Контейнери, наповнені вакцинним лікарським продуктом, вміщували при 4 або 37 °C на термін до 7 днів. Флуоресцентну спектроскопію з внутрішнім білком (IPFS) використовували для оцінки стабільності білка-носія CRM197, кон'югованого з пневмоковим полісахаридом, в композиціях при зберіганні до 4 °C і 37 °C. Спектри флуоресцентного випромінювання (E_m 290-400 нм) нерозбавлених зразків отримували з допомогою спектрофлуориметра Jasco FP-6500 при кімнатній температурі в кварцовій кюветі з довжиною шляху 1 см. Використовували довжину хвилі збудження 280 нм зі швидкістю сканування 100 нм/хв. і смугою пропускання збудження і випромінювання 3 нм.

Як показано на фіг. 22 А-С, склади лікарського препарату, в якому всі полісахарид-білкові кон'югати отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО), мали чудову фізичну і хімічну стабільність порівняно з вакциною, в якій всі полісахарид-білкові кон'югати отримані методом кон'югації у водному розчиннику (протонної) по механізму відновного амінування. Усього за 16 годин при 37 °C інтенсивність флуоресценції лікарських препаратів PCV1, PCV7 та PCV14, отриманих з використанням всіх полісахарид-білкових кон'югатів, приготованих по механізму відновного амінування у водному розчиннику при концентрації 84 мкг/мл PnPs, була знижена, і максимум емісії вакцини був зміщений з 332 нм в бік 338 нм. Вакцинні лікарські препарати PCV1, PCV7 та PCV14 з концентрацією 84 мкг/мл PnPs, в яких використовуються лікарські речовини, отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО), не показали зміни інтенсивності флуоресценції або максимуму випромінювання при 338 нм. Крім того, був вивчений лікарський препарат PCV21, який був приготований в складі з 20 mM L-гістидином, pH 5,8, 150 mM NaCl та 0,1 % (мас./об.) PS-20, як описано в прикладі 38, і містив полісахарид-білкові кон'югати, отримані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО). Дослідження показало чудову фізичну і хімічну стабільність після зберігання при 37 °C. PCV21 не показав зміни інтенсивності флуоресценції або максимуму випромінювання при 338 нм (фіг. 22D).

Потрібно розуміти, що отримана інтенсивність сигналу і максимум випромінювання, отримані з вимірювання IPFS (приклад 40), зумовлені сумарною стабільністю окремих полісахарид-білкових кон'югатів в полівалентному комплексному лікарському препараті. Було

показано, що вакцинний лікарський препарат, в якому всі полісахарид-білкові кон'югати приготовані в апротонному розчиннику, є стабільним, в той час як вакцинний лікарський препарат, в якому всі лікарські речовини приготовані в протонному розчиннику, є нестабільним в стресових умовах. Якщо до складу вакцинного лікарського препарату входить суміш полісахарид-білкових кон'югатів, отриманих в результаті процесу кон'югації як в протонному, так і в апротонному розчиннику, то середній максимум або інтенсивність випромінювання, виміряні для лікарського препарату, будуть зваженими з урахуванням внеску випромінювання кожного протонного полісахарид-білкового кон'югата при 332 нм і випромінювання кожного апротонного полісахарид-білкового кон'югата при 338 нм. Можна очікувати, що в такій суміші зважена зміна буде відбуватися в максимумах інтенсивності або випромінювання при підвищеній температурі через присутність полісахарид-білкових кон'югатів, отриманих в процесі протонної кон'югації.

Як показано на фіг. 23, для оцінки стабільності лікарського препарату PCV21, приготованого при 0,04 мг/мл PnPs, використовували аналіз траєкторій наночастинок (NTA). Цей метод збирає відео про популяції наночастинок, що безпосередньо відстежуються, по мірі їх руху по типу броунівського руху для екстраполяції розміру і концентрації частинок. 635 нм лазер класу 1 фокусує 80 мкм червоний лазерний промінь через рідкий зразок, освітлюючи частинки як швидко дифундуючі світлові точки. Камера CCD записує відео зі швидкістю 30 кадрів на секунду, відстежуючи рух кожної окремої освітленої частинки з плином часу. Системне програмне забезпечення ідентифікує центр кожної окремої частинки з відео і відстежує незалежно пройдену відстань для визначення середньоквадратичного зміщення. Це відстеження виконується одночасно для кожної частинки в популяції вибірки в кожному кадрі, поки не будуть проаналізовані необроблені дані, зібрані з всього відео. При одночасному вимірюванні середньоквадратичного зміщення кожної окремої частинки, що відстежується, її коефіцієнт дифузії (Dt) і сферичний еквівалентний гідродинамічний радіус (rh) визначають з допомогою рівняння Стокса-Ейнштейна. Потім програмне забезпечення представляє ці накопичені дані у вигляді розподілу розміру частинок і концентрації. Збирають необроблені дані не тільки про розмір і концентрацію частинок, але також про інтенсивність або яскравість окремої частинки. Всі ці дані апроксимують і наносять на графік окремо у вигляді залежності інтенсивності частинок від розміру частинок і концентрації частинок від їх розміру, а потім у вигляді тривимірних контурних графіків порівняння розміру частинок, концентрації і інтенсивності всіх популяцій частинок.

Кон'югатна вакцина, яка складається з білка-носія і полісахаридного антигену, може разом або окремо бути сприйнятливою до агрегації в діапазоні розмірів частинок 10-1000 нм, що робить NTA відповідним методом, вказуючим на стабільність, для оцінки і кількісного визначення явищ агрегації. Після зберігання лікарського препарату при 4 °C і 37 °C протягом 1 тижня, результати NTA не показали значного збільшення розміру частинок, що містять PS-20 в концентраціях 0,025 % мас./об., 0,05 % мас./об., 0,1 % мас./об., 0,15 % мас./об. і 0,2 % мас./об. PS20 (як показано на фіг. 23). Однак після перемішування складів протягом 6 годин при 4 °C композиція, яка не містила полісорбат 20, виявилася неефективною відносно зменшення агрегації лікарського препарату, викликаного перемішуванням, про що свідчить збільшений розмір частинок D90, розширений розподіл частинок по розмірах і збільшена інтенсивність частинок, згідно з результатами NTA. Тому переважно підтримувати полісорбат 20 на рівні від 0,025 до 0,2 % або вище (мас./об.) для стабілізації лікарського препарату під час звичайного виробництва, зберігання, доставки і обробки.

Як описано в прикладі 39, HPSEC UV/MALS/RI використовували для вимірювання молекулярної маси 21-валентного (PCV21) полісахарид-білкового кон'югатного лікарського препарату, приготованого в складі з 20 mM L-гістидину, pH 5,8, 150 mM NaCl та від 0 до 0,2 % (мас./об.) PS-20 способом приготування, описаним в прикладі 38. Склади вміщували при 4 °C або 37 °C на термін до одного тижня. У деяких випадках шприци вміщували на платформу з горизонтальним обертанням і струшували протягом до 6 годин після зберігання протягом 1 тижня при 4 °C або 37 °C. Таким чином імітували стрес, який виникає при транспортуванні і обробці, який може супроводжувати виробництво і доставку лікарського препарату. У разі деградації або деполімеризації полісахарид-білкових кон'югатів в лікарських препаратах сталося б видиме зниження молекулярної маси, а у разі агрегації складу лікарського препарату відбувалося б збільшення молекулярної маси. Це вимірювання забезпечує додаткову характеристику якості вакцинного лікарського препарату або полісахарид-білкову кон'югатів залежно від концентрації PS-20. Як показано на фіг. 24, лікарські препарати PCV21, в яких всі лікарські речовини приготовані по механізму відновного амінування в апротонному розчиннику (наприклад, ДМСО), були стійкі до деполімеризації або хімічної деградації вуглеводу і стійкі до агрегації білка в засобі лікарського препарату, що викликаються термічною обробкою, при

0,05 % до 0,15 % PS-20. У сукупності це вказує на те, що лікарський препарат PCV21 стабільний при підвищеній температурі і фізичних навантаженнях, якщо приготований з використанням PS-20 в кількості від 0,025 % до 0,2 % або вище.

ПРИКЛАД 46

5 PCV21 захист мишей від зараження

Молодих самиць мишей Swiss Webster (6-8 тижнів, n=10 на групу) імунізували внутрішньоочеревинно 0,1-0,5 мл 21-валентної кон'югованої пневмококової вакцини (PCV21) на 0-й день, 14-й день і 28-й день пневмококову вакцину PCV21 дозували при 4, 2, 0,4, 0,08 або 0,016 мкг на РnР (3, 6С, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15С, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23В, 24F, 31, 33F і 35В, кожний кон'югований з CRM197) на імунізацію. Миші знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Вакцини вважалися безпечними і добре переносимими мишами, оскільки не було відмічено побічних ефектів, пов'язаних з вакциною. На 52-й день мишей піддавали інтратрахеальному зараженню серотипу 24F *Streptococcus pneumoniae*. Культури в експонентній фазі *S. pneumoniae* центрифугували, промивали і суспендували в стерильному PBS. Перед зараженням мишей анестезували ізофлураном. 10⁵ КУО *S. pneumoniae* в 0,1 мл PBS вміщували в горло мишей, вертикально підвішених за їх різці. Аспірацію бактерій викликали м'яким витягненням язика назовні і закриттям ніздрів. Мишей зважували щодня і умертвляли, якщо втрата ваги перевищувала 20 % від початкового значення. Кров збирали через 24, 48 і 72 години для оцінки бактеріємії. Миші знаходилися під спостереженням, здійснюваним щонайменше два рази на добу навченим персоналом по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Всі експерименти на тваринах проводили відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол експериментів на мишах був схвалений інституційним комітетом по догляду і використанню тварин Merck & Co., Inc.

Сироватки мишей оцінювали на імуногенність IgG за допомогою мультиплексного аналізу електрохемілюмінесценції (ECL). Цей аналіз був розроблений для використання мишачої сироватки на основі аналізу на людської сироватки, в якому використовується мітка SULFO-TAG[™], яка випромінює світло при електрохімічній стимуляції. Мічений SULFO-TAG[™] антимишачий IgG використовували як вторинне антитіло для тестування зразків мишачої сироватки. Функціональне антитіло визначали за допомогою мультиплексного аналізу опсонофагоцитарних реакцій (МOPA) на основі раніше описаних протоколів на www.vaccine.uab.edu і програмного забезпечення Opsotiter® 3, що належить і ліцензоване Дослідницьким фондом Університету Алабами (див., Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 і Burton R.L. і Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Імунізація PCV21 генерувала титри антитіл у мишей Swiss Webster для всіх серотипів у вакцин (дані не представлені). PCV21 також виявився імуногенним у мишей Balb/c і CD1 (дані не показані). Миші Swiss Webster, імунізовані PCV21, також були захищені від зараження серотипом 24F *S. pneumoniae* (фіг. 25). Логарифмічний ранговий критерій Мантела-Коксу вказує на те, що всі імунізовані групи PCV21 були значною мірою захищені від зараження порівняно з групою, що отримувала наївну терапію ($P < 0,05$). Аналогічно, в групах мишей, імунізованих PCV21, бактеріємія практично була відсутня, що було значно менше порівняно з групою наївних тварин (дані не показані).

45 ПРИКЛАД 47

Імуногенність PCV і функціональне антитіло у кроликів

Дорослих новозеландських білих кроликів (NZWR, n=5 на групу) імунізували внутрішньом'язово (IM) 0,1 мл PCV в день 0 і день 14 (чергуючи сторони). PCV вводили в дозах 0,4 мкг РnPs на серотип на імунізацію з 25 мкг [А] в формі ад'юванта на основі фосфату алюмінію (АРА). У випадку PCV31, концентрацію серотипу 6В в дозі подвоювали до 0,8 мкг РnPs на імунізацію. PCV21 (як описано в прикладі 38) включає очищені полісахариди серотипів 3, 6С, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15С, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23В, 24F, 31, 33F і 35В, кожний з яких кон'югований з CRM197. Кожний полісахарид-білковий кон'югат готували без ад'юванта або з ним з концентрацією 250 мкг/мл/мл в формі фосфату алюмінію або АРА для оцінки дії ад'юванта (PCV21/АРА). Також були складені нижчі валентні PCV (як описано в ПРИКЛАДІ 38) для включення 8 нових ST (PCV8: 6С, 15A, 16F, 23A, 23В, 24F, 31 і 35В, кожен кон'югований з CRM197, без ад'ювантів), 16 ST не включені до будь-якого ліцензованого PCV (PCV16: 6С, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15С, 16F, 17F, 20, 23A, 23В, 24F, 31 і 35В, кожен кон'югований з CRM197, без ад'ювантів) або PCV31 (1, 3, 4, 5, 6A, 6В, 6С, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15С, 16F, 17F, 18С, 19A, 19F, 20A, 22F, 23A, 23В, 23F, 24F, 33F і 35В, кожен з

яких кон'югований з CRM197, містить 250 мкг [Al]/мл в формі фосфату алюмінію) для оцінки супресії носія по мірі збільшення валентності вакцини (PCV31/APA). У кожній вакцині використовували полісахарид-білкові кон'югати, складені у вигляді 4 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs), за винятком 6B, вміст якого в складі доводили до 8 мкг/мл (мас./об.) пневмококового полісахариду (PnPs) в PCV31 або PCV31/APA. Кінцева концентрація пневмококового полісахариду (PnPs) в кожній вакцині становила 128 мкг/мл PnP в PCV31, 84 мкг/мл PnP в PCV21, 64 мкг/мл в PCV16 і 32 мкг/мл в PCV8.

Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації) і в дні 14 (PD1) і 28 (PD2). NZWR знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Композиції вакцин вважалися безпечними і добре переносимими NZWR, оскільки не було відмічено побічних ефектів, пов'язаних з вакцинами. Всі експерименти на тваринах проводили відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол експерименту NZWR був схвалений інституційними комітетами по догляду за тваринами і їх використанню в Merck & Co., Inc і Covance (Денвер, Пенсильванія).

Сироватки кроликів оцінювали на імуногенність IgG за допомогою мультиплексного аналізу електрохемілюмінесценції (ECL). Цей аналіз був розроблений для використання кролячої сироватки на основі аналізу людської сироватки, описаного Marchese et al., Clin Vaccine Immunol. (2009) 16 (3): 387-96, з використанням методу, розробленого MesoScale Discovery (підрозділ MesoScale Diagnostics, LLC, Гейтерсбург, Меріленд), в якому використовується мітка SULFO-TAG™, яка випромінює світло при електрохімічній стимуляції. Мічені SULFO-TAG™ антикролячі IgG використовували як вторинне антитіло для тестування зразків сироватки NZWR. Функціональне антитіло визначали за допомогою мультиплексного аналізу опсонофагоцитарних реакцій (МОРП) на основі раніше описаних протоколів на www.vaccine.uab.edu і програмного забезпечення OpsoTiter® 3, що належить і ліцензоване Дослідницьким фондом Університету Алабами (Див., Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 і Burton R.L. і Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Кролячі сироватки тестували у вигляді пулу до імунізації і PD1 і окремо PD2 в мультиплексних аналізах електрохемілюмінесценції для визначення титрів антитіл. PCV генерували титри антитіл у кроликів для всіх серотипів після імунізації вакциною (дані не показані). Полісахарид серотипу 15B не був включений в PCV16, PCV21 або PCV31, однак титри антитіл до серотипу 15B спостерігалися після імунізації як PCV16, PCV21, так і PCV31. PCV21 без ад'юванта мав порівнянну або значно вищу імуногенність (серотипність 3, 7F, 10A, 19A, 23A і 23B) порівняно з PCV21 з APA (фіг. 26A-B і фіг. 28), що свідчить про відсутність додаткової переваги від імуногенності у кроликів з APA, включеної у вакцину.

Епітопічна супресія, індукована носієм, стосується інтерференції з відповіддю антитіла на антиген (такий як капсульний полісахарид), який зв'язаний з тим же білком-носієм (таким як CRM197). Вважається, що інтерференція виникає через конкуренцію за обмежене число специфічних для носія праймованих Т-хелперів. У результаті може спостерігатися зниження відповіді на капсульний полісахарид. Pfizer виявив зниження імуногенності загальних серотипів у вакцинах по мірі збільшення валентності вакцини з 7-валентної до 13-валентної [Порівняння IgG-антитіла GMC Prevnar (7-валентна) з Prevnar13 (таблиця 9, стор. 29 PCV13 монографії)]. Таким чином, мета експерименту полягала в дослідженні імуногенності PCV з нижчою валентністю порівняно з PCV21 (фіг. 27A-C). PCV8 (8 нових серотипів) показав порівнянну з PCV21 імуногенність для 8 загальних серотипів (фіг. 29). PCV16 (PCV21 мінус 5 серотипів, що перекриваються з PCV15) показав порівнянну з PCV21 імуногенність для 15 із 16 загальних серотипів (фіг. 29). Серотип 31 показав вищу імуногенність відносно PCV16 (фіг. 29). Загалом, у NZWR не спостерігали серйозних тенденцій супресії носія, що викликається PCV21. PCV31/APA мав порівнянну імуногенність відносно PCV21/APA для 12 з 21 загальних серотипів. 10 серотипів (6C, 7F, 9N, 12F, 15A, 15B (не в PCV21), 15C, 17F, 19A та 23A) мали вищу імуногенність у PCV31, коливалися від 2,9 до 11 разів (ФІГУР 30). Загалом у NZWR не спостерігали серйозних тенденцій супресії носія, що викликається PCV31.

