



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95237 (13) C2

(51) МПК

A61K 39/095 (2006.01)

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ

1

(21) a200714084  
(22) 23.06.2006  
(24) 25.07.2011  
(86) PCT/EP2006/006269, 23.06.2006  
(31) 0513069.5  
(32) 27.06.2005  
(33) GB  
(31) 0513071.1  
(32) 27.06.2005  
(33) GB  
(31) 0515556.9  
(32) 28.07.2005  
(33) GB  
(31) 0524204.5  
(32) 28.11.2005  
(33) GB  
(31) 0526040.1  
(32) 21.12.2005  
(33) GB  
(31) 0526041.9  
(32) 21.12.2005  
(33) GB  
(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.  
(72) БІМАНС РАЛЬФ ЛЕОН, ВЕ, БУТРИО ДОМІНІК, ВЕ, КАПІО КАРІН, ВЕ, ДЕНОЕЛЬ ФІЛІПП, ВЕ, ДЮВІВ'Є П'ЄР, ВЕ, ПОЛМАН ЯН, ВЕ  
(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А., ВЕ  
(56) WO A 2004103400, 02.12.2004.  
WO A 03080678, 02.10.2003.  
WO A 03007985, 30.01.2003.  
(57) 1. Імуногенна композиція, що включає принаймні два відмінні капсулярні сахариди *N. meningitidis*, де один або більше є вибраним(и) з першої групи, яка складається з MenA, MenC, MenY та MenW, який(и) є кон'югованим(и) за допомогою лінкера з білком(ами) носія, та один або більше відмінних сахаридів, який/які є вибраним(и) з другої групи, яка складається з MenA, MenC, MenY та MenW, який(и) є безпосередньо кон'югованим(и) з білком(ами) носія.  
2. Імуногенна композиція згідно з пунктом 1, що включає принаймні два відмінні капсулярні сахариди

2

*N. meningitidis*, де один або більше є вибраним(и) з першої групи, яка складається з MenA та MenC, який(и) є кон'югованим(и) за допомогою лінкера з білком(білками) носія, та один або більше відмінних сахаридів, який/які є вибраним(и) з другої групи, яка складається з MenC, MenY та MenW, який(и) є безпосередньо кон'югованим(и) з білком(ами) носія.

3. Імуногенна композиція згідно з пунктом 2, що включає MenA капсулярний сахарид, кон'югований за допомогою лінкера з білком носія, та MenC капсулярний сахарид, безпосередньо кон'югований з білком носія.

4. Імуногенна композиція згідно з пунктом 2, що включає MenC капсулярний сахарид, кон'югований за допомогою лінкера з білком носія, та MenY капсулярний сахарид, безпосередньо кон'югований з білком носія.

5. Імуногенна композиція згідно з пунктом 2, що включає MenA та MenC капсулярні сахариди, кон'юговані за допомогою лінкера з білком(білками) носія, та MenY та MenW капсулярні сахариди, безпосередньо кон'юговані з білком(ами) носія.

6. Імуногенна композиція згідно з пунктом 2, що включає MenA капсулярний сахарид, кон'югований за допомогою лінкера з білком носія, та MenC, MenY та Men W капсулярні сахариди, безпосередньо кон'юговані з білком(ами) носія.

7. Імуногенна композиція, що включає принаймні два відмінні сахариди, кон'юговані окремо з тим самим типом білка носія, де один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою першого типу хімічної групи на білковому носії, та один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою другого типу хімічної групи на білковому носії, де перший та другий тип хімічної групи незалежно вибрані з групи, яку складають карбоксильні групи, аміногрупи, сульфгідрильна група, імідазольні групи, гуанідильні групи та індолільні групи.

8. Імуногенна композиція згідно з пунктом 7, в якій один або більше сахарид(ів), кон'югований(и) з біл-

(13) C2

(11) 95237

(19) UA

ком носія за допомогою першого типу хімічної групи на білковому носії, відрізняються від одного або більше сахариду(ів), кон'югованого(их) з білком носія за допомогою другого типу хімічної групи на білковому носії.

9. Імуногенна композиція згідно з пунктом 7 або 8, що включає принаймні два відмінні сахариди, кон'юговані окремо до того самого типу білка носія, де один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою карбоксильної групи на білковому носії, та один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою аміногрупи на білковому носії.