Було виявлено, що PCV є імуногенними у кроликів і генерують функціональні антитіла, які вбивають бактеріальні штами вакцинного типу. Сироватки кроликів тестували в мультиплексних аналізах опсонофагоцитарних реакцій (МОРП) для визначення функціональних титрів антитіл. PCV21 мав порівнянну або вищі титри ОРА PDA порівняно з PCV21/APA, PCV8 і PCV16 (фіг. 31). Log-перетворені дані аналізували одностороннім ANOVA за допомогою критерію Даннетта для визначення значущості. PCV21 мав значно вищі титри ОРА для серотипу 16F порівняно з PCV8 і для серотипів 12F, 23A і 19A порівняно з PCV21/APA. PCV31 мав значно вищі титри ОРА для

серотипу 23A порівняно з PCV21.

ПРИКЛАД 48

Імуногенність PCV21 у дорослих макак-резус

PCV21 також оцінювали на моделях імуногенності у дорослих макак-резус. Макаки-резус
5 були внутрішньом'язово імунізовані PCV21 в дні 0, 28 і 56. PCV21 дозували по 1 мкг РnР в об'ємі 0,25 мл (3, 6С, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F і 35B, кожний кон'югований з CRM197) на одну імунізацію. Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації, день 0) і в дні 14 (PD1), 28, 42 (PD2), 56, 70 (PD3) і 84.

Сироватку резус оцінювали на імуногенність IgG за допомогою мультиплексного аналізу
10 електрохемілюмінесценції (ECL). Цей аналіз був розроблений для використання сироватки резус на основі аналізу людської сироватки, описаного Marchese et al. і Skinner et al. (Marchese R.D. et al., Clin. Vaccine Immunol. (2009) 16(3):387-96 і Skinner, J.M. et al., Vaccine (2011) 29(48):8870-8876) з використанням технології, розробленої MesoScale Discovery (підрозділ MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MD), в якому використовується мітка SULFO-TAG™, яка випромінює світло при електрохімічній стимуляції. Мічений SULFO-TAG™ антилюдський IgG
15 використовували як вторинне антитіло для тестування зразків сироватки резус. Функціональне антитіло визначали за допомогою мультиплексного аналізу опсонофагоцитарних реакцій (MOPA) на основі раніше описаних протоколів на www.vaccine.uab.edu і програмного забезпечення Opsotiter® 3, що належить і ліцензоване Дослідницьким фондом Університету Алабами (див., Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 і Burton R.L. і Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Було виявлено, що PCV21 є імуногенним у дорослих мавп і генерує функціональні антитіла, які вбивають бактеріальні штами вакцинного типу у всіх протестованих часових точках (фіг. 32 і 33). Також потрібно зазначити, що PCV21, який містить полісахаридні кон'югати 15A-CRM197 і 15C-CRM197, також забезпечує перехресну реактивність відносно 15B, про що свідчать
25 результати ECL. PCV21 був імуногенним у мавп після однієї дози вакцини (фіг. 32). Більшість серотипів досягли свого максимального титру в точці PD1, за винятком ST 6C, 12F і 24F, які були ефективні після додаткових імунізацій. Дорослі макаки-резус показали вищі титри антитіл, що раніше існували порівняно з попередніми дослідженнями PCV у малюків макак-резус. Титри антитіл, що раніше існували, були найбільш очевидні при тестуванні зразків сироваток методом
30 MOPA, що утруднювало визначення титру опсонофагоцитів. Всі моменти часу дослідження були протестовані методом MOPA у вигляді об'єднаних або окремих зразків, але для полегшення перегляду показані дані тільки до імунізації, PD1 і PD3 (фіг. 33), оскільки титри OPA між PD1 і PD3 не дали істотних відмінностей.

PCV21 імунізовані сироватки макаки-резус оцінювали на перехресний захист від інших
35 бактерій *S. pneumoniae* (фіг. 34). Сироватка макак, імунізованих PCV21, мала перехресний захист від серотипів 6A, 6B і 23F, але не від 19F. Перехресний захист від 6A і 6B, ймовірно, зумовлений імунізацією полісахаридним кон'югатом 6C-CRM197 в складі полівалентного PCV21. Аналогічним чином, імунізація полісахаридними кон'югатами 23A-CRM197 і 23B-CRM197 в складі полівалентного PCV приводила до перехресного захисту від серотипу 23F. Імунізація PCV21, що містить полісахаридний кон'югат 19A-CRM197, не забезпечувала перехресний захист від 19F.

ПРИКЛАД 49

Імуногенність PCV21 у дорослих макак-резус. Оцінка супресії ад'юванта і переносника

Інше дослідження на мавпах включало оцінку PCV21 з APA і без нього і порівняння
45 загальної серогенної імуногенності для оцінки супресії носія. Дорослих макак-резус (n=5 на групу) імунізували внутрішньом'язово вакцинами половинною людською дозою в день 0 дослідження. PCV21 вводили в дозі 1 мкг РnРs в об'ємі 0,25 мл (3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15C, 16F, 17F, 19A, 20, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F і 35B, кожний кон'югований з CRM197)
50 на одну імунізацію. Одна група включала PCV21 з ад'ювантом в кількості 62,5 мкг [Al] в формі фосфату алюмінію. Інша група включала PCV15, що вводиться в дозі 1 мкг РnРs, в об'ємі 0,25 мл (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кожний з яких кон'югований з CRM197, причому доза 6B становила 2 мкг) на одну імунізацію і з ад'ювантом в кількості 62,5 мкг [Al] в формі фосфату алюмінію. Інша група включала Prevnar13® (PCV13), що вводиться в дозі 1,1 мкг РnРs, в об'ємі 0,25 мл (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, кожний з яких кон'югований з CRM197, причому доза 6B становила 2,2 мкг) на одну імунізацію. Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації, день 0) і в день 28.

Було виявлено, що PCV21 є імуногенним у дорослих мавп і генерує функціональні антитіла, які вбивають бактеріальні штами вакцинного типу. PCV21 без ад'юванта показала порівнянну
60 або значно вищу імуногенність (серотипи 15A і 15B) порівняно з PCV21 з APA (фіг. 35). PCV21

не включала серотип 15B.

PCV21 імунізованих мавп порівнювали з мавпами, імунізованими PCV15 і Prevnar13. PCV21 і PCV15 мають 5 загальних серотипів (3, 7F, 19A, 22F, 33F); у мавп, імунізованих PCV21 або PCV15, не було відмінностей в імуногенності цих 5 серотипів (фіг. 36). PCV21 і Prevnar13 мають 3 загальні серотипи (3, 7F, 19A); в імуногенності серотипів 7F і 19A не було відмінностей. Prevnar13 імунізовані мавпи мали нижчі титри антитіл до серотипу 3 порівняно з PCV21 (фіг. 36). Це відкриття узгоджується з клінічними даними для PCV15 у людини, що свідчить про те, що серотип 3 є більш імуногенним у вакцині Merck PCV15. Разом, ці результати передбачають, що супресія носіїв не спостерігається у дорослих макак-резус, імунізованих PCV21, порівняно з такою у Prevnar13 або PCV15.

ПРИКЛАД 50

Перехресна реактивність серотипів 6A, 6B і 6C - моновалентне дослідження

Моновалентний лікарський препарат отримували з використанням пневмококового полісахаридного кон'югата 6A-CRM197 або пневмококового полісахаридного кон'югата 6B-CRM197, який готували в складі з 20 мМ гістидином, рН 5,8, 150 мМ хлориду натрію і 0,1 % мас./об. полісорбату-20 (PS-20) при цільовій концентрації загального полісахариду 4,0 мкг/мл будь-якого серотипу. Кон'югати отримували шляхом кон'югації білка CRM197 окремо з кожним типом пневмококового полісахариду (PnPs) (-6A або -6B). Необхідний об'єм вихідних кон'югатів, необхідний для отримання цільової концентрації окремих серотипів, розраховували на основі об'єму партії і концентрації окремих вихідних полісахаридів. Окремі кон'югати додавали до розчину гістидину, хлориду натрію і PS-20 з отриманням суміші 2X кон'югата. Посудину для приготування препарату, що містить суміш 2X кон'югата, змішували з допомогою магнітної мішалки і виконували стерильну фільтрацію в іншу посудину. Потім стерильну відфільтровану суміш 2X розбавляли сольовим розчином для досягнення необхідних цільових концентрацій загального полісахариду і наповнювача. Потім склади вміщували у флакони і зберігали при 2-8 °C.

Кроликів імунізували 6A-CRM197 або 6B-CRM197 для оцінки перехресної реактивності в серогрупі 6. Дорослих новозеландських білих кроликів (NZWR, n=3/група) імунізували внутрішньом'язово (IM) 0,25 мл відповідної моновалентної кон'югатної вакцини в день 0 і день 14 (з чергуванням сторін). Моновалентну пневмококову кон'югатну вакцину, приготовану в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8, 150 мМ NaCl і 0,1 % (мас./об.) PS-20 за допомогою способу приготування, описаного в прикладі 38, вводили в дозі 1 мкг PnPs (6A або 6B, кожний кон'югований з CRM197). Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації) і в дні 14 (після введення дози 1, PD1) і 28 (після введення дози 2, PD2). NZWR знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Композиції вакцин вважалися безпечними і добре переносимими NZWR, оскільки не було відмічено побічних ефектів, пов'язаних з вакцинами. Всі експерименти на тваринах проводили відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол експерименту NZWR був схвалений інституційними комітетами по догляду за тваринами і їх використанню в Merck & Co., Inc і Covance (Денвер, Пенсильванія).

Сироватки NZWR тестували в аналізах ELISA для оцінки імуногенності IgG з використанням відповідної концентрації покриття 2 мкг/мл PnPs. Функціональне антитіло визначали за допомогою аналізів опсонофагоцитозу (OPA) на основі раніше описаних протоколів на www.vaccine.uab.edu і програмного забезпечення OpsoTiter® 3, що належить і ліцензоване Дослідницьким фондом Університету Алабами (Див., Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 і Burton R.L. і Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Виявлено, що і 6A-CRM197, і 6B-CRM197 є імуногенними у кроликів (фіг. 37) і генерують функціональне антитіло, яке вбиває відповідний бактеріальний штам (фіг. 38). Крім того, кролики, імунізовані моновалентними пневмококовими кон'югатними вакцинами серогрупи 6, мали еквівалентні титри IgG PD2 і результати OPA для гомологічного і гетерологічного полісахариду і бактеріального штаму, відповідно. Всі кролики, імунізовані 6A-CRM197 або 6B-CRM197, мали перехресну реактивність до кожного пневмококового полісахариду (PnPs 6A, PnPs 6B і PnPs 6C) (фіг. 37). При використанні log-перетворених даних IgG після введення дози 2 (PD2), проаналізованих з допомогою одностороннього ANOVA, не спостерігали значущих відмінностей в титрах IgG в серогрупі 6. Крім того, кролики, імунізовані 6A-CRM197 або 6B-CRM197, мали перехресну реактивність до кожного бактеріального штаму *S. pneumoniae* (6A, 6B і 6C), оскільки всі гіперімунні кролячі сироватки мали функціональне антитіло до кожному оцінюваному штаму і вбивали бактерії (фіг. 38). Аналогічно, дані OPA, отримані після дози 2 (PD2), логарифмічно проаналізовані з одностороннім ANOVA, не показали значущих

відмінностей в титрах ОРА в серогрупі 6.

ПРИКЛАД 51

Перехресна реактивність серотипів 20А і 20В - моновалентне дослідження

Моновалентний лікарський препарат готували з використанням пневмококового полісахаридного кон'югата 20А-CRM197 в складі з 20 мМ гістидином, рН 5,8, 150 мМ хлоридом натрію і 0,2 % мас./об. полісорбатом-20 (PS-20) з концентрацією 4,0 мкг/мл. Склад готували з 250,0 мкг [Al]/мл у вигляді фосфату алюмінію як ад'юванта (20А-CRM197/АРА). Кон'югат готували кон'югацією білка CRM197 окремо з пневмококовим полісахаридом (PnPs) типу 20. Необхідний об'єм вихідного кон'югата, необхідний для отримання цільової концентрації окремого серотипу, розраховували на основі об'єму партії і концентрації окремого вихідного полісахариду. Одиночний кон'югат додавали до розчину гістидину, хлориду натрію і PS-20 з отриманням суміші 4Х кон'югата при 16,0 мкг/мл. Посудину для складу, що містить суміш кон'югата, змішували з допомогою магнітної мішалки і виконували стерильну фільтрацію в іншу посудину. Потім стерильно відфільтровану суміш 4Х додавали в іншу посудину, що містить ад'ювант на основі фосфату алюмінію до досягнення необхідних цільових концентрацій полісахариду, наповнювача і ад'юванта. Потім склади вміщували в скляні флакони і зберігали при 2-8 °С.

Кроликів імунізували 20А-CRM197/АРА або PCV21 для оцінки перехресної реактивності серогрупи 20. Дорослих новозеландських білих кроликів (NZWR, n=3/група) імунізували внутрішньом'язово (ІМ) пневмококовою кон'югатною вакциною в день 0 і день 14 (сторони почергово). Моновалентну пневмококову кон'югатну вакцину, приготовану, як описано вище, вводили в дозі 1 мкг PnPs в 0,25 мл (ST20А, кон'югований з CRM197 і 62,5 мкг [Al] в формі фосфату алюмінію, використовували як ад'ювант), полівалентна пневмококова кон'югатна вакцина PCV21 (84 мкг/мл PnPs, приготована в складі з 20 мМ L-гістидином, рН 5,8 150 мМ NaCl і 0,2 % (мас./об.) PS-20 способом приготування, описаним в прикладі 38, вводили в дозі 0,4 мкг PnPs в 0,1 мл (серотипи 3, 6С, 7F, 8, 9N, 10А, 11А, 12F, 15А, 15С, 16F, 17F, 19А, 20, 22F, 23А, 23В, 24F, 31, 33F і 35В, кожний з яких кон'югований з CRM197). Сироватки збирали до початку дослідження (до імунізації) і в дні 14 (після введення дози 1, PD1) і 28 (після введення дози 2, PD2). NZWR знаходилися під щонайменше щоденним спостереженням навченого персоналу по догляду за тваринами на наявність ознак захворювання або дистресу. Композиції вакцин вважалися безпечними і добре переносимими NZWR, оскільки не було відмічено побічних ефектів, пов'язаних з вакцинами. Всі експерименти на тваринах проводили відповідно до суворих рекомендацій Керівництва по догляду і використанню лабораторних тварин Національного інституту охорони здоров'я. Протокол експерименту NZWR був схвалений інституційними комітетами по догляду за тваринами і їх використанню в Merck & Co., Inc і Covance (Денвер, Пенсильванія).

Сироватки NZWR тестували в аналізах опсонофагоцитозу (ОРА) для оцінки функціональних антитіл на основі раніше описаних протоколів на www.vaccine.uab.edu і програмного забезпечення OpsoTiter® 3, що належить і ліцензоване UAB Дослідницьким фондом Університету Алабами (See, Caro-Aguilar I. et al., Vaccine (2017) 35(6):865-72 і Burton R.L. і Nahm M.H. Clin. Vaccine Immunol. (2006) 13(9):1004-9).

Кролики, імунізовані як моновалентними вакцинами 20А-CRM197/АРА, так і полівалентними вакцинами PCV21, генерували функціональні антитіла, які вбивали обидва серотипи *S. pneumoniae* 20А і 20В (фіг. 39). Це говорить про те, що серотипи 20А і 20В мають спільну структурну схожість, що забезпечує перехресну реактивність всередині серогрупи.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110>Мерк Шарп Енд Доум Корп.

Сміт Вілльям Дж.

Макгью Патрік

Вінтерз Майкл Алберт

Скіннер Джулі М.

Ге Цзянь

Мусей Луві

Абейгунавардана Чітрананда

Цуй Ядун Адам

Косинські Майкл Дж.

<120>КОМПОЗИЦІЇ, ЯКІ МІСТЯТЬ КОН'ЮГАТИ ПОЛІСАХАРИД
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE З ВІЛКОМ, І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 24534-WO-РСТ

5

<160> 1

<170>PatentІнверсія 3.5

10

<210> 1

<211> 535

<212>Білок

<213>Штучна послідовність

15

<220>

<223>Варіант CRM197 дифтерійного токсину

<400> 1

20

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
1 5 10 15

25

Phe Ser Ser Tyr His GlyThr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser GlyThrGlnGlyAsn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala AlaGly
50 55 60

35

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala GlyGly Val
65 70 75 80

40

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

45

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

50

Pro Leu Met Glu Gln Val GlyThr Glu GluPhe Ile Lys ArgPheGly
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

55

Ser Ser Val Glu Tyr Ile AsnAsnTrp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

60

Val Glu Leu Glu Ile AsnPhe Glu ThrArgGly Lys ArgGlyGln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala GlyAsnArg Val Arg
 180 185 190
 5
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 10
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 15
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 20
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu GluPhe His GlnThr Ala Leu Glu
 245 250 255
 25
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val ThrGlyThrAsn Pro Val
 260 265 270
 30
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala AlaTrp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 35
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys ThrThr Ala Ala Leu
 290 295 300
 40
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 45
 Val His HisAsnThr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 50
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 55
 Ile GlyPhe Ala Ala Tyr AsnPhe Val Glu Ser Ile IleAsn Leu Phe
 355 360 365
 60
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr AsnArg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 65
 Lys ThrGln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser TrpAsnThr
 385 390 395 400
 70
 Val Glu Asp Ser Ile IleArgThrGlyPheGlnGly Glu Ser Gly His
 405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu AsnThr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
420 425 430

5 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

10 His Ile Ser Val AsnGlyArg Lys Ile Arg Met ArgCysArg Ala Ile
450 455 460

15 Asp Gly Asp Val ThrPheCysArg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

20 AsnGly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser SerSer
485 490 495

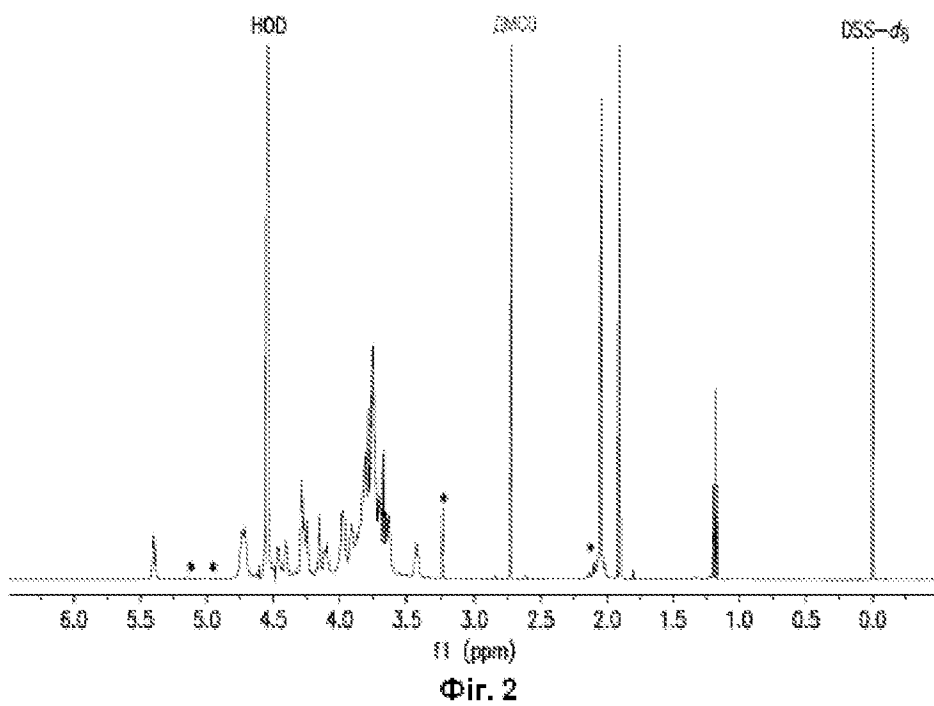
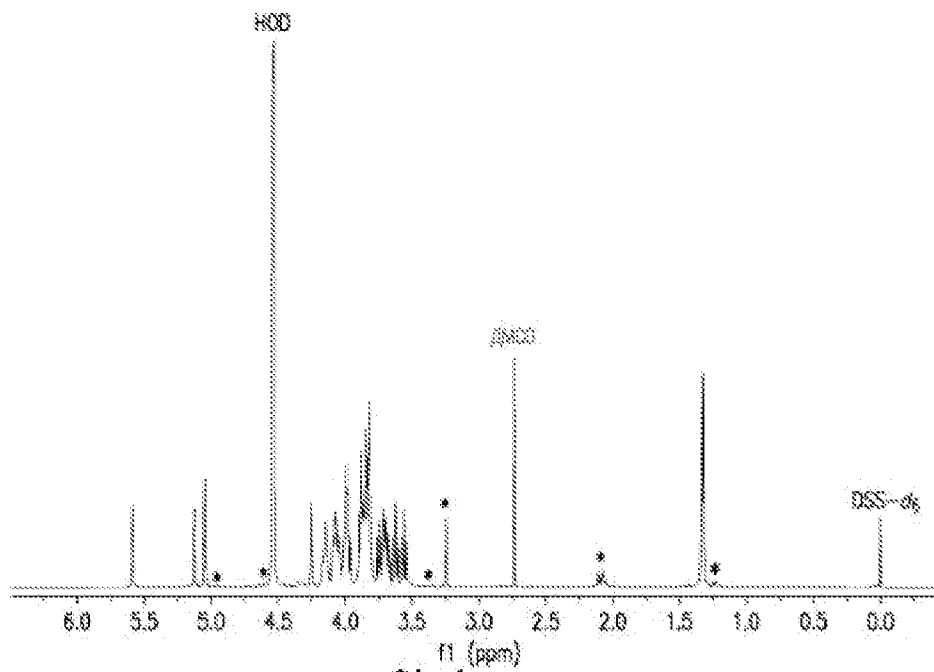
Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

25 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

30 Leu PhePhe Glu Ile Lys Ser
530 535

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 35 1. Полівалентна імуногенна композиція, яка містить кон'югати полісахаридів *S. pneumonia* з білком-носієм, де кожний із кон'югатів містить полісахарид конкретного серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* складаються із 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, де-О-ацетильованого 15B, 17F і 20A, і білок-носії являє собою CRM197.
- 40 2. Полівалентна імуногенна композиція за п. 1, в якій де-О-ацетильований полісахарид 15B має вміст О-ацетилю у розрахунку на повторювану ланку менше 5 %.
3. Полівалентна імуногенна композиція, яка містить кон'югати полісахаридів *S. pneumonia* з білком-носієм, де кожний із кон'югатів містить полісахарид конкретного серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* складаються із 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15C, 17F і 20A, і білок-носії являє собою CRM197.
- 45 4. Полівалентна імуногенна композиція, яка містить кон'югати полісахаридів *S. pneumonia* з білком-носієм, де кожний із кон'югатів містить полісахарид конкретного серотипу *S. pneumoniae*, кон'югований з білком-носієм, де серотипи *S. pneumoniae* складаються із 3, 7F, 19A, 22F, 33F, 6A, 15A, 16F, 23A, 23B, 24F, 31, 35B, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F і 20A, і білок-носії являє собою CRM197.
- 50