10. Імуногенна композиція згідно з пунктами 7-9, в якій перший та другий типи хімічної групи на білковому носії є присутніми на окремих В- та/або Т-клітинних епітопах білка носія.

11. Імуногенна композиція згідно з пунктами 7-10, в якій сахариди є вибраними з групи, яка складається з: капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи А (MenA), капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи С (MenC), капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи Y (MenY), капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи W (MenW), капсулярного сахариду групи I Streptococcus групи В, капсулярного сахариду групи II Streptococcus групи В, капсулярного сахариду групи III Streptococcus групи В, капсулярного сахариду групи IV Streptococcus групи В, капсулярного сахариду групи V Streptococcus групи В, капсулярного сахариду типу 5 *Staphylococcus aureus*, капсулярного сахариду типу 8 *Staphylococcus aureus*, Vi сахариду з *Salmonella typhi*, LPS *N. meningitidis* (такого, як L3 та/або L2), LPS *M. catarrhalis*, LPS *H. influenzae*, та будь-якого з капсулярних пневмококових сахаридів, таких, як серотипів: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F або 33F.

12. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, в якій кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є кон'югованим з білком носія, незалежно вибраним з групи, яка складається з TT, DT, CRM197, фрагмента С TT та білка D.

13. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, в якій кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є кон'югованим з тим самим білком носія, вибраним з групи, яка складається з TT, DT, CRM197, фрагмента С TT та білка D.

14. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, в якій кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є кон'югованим з TT.

15. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, в якій кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є окремо кон'югованим з окремим білком носія.

16. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, в якій принаймні один, два або три капсулярний(і) сахаридний(і) кон'югат(и) *N. meningitidis* є безпосередньо кон'югованими з білком носія.

17. Імуногенна композиція згідно з пунктом 16, в якій Men W та/або MenY, MenW та/або MenC, MenY та/або MenC, або MenW та MenC та MenY є безпосередньо кон'югованими з білком носія.

18. Імуногенна композиція згідно з пунктом 16 або 17, в якій принаймні один, два або три сахаридний(і) кон'югат(и) *N. meningitidis* є безпосередньо кон'югованими при використанні CDAP.

19. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з пунктів 1-18, в якій принаймні один, два або три капсулярний(і) сахарид(и) *N. meningitidis* є кон'югованими з білком носія за допомогою лінкера.

20. Імуногенна композиція згідно з пунктом 19, в якій лінкер є біфункціональним.

21. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, що включає капсулярні сахариди *N. meningitidis* принаймні з двох серогруп А, С, W135 та Y, кон'юговані з білком носія з одержанням капсулярного сахаридного кон'югату *N. meningitidis*, в якому середній розмір кожного сахариду *N. meningitidis* є вищим за 50 кДа, 75 кДа, 100 кДа, 110 кДа, 120 кДа або 130 кДа.

22. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з попередніх пунктів, що додатково включає капсулярний сахарид *H. influenzae* b (Hib), кон'югований з білком носія, при цьому вказаний білок носія є необов'язково вибраним з групи, яка складається з TT, DT, CRM197, фрагмента С TT та білка D.

23. Імуногенна композиція згідно з пунктом 22, що включає Hib сахаридний кон'югат та принаймні два додаткові бактеріальні сахаридні кон'югати, в яких Hib кон'югат є присутнім у більш низькій дозі, ніж середня доза принаймні двох додаткових бактеріальних сахаридних кон'югатів.

24. Вакцина, що включає імуногенну композицію згідно з будь-яким з пунктів 1-23 та фармацевтично прийнятний наповнювач.

25. Застосування імуногенної композиції згідно з будь-яким з пунктів 1-23 у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання захворювань, спричинених інфекцією *Neisseria meningitidis*.

Даний винахід відноситься до імуногенних композицій, що включають бактеріальні капсулярні сахариди, кон'юговані з білком носія, зокрема, до таких сахаридів *N. meningitidis*. Винахід додатково відноситься до вакцин та вакцинних наборів, що включають такі сахаридні кон'югати, способів одержання імуногенних композицій та вакцин та до застосування вакцинних та імуногенних композицій згідно з винаходом у терапії. Він також відноситься до способу імунізації проти інфекції при

використанні сахаридних кон'югатів та до застосування сахаридних кон'югатів у виробництві лікарського засобу.