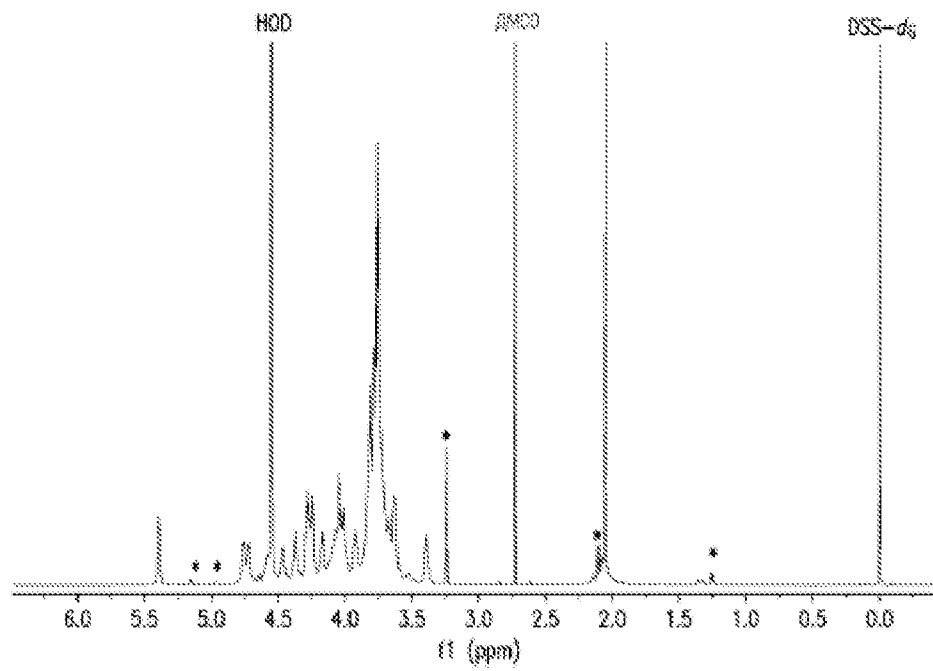


Fig. 3

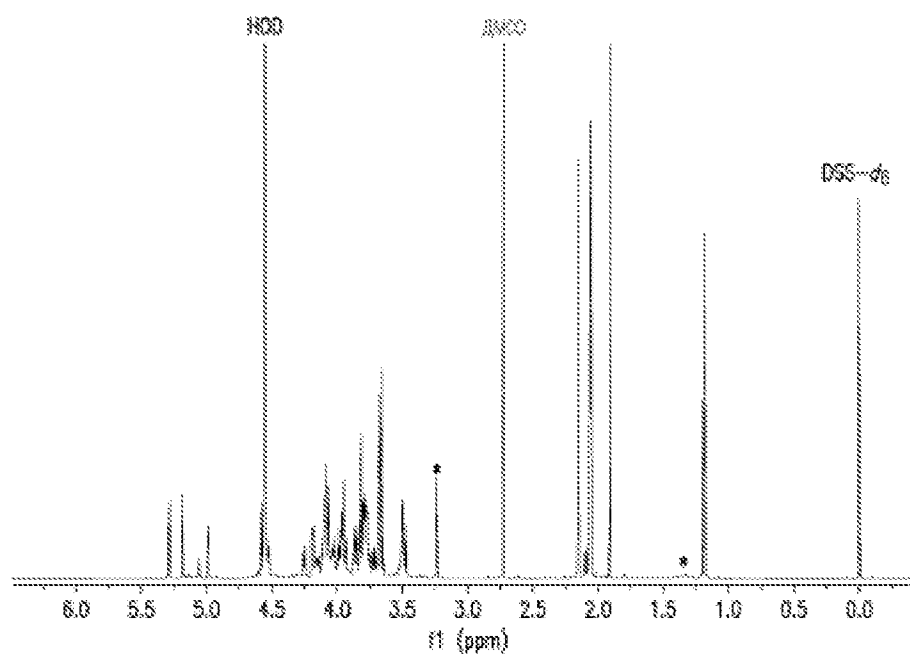


Fig. 4

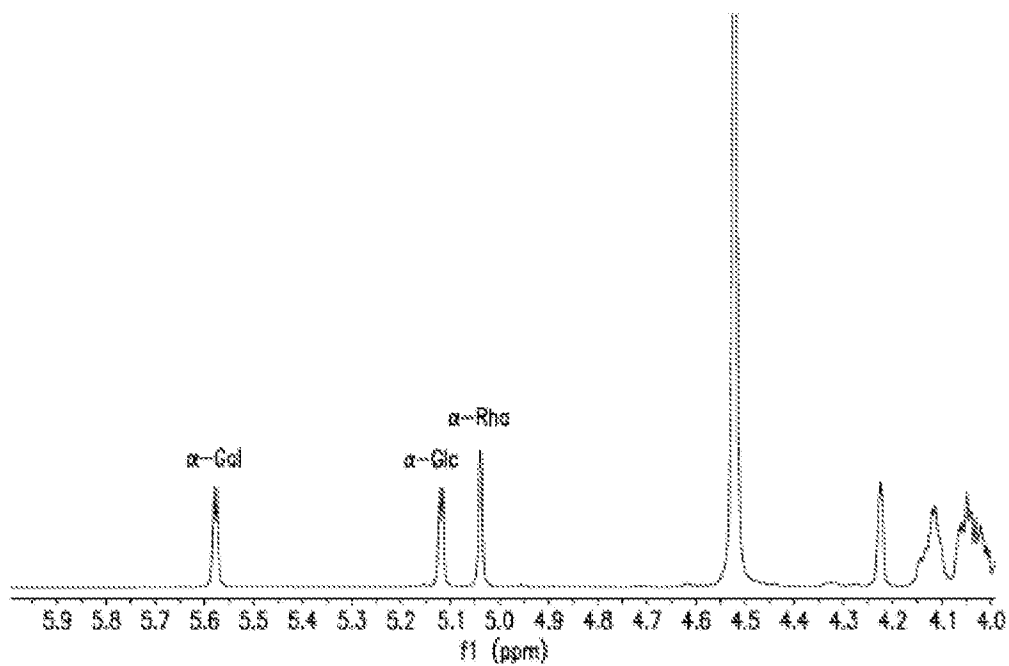


Fig. 5

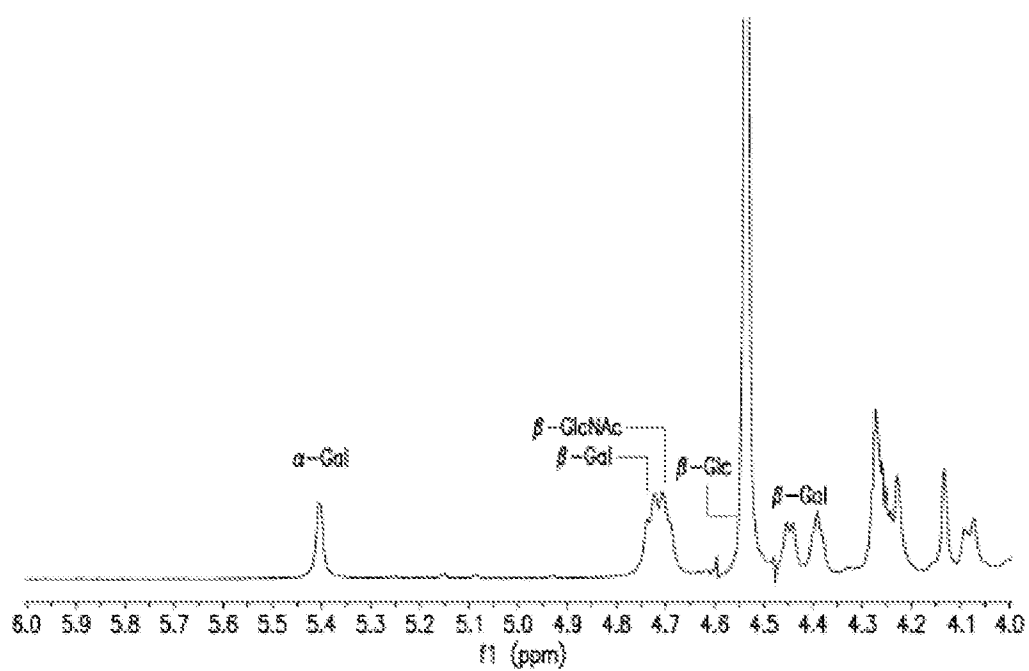


Fig. 6

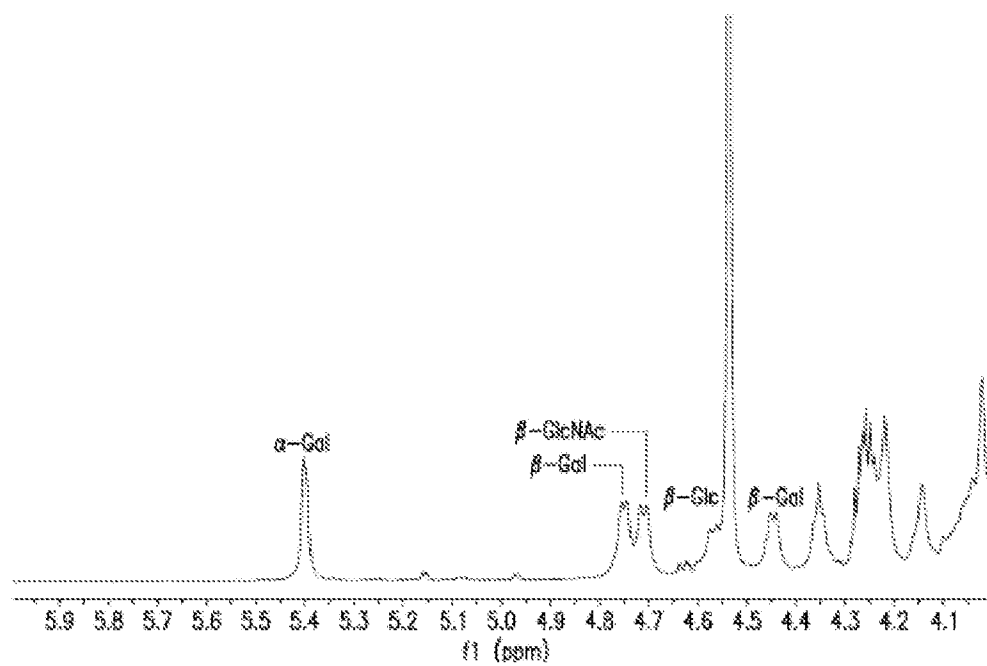


Fig. 7

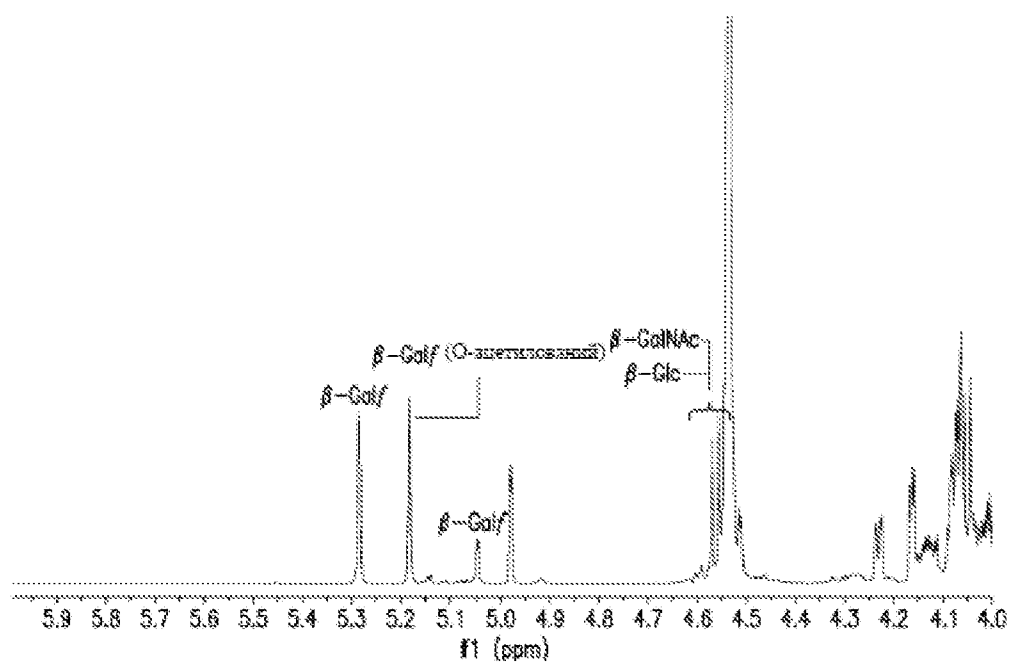


Fig. 8

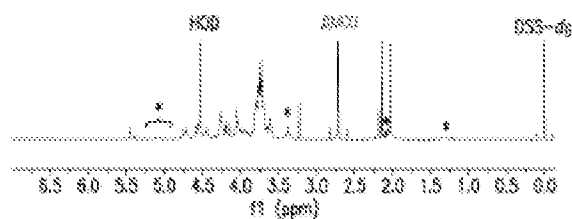


Fig. 9A

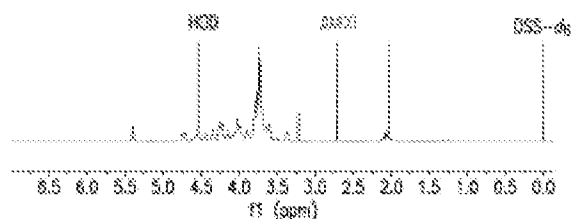


Fig. 9B

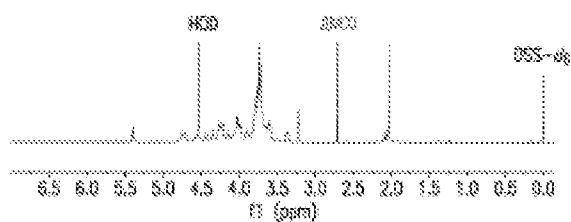


Fig. 9C

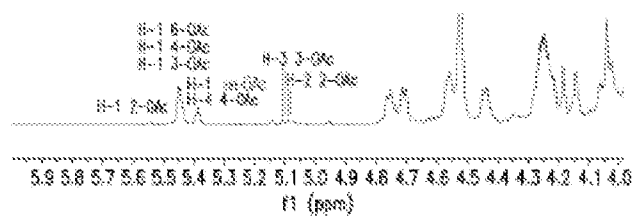


Fig. 10A

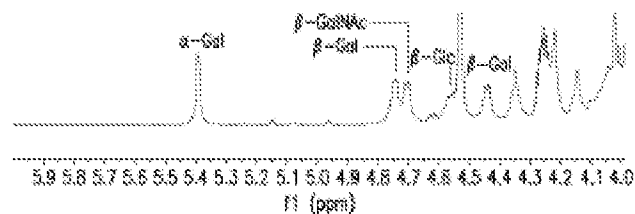


Fig. 10B

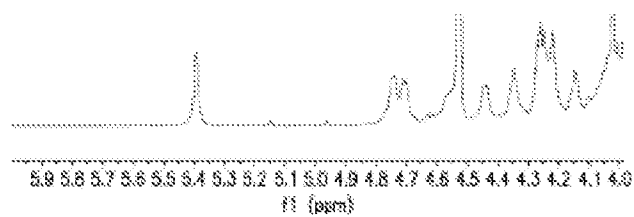


Fig. 10C

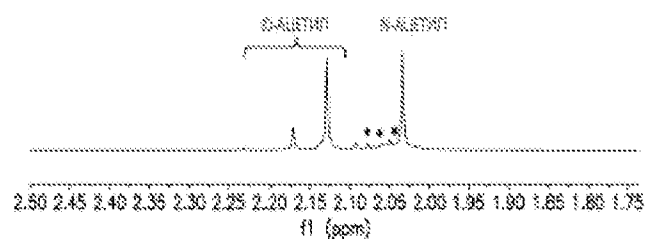


Fig. 10D

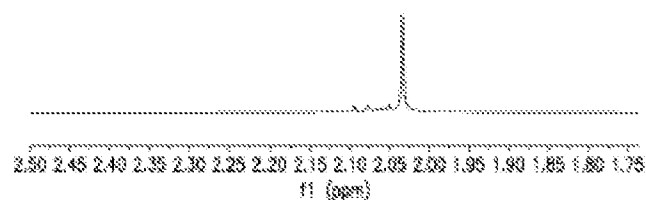


Fig. 10E

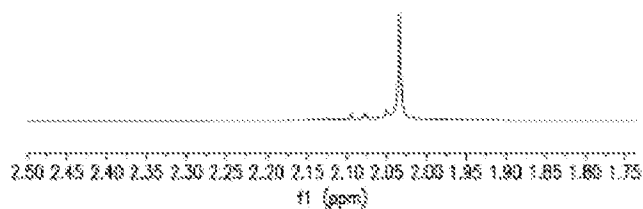


Fig. 10F

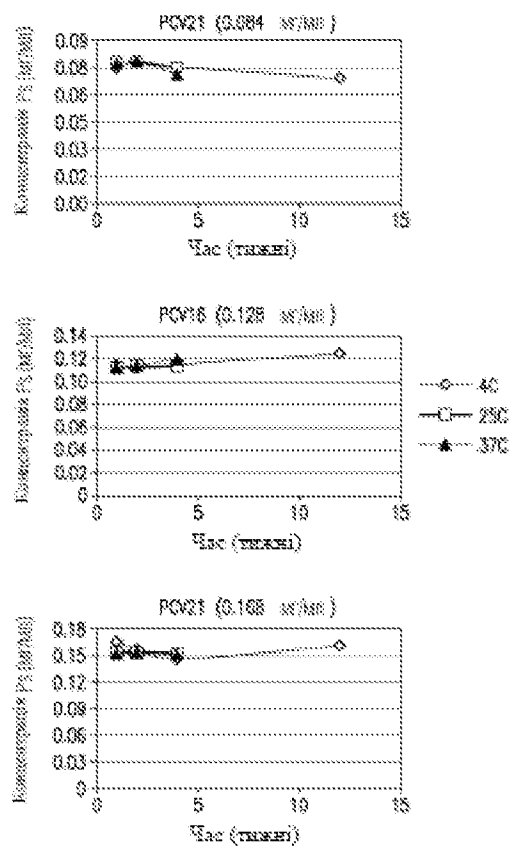


Fig. 11

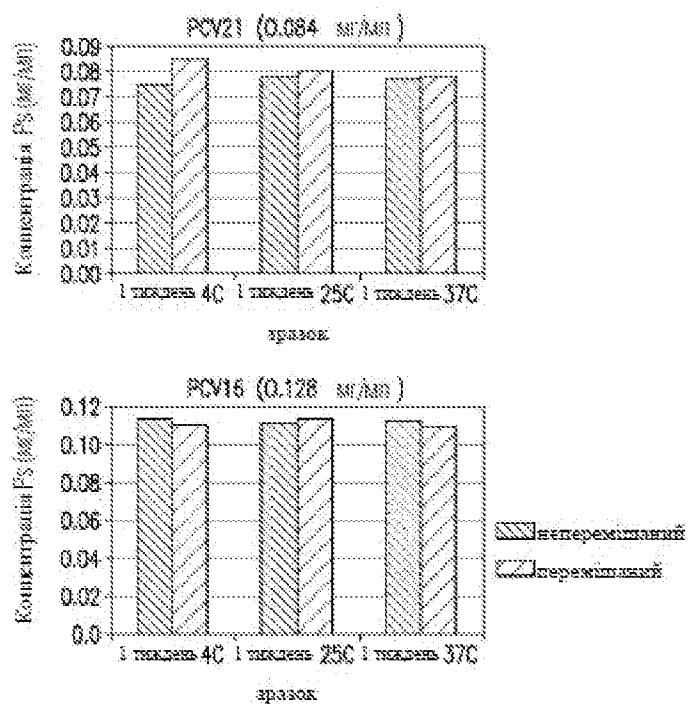
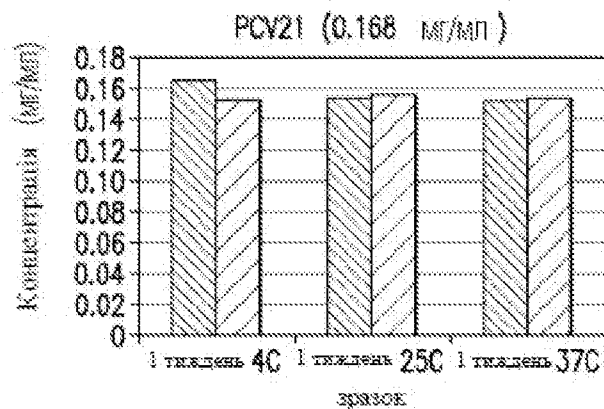
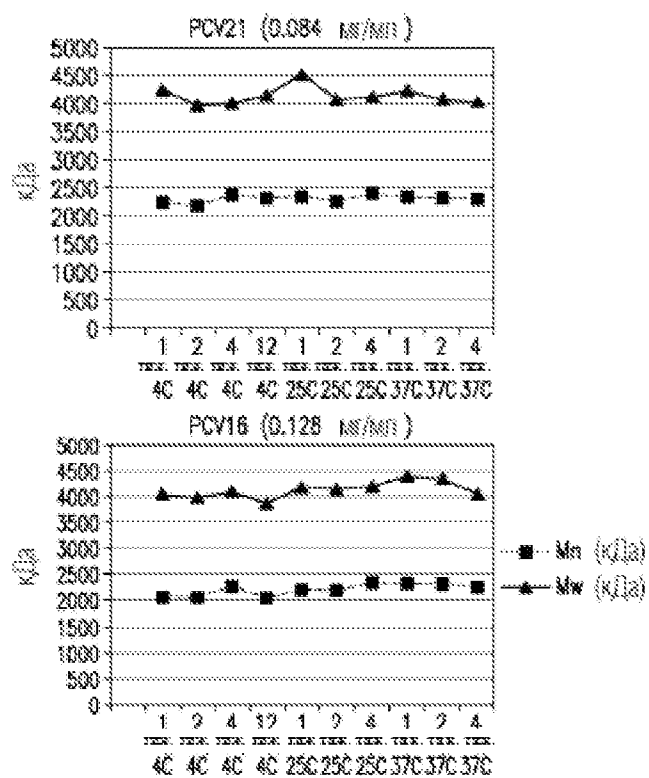


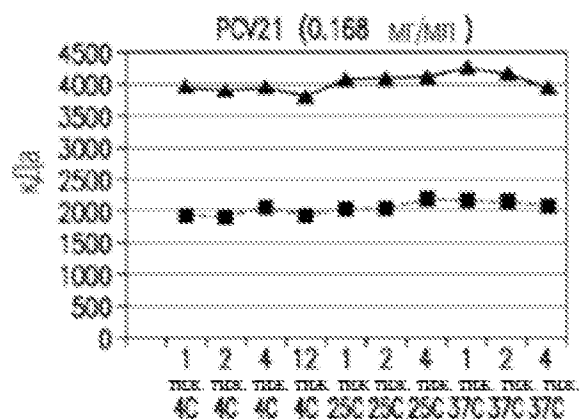
Fig. 12



Фіг. 12 (продовження)



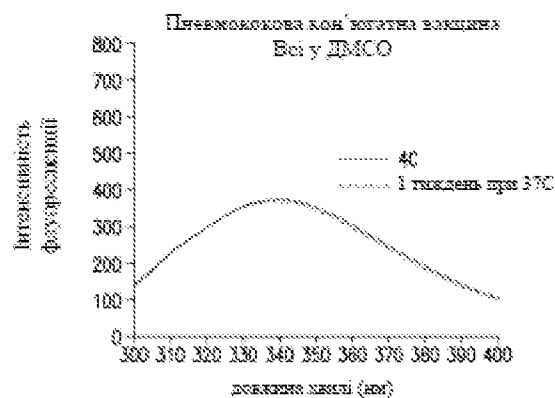
Фіг. 13



Фіг. 13 (продовження)



Фіг. 14А



Фіг. 14В

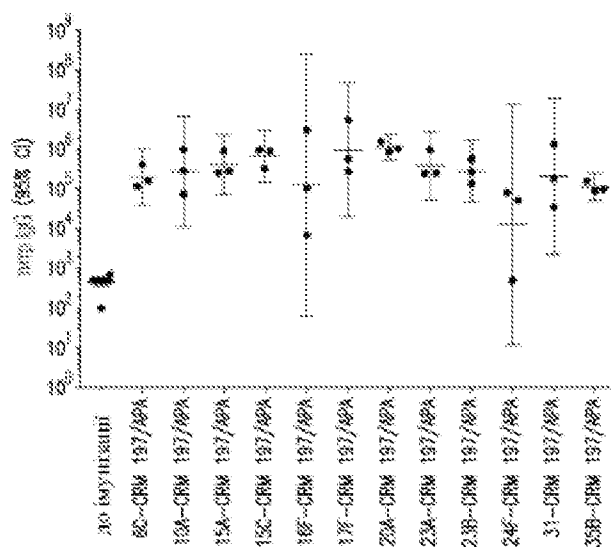


Fig. 15

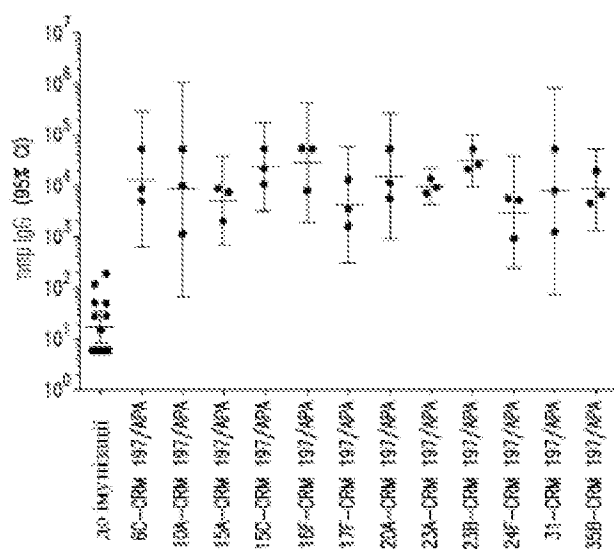


Fig. 16

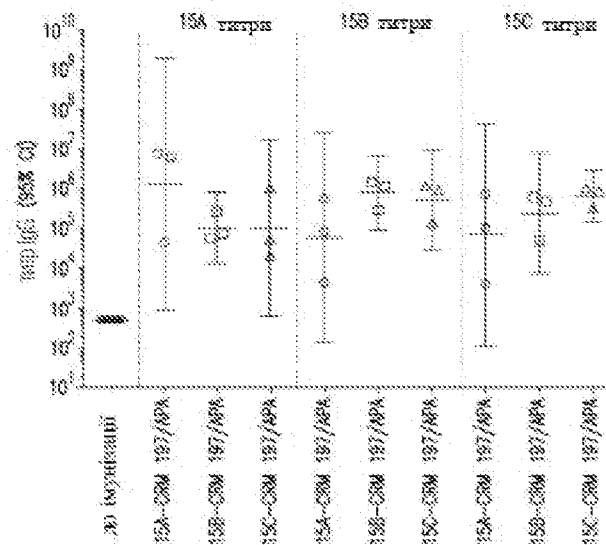


Fig. 17

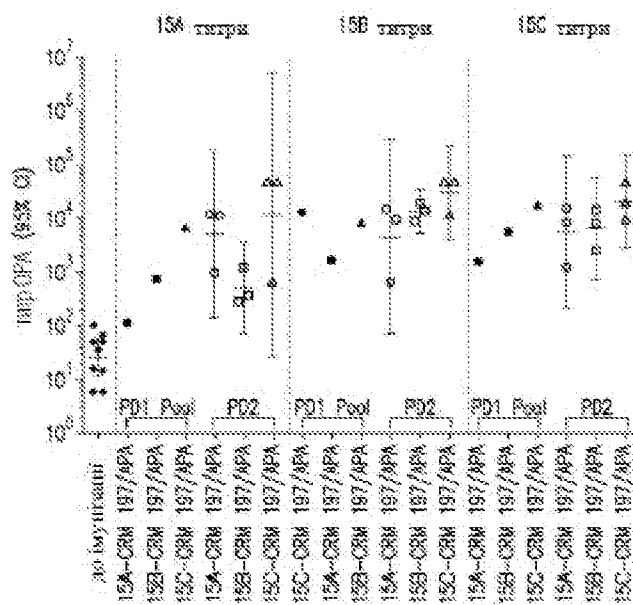
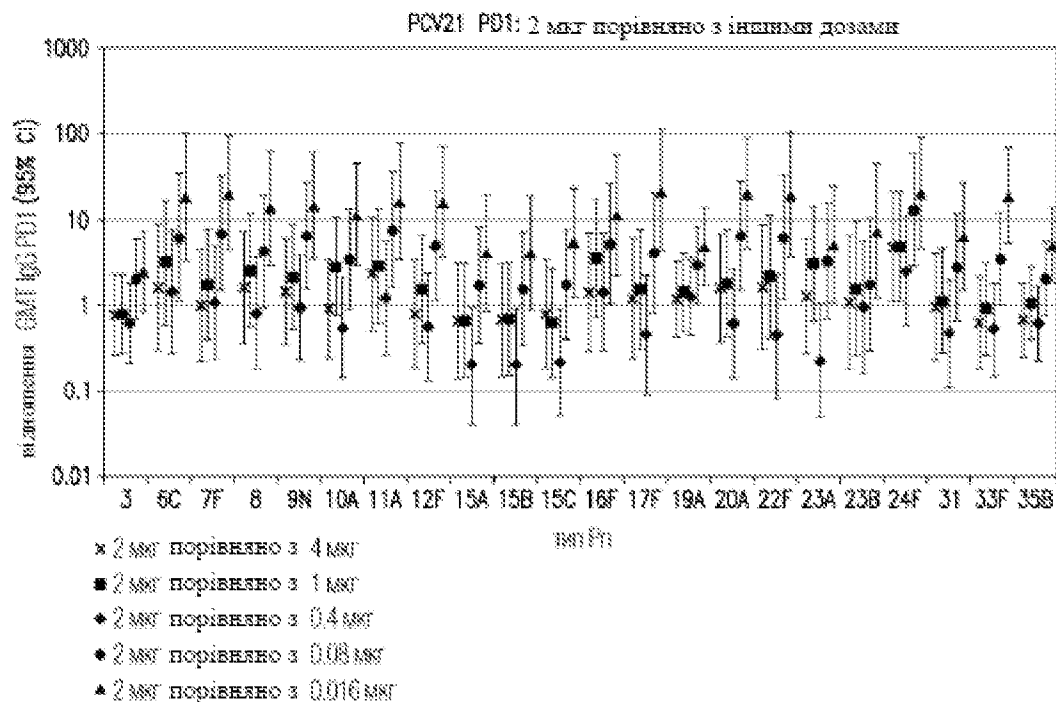


Fig. 18



Фіг. 19А

групи	2 мкг порівн. з 4 мкг	2 мкг порівн. з 1 мкг	2 мкг порівн. з 0.4 мкг	2 мкг порівн. з 0.08 мкг	2 мкг порівн. з 0.016 мкг
3	0.78 (0.28, 2.3)	0.79 (0.27, 2.3)	0.62 (0.21, 1.84)	2.1 (0.7, 6.1)	2.5 (0.85, 7.5)
6C	1.64 (0.3, 8.9)	3.2 (0.6, 18)	1.44 (0.27, 7.8)	8.3 (1.15, 34)	19 (3.5, 102)
7F	1.01 (0.22, 4.8)	1.78 (0.39, 8)	1.11 (0.24, 5.1)	8.9 (1.52, 32)	21 (4.5, 94)
8	1.64 (0.36, 7.5)	2.6 (0.57, 12)	0.81 (0.18, 3.7)	4.3 (0.94, 20)	14 (3, 63)
9N	1.46 (0.35, 6)	2.1 (0.52, 8.9)	0.94 (0.23, 3.9)	6.5 (1.58, 27)	15 (3.5, 60)
10A	0.92 (0.24, 3.5)	2.9 (0.75, 11)	0.55 (0.14, 2.1)	3.5 (0.9, 13)	12 (3, 44)
11A	2.4 (0.51, 11)	2.9 (0.62, 14)	1.21 (0.26, 5.7)	7.5 (1.61, 35)	16 (3.5, 77)
12F	0.79 (0.18, 3.5)	1.54 (0.35, 6.7)	0.55 (0.13, 2.4)	5 (1.14, 22)	16 (3.7, 70)
15A	0.68 (0.14, 3.3)	0.67 (0.14, 3.2)	0.2 (0.041, 0.95)	1.73 (0.36, 8.3)	4.1 (0.86, 20)
15B	0.68 (0.15, 3.1)	0.7 (0.15, 3.3)	0.2 (0.043, 0.93)	1.57 (0.34, 7.3)	4.2 (0.89, 19)
15C	0.81 (0.18, 3.5)	0.63 (0.14, 2.8)	0.21 (0.49, 0.93)	1.77 (0.4, 7.7)	5.4 (1.24, 24)
16F	1.42 (0.29, 7.1)	3.7 (0.73, 18)	1.43 (0.29, 7.2)	5.3 (1.05, 28)	11 (2.3, 57)
17F	1.22 (0.24, 6.2)	1.58 (0.31, 8.1)	0.46 (0.09, 2.3)	4.2 (0.82, 21)	22 (4.3, 112)
19A	1.19 (0.42, 3.4)	1.45 (0.51, 4.1)	1.29 (0.45, 3.7)	3 (1.05, 8.5)	5 (1.74, 14)
20A	1.59 (0.37, 6.9)	1.82 (0.42, 7.9)	0.62 (0.14, 2.7)	6.5 (1.52, 28)	20 (4.7, 88)
22F	1.65 (0.31, 8.8)	2.2 (0.41, 12)	0.45 (0.084, 2.4)	8.2 (1.17, 33)	20 (3.7, 105)
23A	1.27 (0.27, 6)	3.1 (0.65, 15)	0.22 (0.046, 1.04)	3.3 (0.7, 16)	5.1 (1.08, 25)
23B	1.09 (0.18, 6.7)	1.59 (0.26, 9.7)	0.95 (0.16, 5.8)	1.8 (0.29, 11)	7.4 (1.21, 45)
24F	4.9 (1.1, 21)	4.9 (1.11, 22)	2.6 (0.58, 11)	13 (3, 59)	21 (4.7, 92)
31	0.96 (0.23, 4.1)	1.13 (0.27, 4.8)	0.47 (0.11, 2)	2.1 (0.55, 12)	6.4 (1.51, 27)
33F	0.64 (0.18, 2.2)	0.92 (0.26, 3.3)	0.53 (0.15, 1.85)	3.6 (1.03, 13)	19 (5.5, 68)
35B	0.69 (0.25, 1.87)	1.08 (0.4, 2.9)	0.63 (0.23, 1.69)	2.1 (0.77, 5.6)	3.1 (1.9, 14)

Фіг. 19В

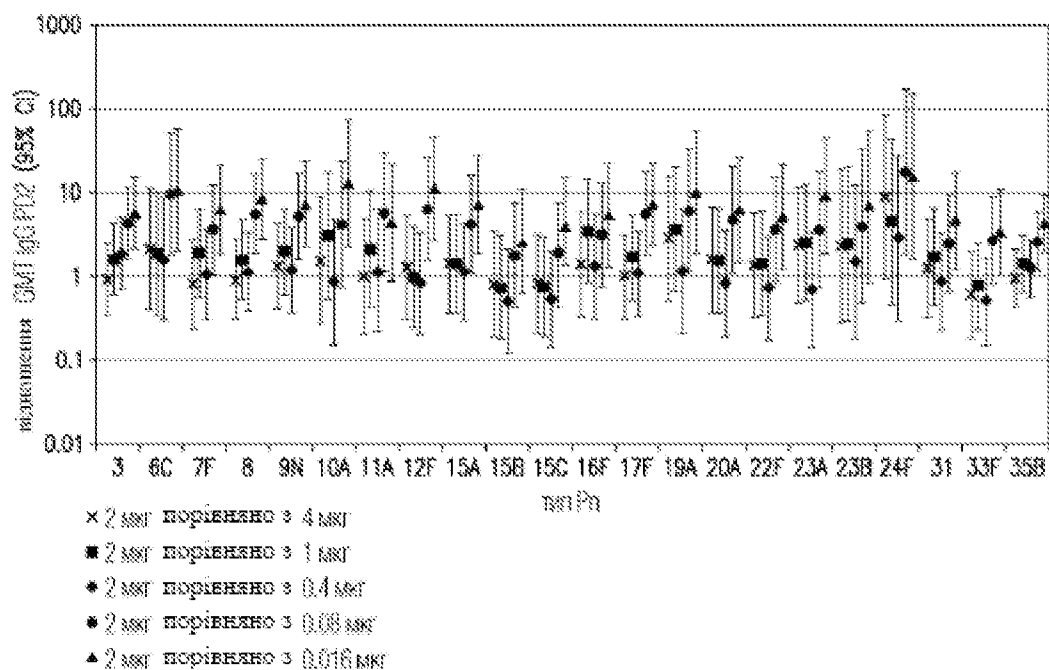


Fig. 20A

СВІДЧЕННЯ	2 мг порівн. з 4 мг	2 мг порівн. з 1 мг	2 мг порівн. з 0.4 мг	2 мг порівн. з 0.08 мг	2 мг порівн. з 0.016 мг
3	0.91 (0.34, 2.5)	1.58 (0.59, 4.3)	1.86 (0.69, 5.0)	4.3 (1.59, 12.0)	5.7 (2.1, 15.0)
6C	2.1 (0.39, 11.0)	1.87 (0.35, 10)	1.8 (0.3, 8.6)	9.8 (1.79, 51)	11 (1.98, 58)
7F	0.6 (0.23, 2.7)	1.88 (0.55, 6.4)	1.03 (0.3, 3.5)	3.8 (1.05, 12)	6.2 (1.83, 21)
8	0.9 (0.3, 2.7)	1.57 (0.53, 4.7)	1.1 (0.37, 3.3)	5.5 (1.84, 17)	8.3 (2.8, 25)
9N	1.31 (0.4, 4.3)	1.92 (0.58, 6.3)	1.17 (0.36, 3.8)	5.1 (1.56, 17)	7.1 (2.2, 23)
10A	1.49 (0.28, 8.6)	3 (0.53, 17)	0.84 (0.15, 4.8)	4.1 (0.71, 23)	13 (2.2, 72)
11A	0.98 (0.2, 4.9)	2.1 (0.42, 10)	1.09 (0.22, 5.4)	5.7 (1.15, 29)	4.3 (0.86, 22)
12F	1.28 (0.31, 5.2)	0.86 (0.24, 3.9)	0.8 (0.2, 3.3)	6.3 (1.53, 26)	11 (2.7, 46)
15A	1.39 (0.36, 5.3)	1.39 (0.36, 5.3)	1.12 (0.29, 4.3)	4.1 (1.06, 16)	7.1 (1.85, 27)
15B	0.79 (0.19, 3.3)	0.72 (0.17, 3)	0.49 (0.12, 2.1)	1.75 (0.41, 7.4)	2.5 (0.6, 11)
15C	0.81 (0.21, 3.1)	0.74 (0.19, 2.9)	0.53 (0.14, 2)	1.92 (0.5, 7.4)	3.9 (1.03, 15)
16F	1.37 (0.33, 5.8)	3.5 (0.83, 15)	1.31 (0.31, 5.5)	3.1 (0.73, 13)	5.2 (1.24, 22)
17F	0.99 (0.31, 3.1)	1.65 (0.52, 5.2)	1.06 (0.33, 3.4)	5.6 (1.76, 18)	7.1 (2.3, 23)
19A	2.8 (0.51, 16)	3.6 (0.85, 20)	1.13 (0.21, 6.2)	6.1 (1.0, 33)	9.8 (1.78, 54)
20A	1.59 (0.37, 6.8)	1.53 (0.36, 6.5)	0.83 (0.19, 3.5)	4.7 (1.1, 20)	6.2 (1.45, 26)
22F	1.34 (0.32, 5.7)	1.42 (0.34, 6)	0.72 (0.17, 3)	3.6 (0.84, 15)	5.1 (1.2, 21)
23A	2.4 (0.48, 12)	2.5 (0.51, 12)	0.87 (0.14, 3.3)	3.6 (0.74, 18)	9.1 (1.84, 45)
23B	2.3 (0.28, 19)	2.4 (0.29, 20)	1.49 (0.18, 12)	4 (0.48, 33)	6.8 (0.82, 56)
24F	6.6 (0.9, 63)	4.5 (0.45, 43)	2.9 (0.3, 28)	18 (1.85, 172)	16 (1.61, 150)
31	1.26 (0.33, 4.8)	1.17 (0.45, 6.5)	0.86 (0.23, 3.3)	2.5 (0.64, 9.4)	4.7 (1.22, 18)
33F	0.8 (0.18, 3.7)	0.77 (0.23, 2.5)	0.5 (0.15, 1.65)	2.7 (0.81, 8.9)	3.4 (1.02, 11)
35B	0.94 (0.43, 2.1)	1.41 (0.54, 3.1)	1.24 (0.56, 2.8)	2.8 (1.18, 5.8)	4.3 (1.94, 9.6)

Fig. 20B

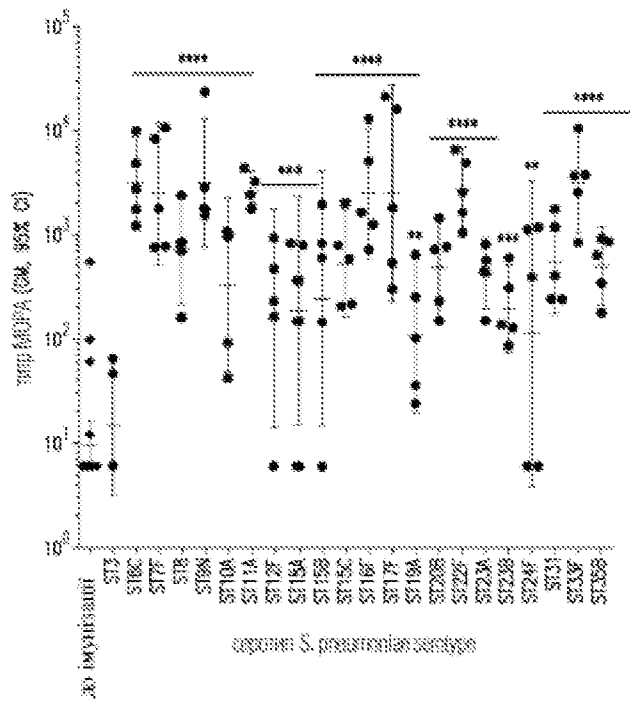


Fig. 21A

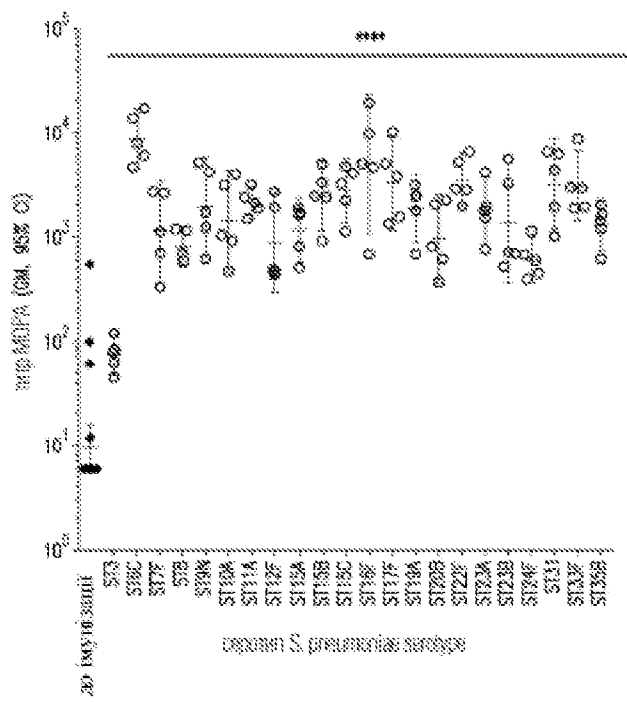
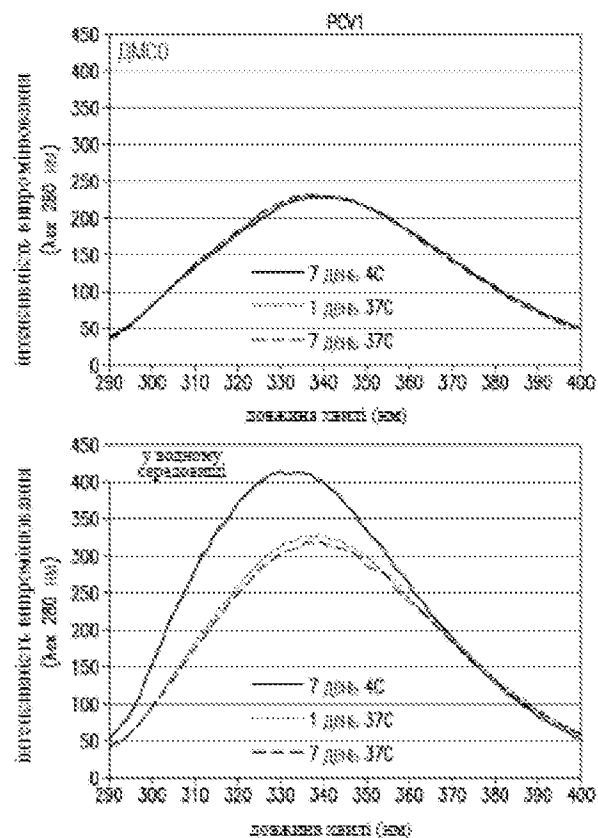
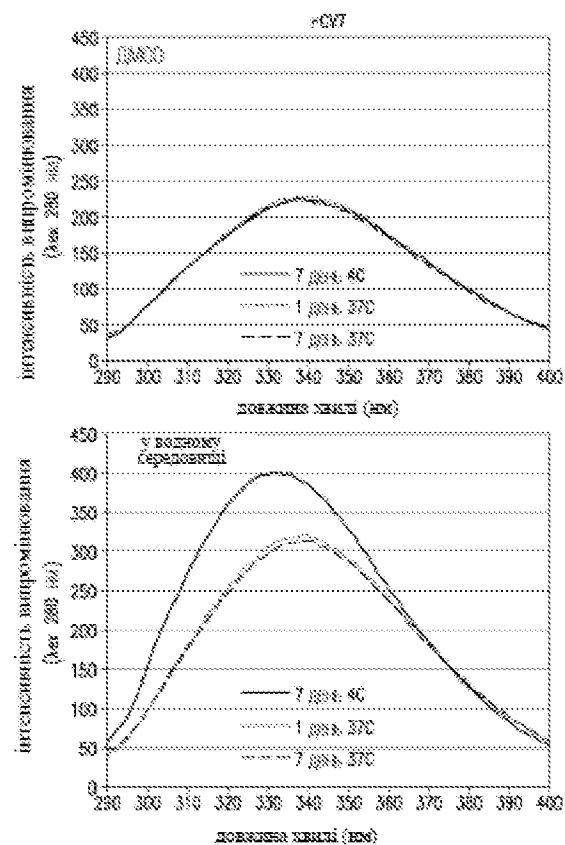


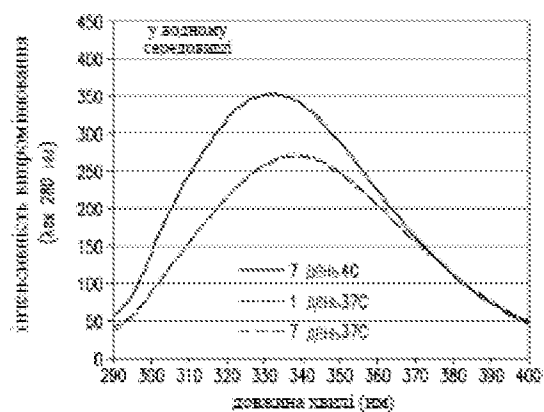
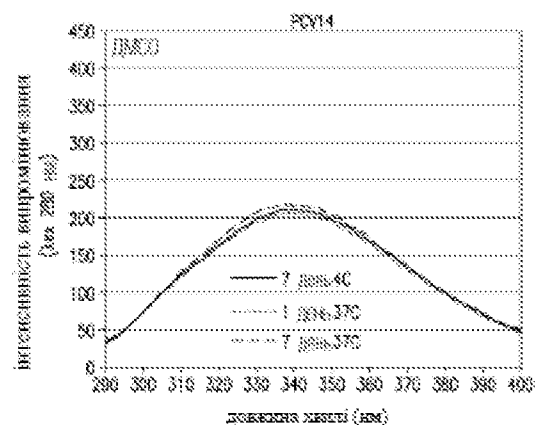
Fig. 21B



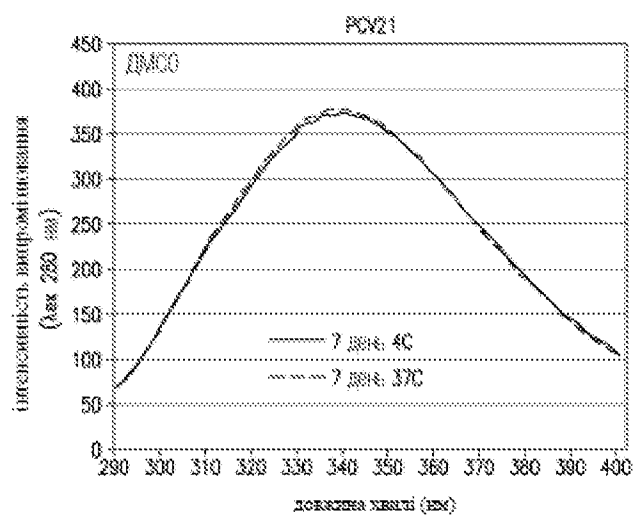
Фіг. 22А



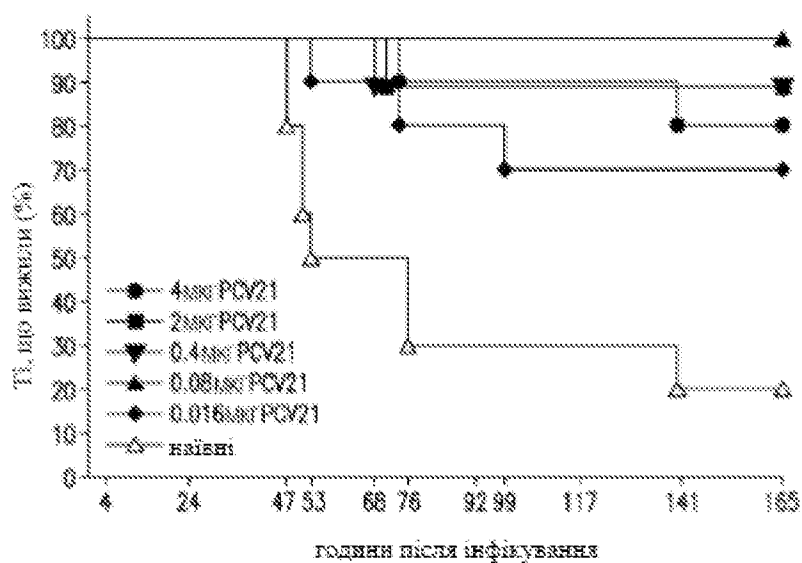
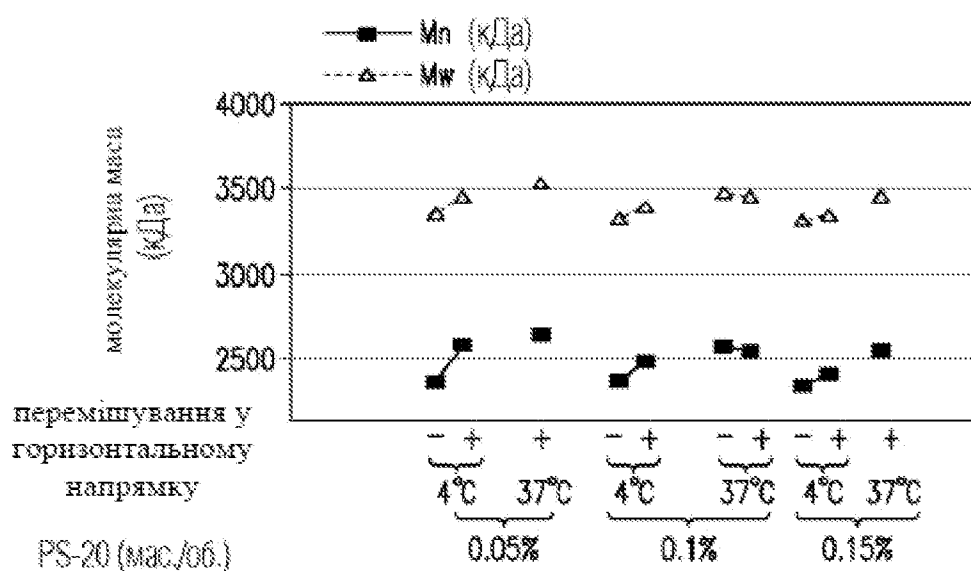
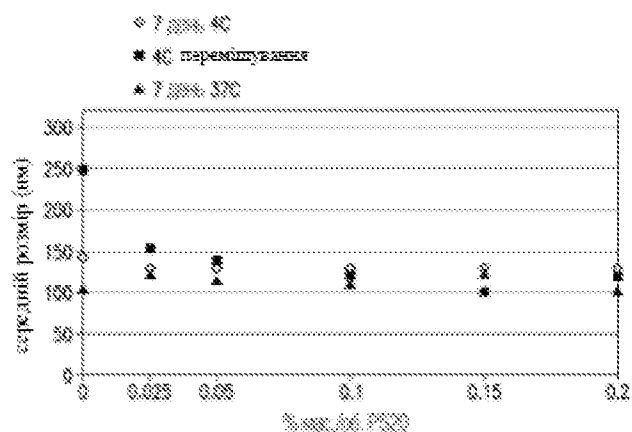
Фіг. 22В

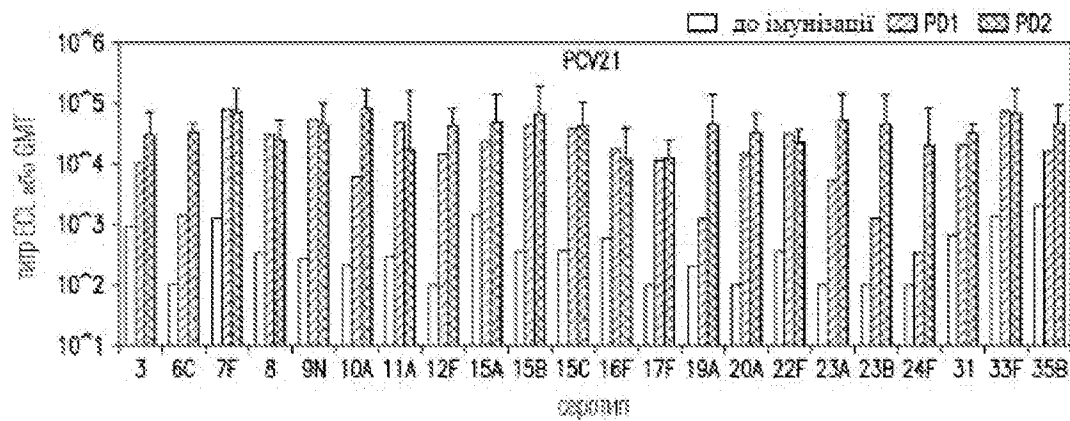


Фіг. 22С

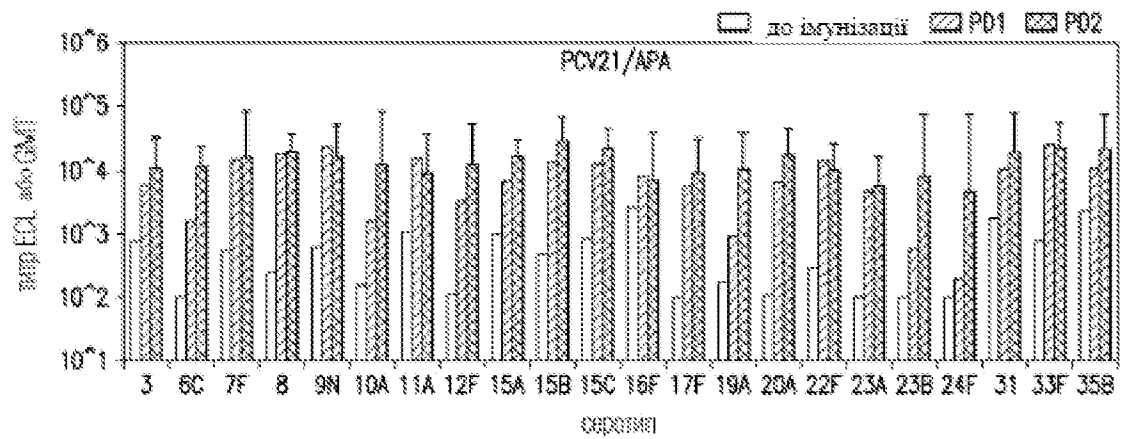


Фіг. 22D

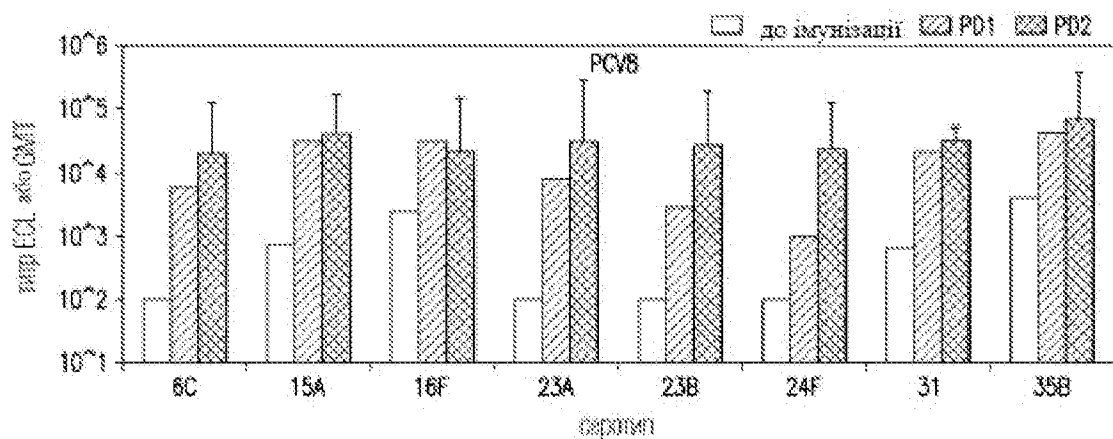




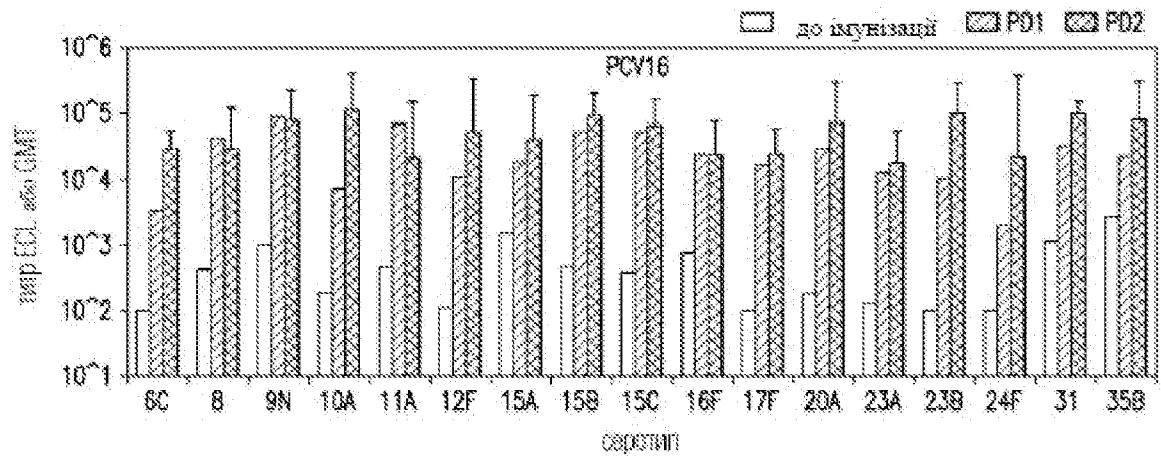
Фиг. 26А



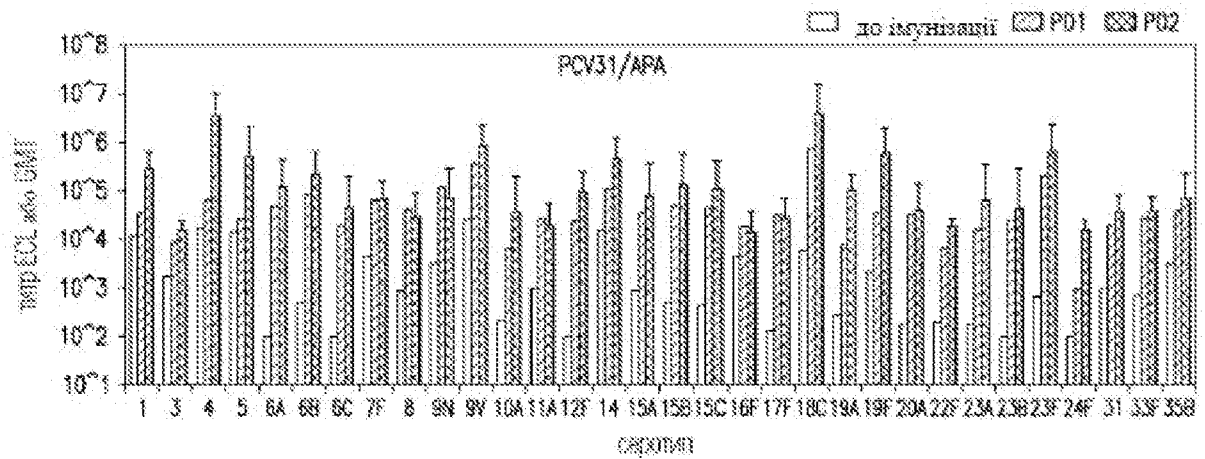
Фиг. 26В



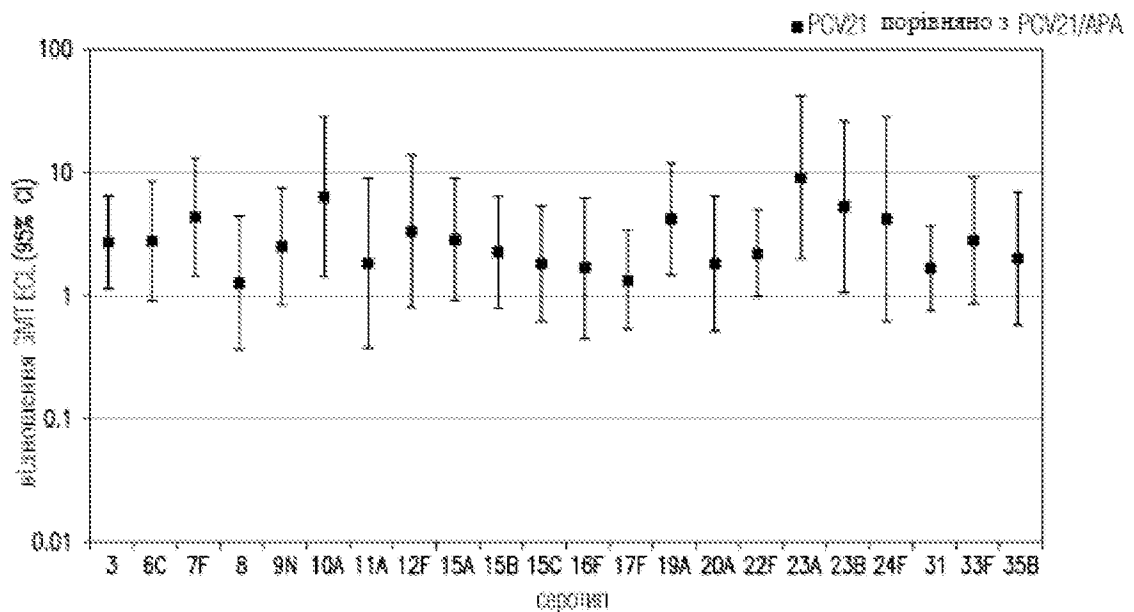
Фиг. 27А



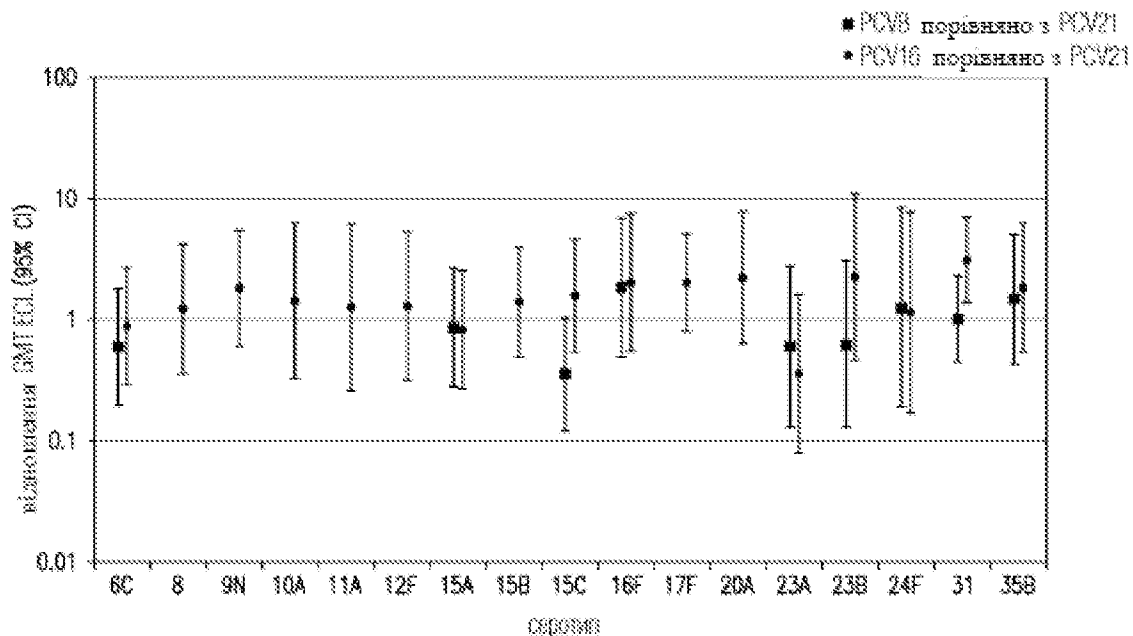
Фіг. 27В



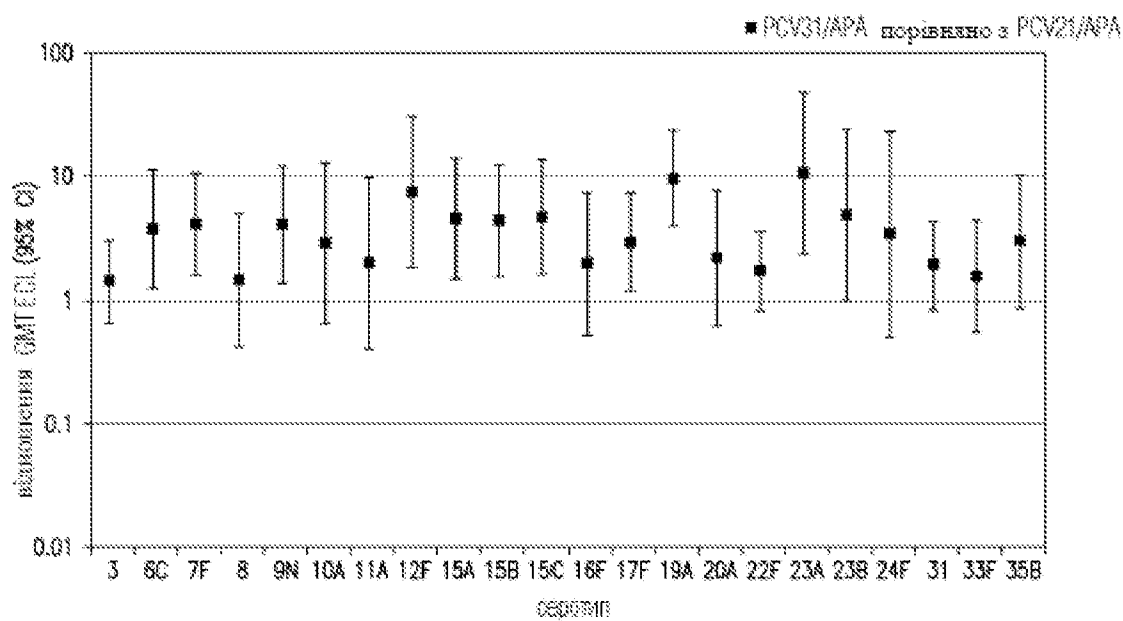
Фіг. 27С



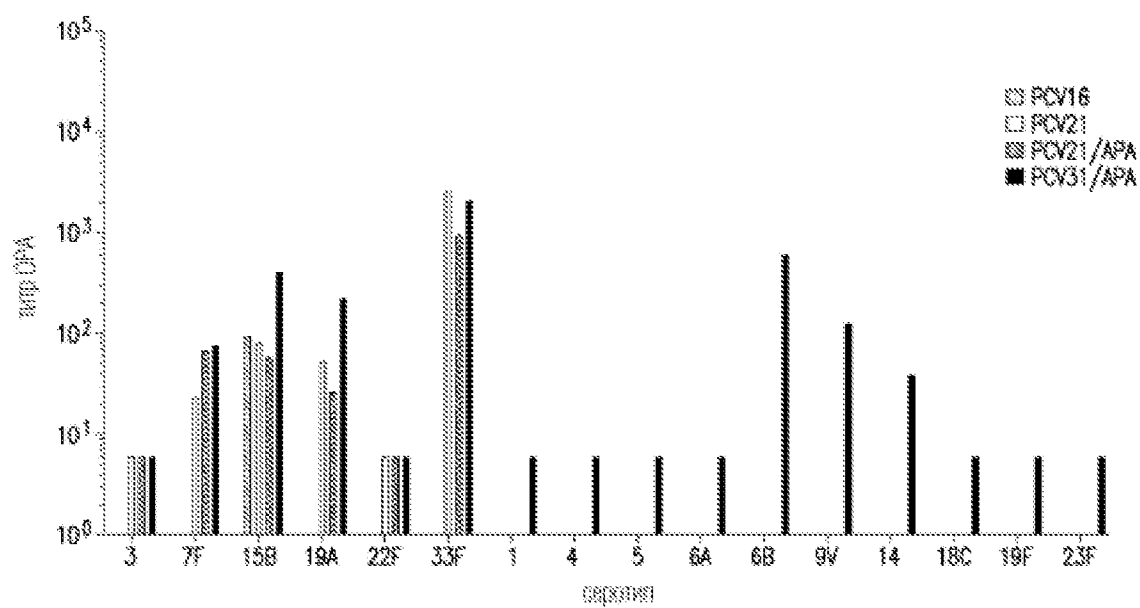
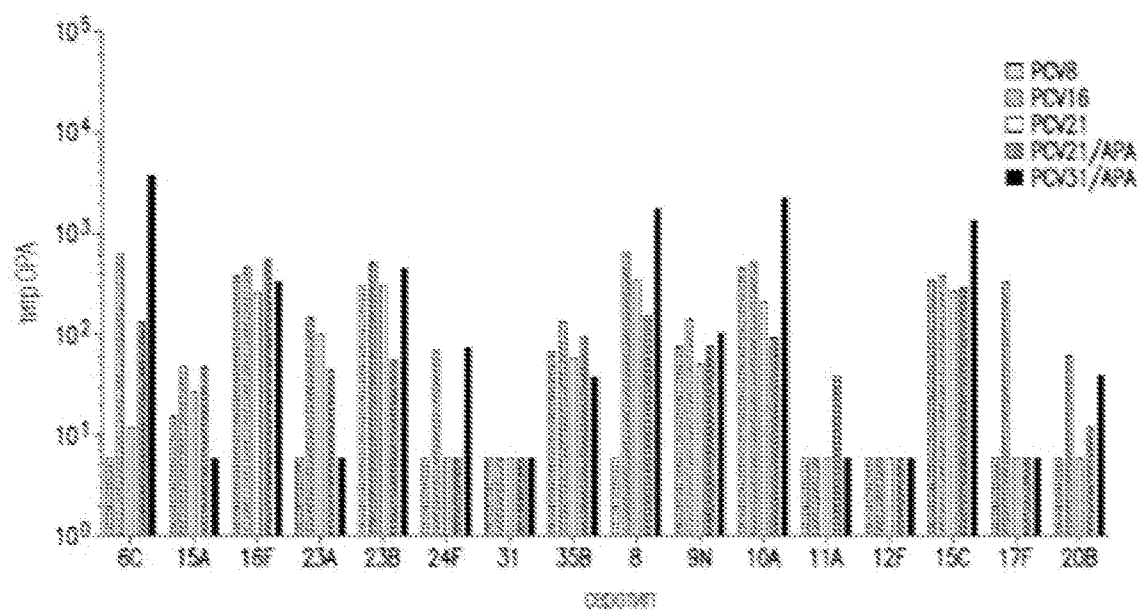
Фіг. 28



Фіг. 29



Фіг. 30



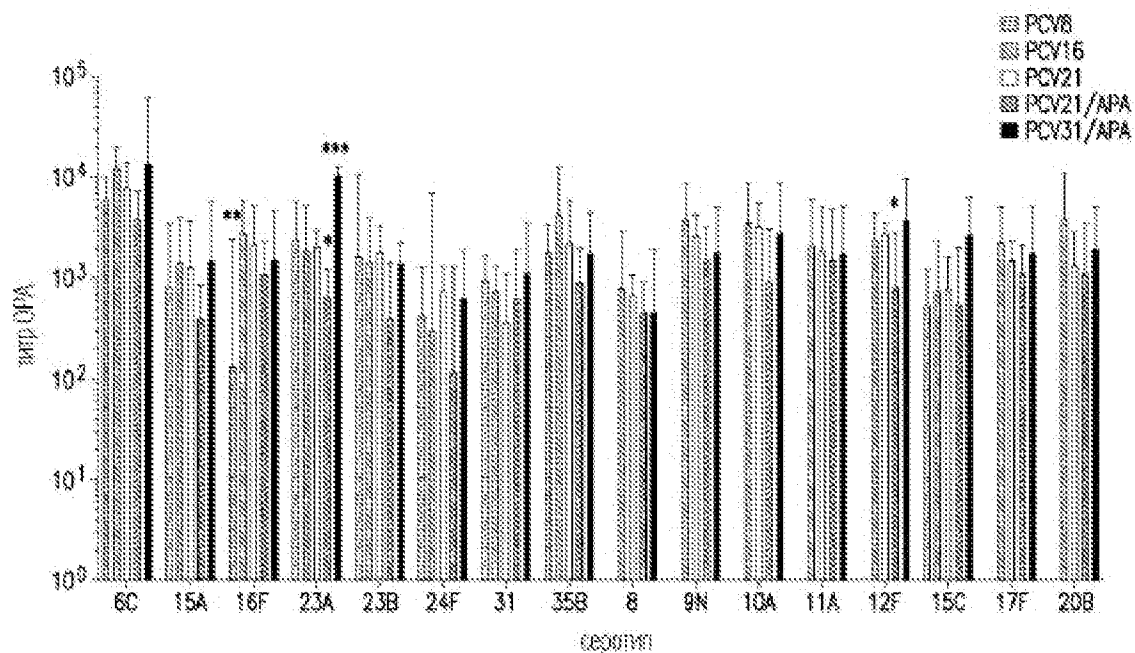


Fig. 31C

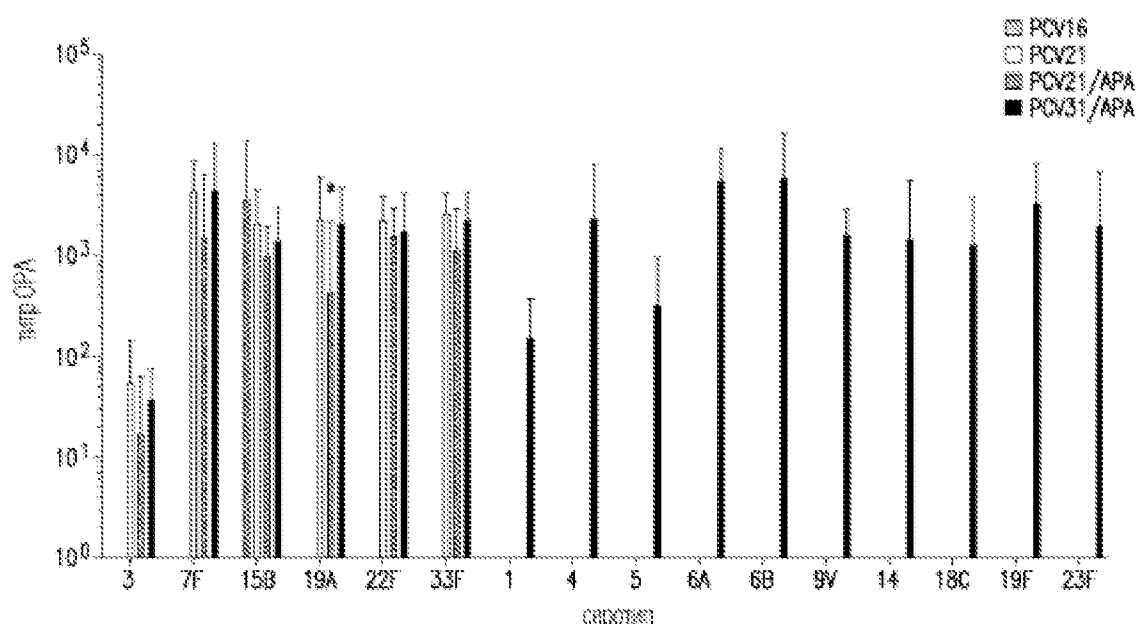


Fig. 31D

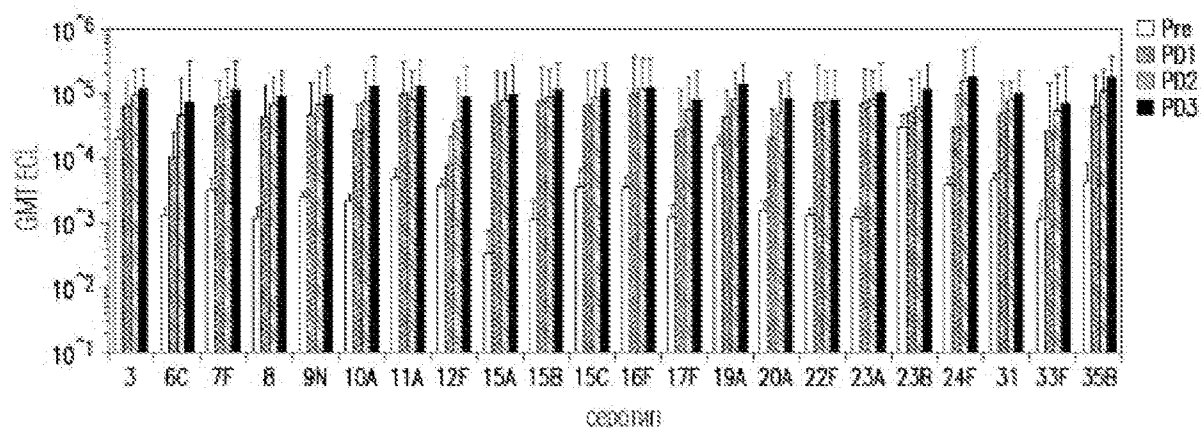


Fig. 32

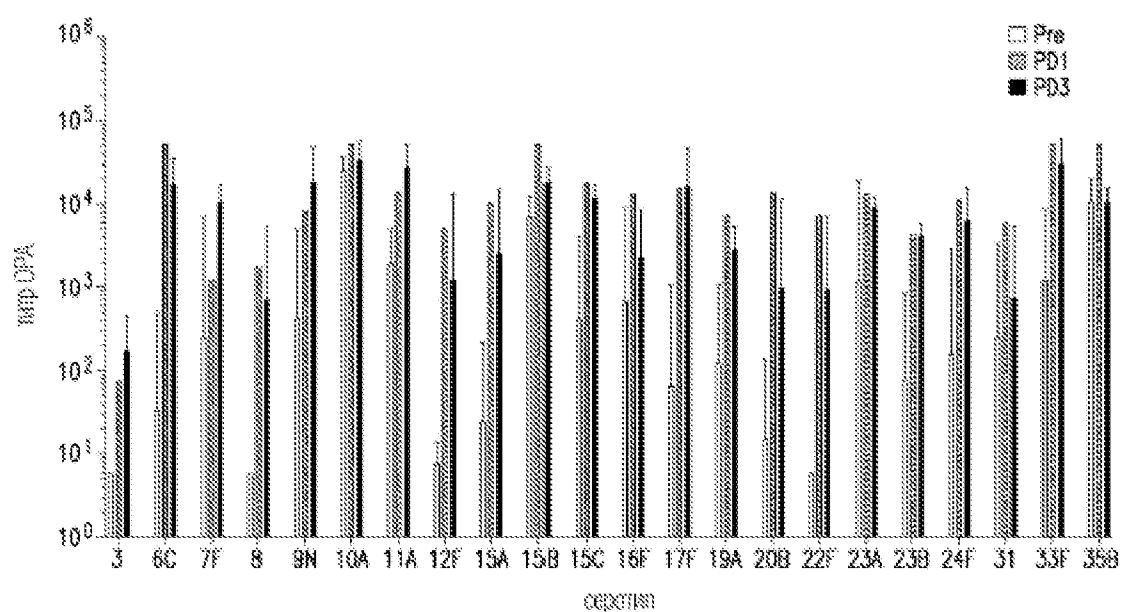
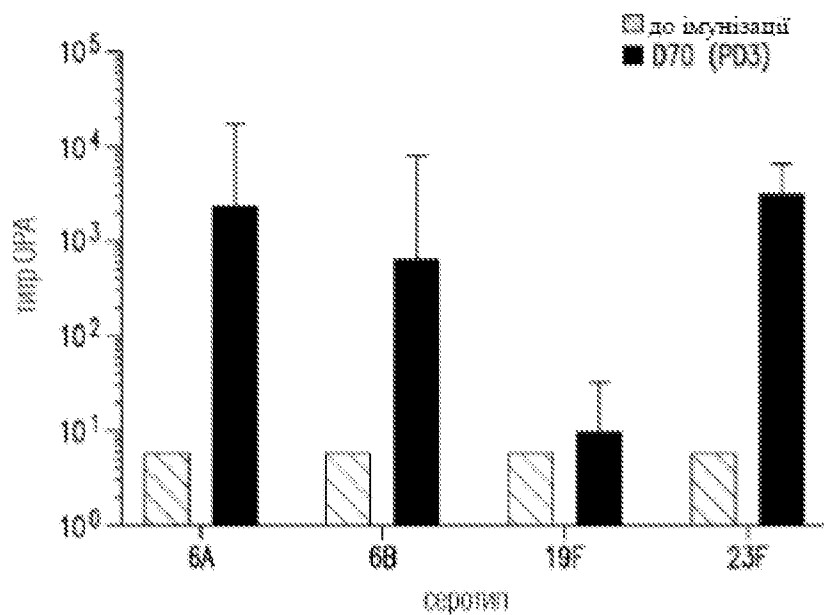
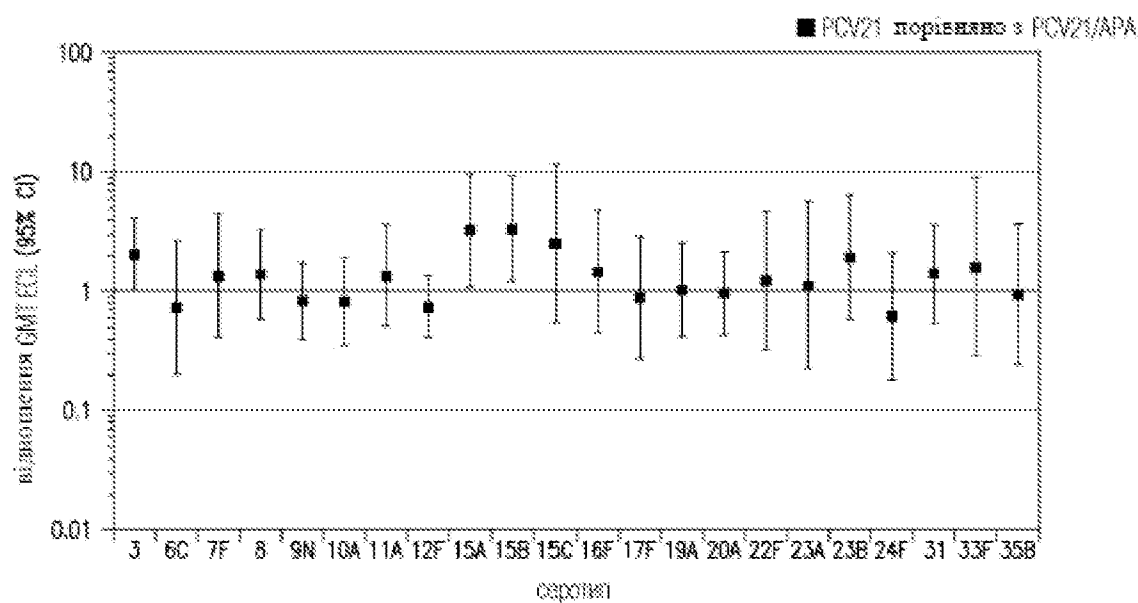


Fig. 33



Фиг. 34



Фиг. 35

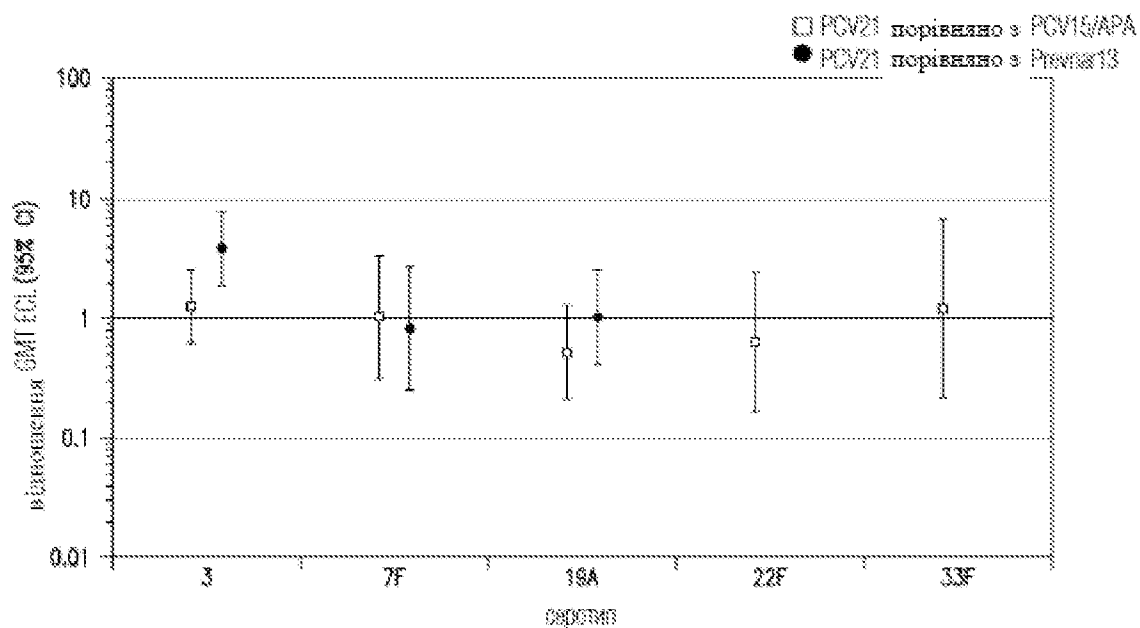


Fig. 36

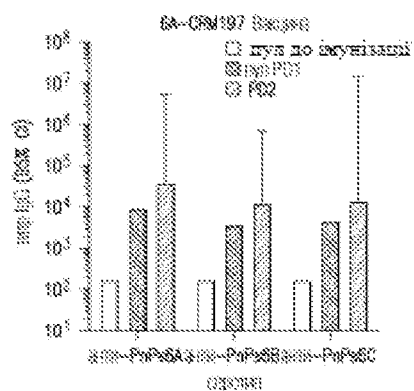


Fig. 37A

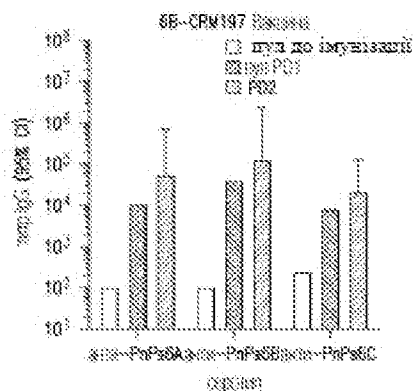


Fig. 37B

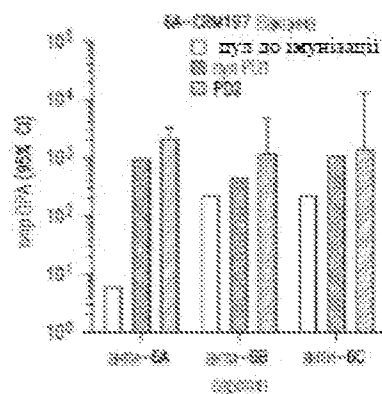


Fig. 38A

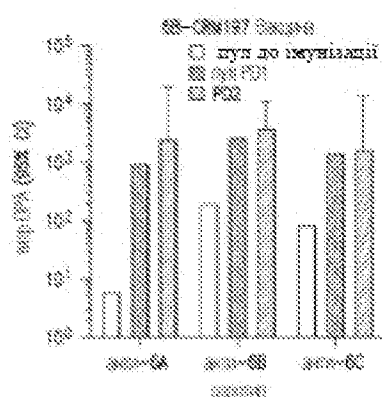


Fig. 38B

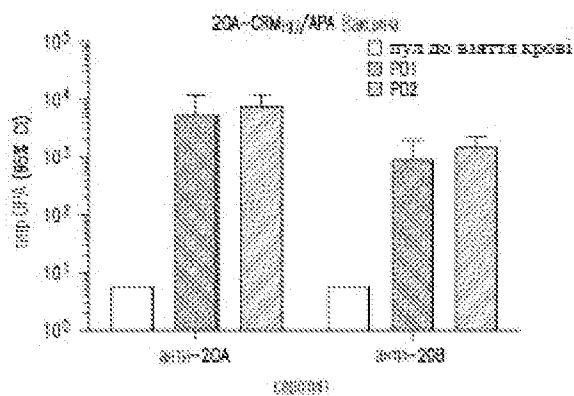
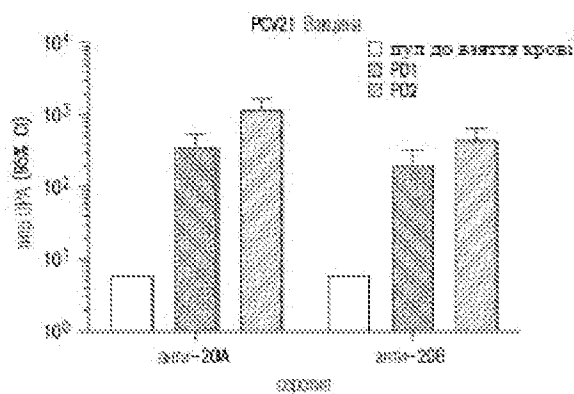


Fig. 39A



Фіг. 39В