*Neisseria meningitidis* являє собою Грам-негативний патоген людини, який спричинює бактеріальні менінгіти. Було ідентифіковано 12 серогруп *N. meningitidis* (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y та Z) на основі капсулярного сахариду організму. Серогрупа A (MenA) є найбільш загальною причиною епідемічного захворювання у частині Африки,

що розташована південніше Сахари. Серогрупи В та С є відповідальними за більшість випадків у країнах, які розвиваються, в інших випадках захворювання викликається W135 та Y.

Імуногенні композиції, що включають сахариди *N. meningitidis*, кон'юговані з білками носія, є відомими в області техніки; білок носія володіє відомим ефектом перетворення незалежного від Т-клітин полісахаридного антигену на залежний від Т-клітин антиген, здатний до запуску відповіді імунної пам'яті. Наприклад, WO 02/58737 розкриває вакцину, що включає очищені капсулярні полісахариди з серогруп А, С, W135 та Y *N. meningitidis*, кон'юговані з білком носія. Проте в цій заявці зазначається, що усі полісахариди будуть суттєво кон'югованими за допомогою одного й того самого шляху (за допомогою того самого лінкера до того самого білкового носія).

Залишається необхідність у розробці удосконалених кон'югованих вакцин проти менінгітів, спричинених нейсерією. Даний винахід забезпечує вакцини на основі полісахаридів менінгококів, в яких кон'югація кожного полісахариду є спеціалізованою (що є більш бажаним, ніж коли вона є однорідною) для досягнення одержання ефективної комбінаційної вакцини. Зокрема, є бажаним застосування лінкерних молекул для кон'югації певних сахаридів менінгококів з їх білковими носіями у комбінації з іншими, які є кон'югованими безпосередньо. Таким чином, полісахариди, які не є хорошими імуногенами, можуть бути представлені імунній системі за допомогою лінкера, а такі, що є дуже хорошими імуногенами, можуть бути безпосередньо кон'юговані так, що вони не домінують в імунній відповіді над комбінацією.

Таким чином, в одному аспекті даного винаходу забезпечується імуногенна композиція, що включає принаймні 2 різні капсулярні сахариди *N. meningitidis*, де один або більше є вибраним(ими) з першої групи, яка складається з MenA, MenC, MenY та MenW, який/які є кон'югований(і) за допомогою лінкера з білком(білками) носія, та один або більше різних сахаридів, який/які є вибраним(и) з другої групи, яка складається з MenA, MenC, MenY та MenW, який/які є безпосередньо кон'югованим(и) з білком(білками) носія.

У MenAC вакцині, наприклад, MenA може бути кон'югований за допомогою лінкера, а MenC - безпосередньо. У MenCY вакцині MenC може бути кон'югований за допомогою лінкера, а MenY - безпосередньо. У MenACWY вакцині Men A може бути кон'югований за допомогою лінкера, а MenCWY - безпосередньо, або MenAC може бути кон'югований за допомогою лінкера, а MenWY - безпосередньо.

Додатковий фактор у комбінаційній вакцині, яка включає різноманітні сахариди, кон'юговані з тим самим носієм, є формування імунної супресії носія: можна використовувати дуже багато носіїв, і імунна відповідь може бути послаблена. При одnorідному підході до кон'югації носій буде присутній у подібній суміші В- та Т-клітинних епітопів до імунної системи. Проте, якщо кон'югація має місце у різних хімічних групах у межах білка носія для одного сахариду проти іншого, то білкові носії,

можливо, будуть в деякій мірі різними у тому, як вони представляються імунній системі.

Згідно з цим в окремому втіленні винаходу забезпечується імуногенна композиція, яка включає принаймні 2 різні сахариди, кон'юговані окремо до того самого типу білка носія (наприклад, токсойда правця), де один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою першого типу хімічної групи на білковому носії, а один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою другого (відмінного) типу хімічної групи білкового носія.

Перший та другий типи хімічної групи можуть бути присутніми у білковому носії на першому та другому наборах амінокислот білкового носія, що взаємно виключають один одного (наприклад, певні залишки аспарагінової/глутамінової кислоти в одному наборі та певні залишки лізину у другому). Один сахарид може бути кон'югованим з карбоксильною групою на носії, а інший, наприклад, з аміногрупою. Така кон'югація може втягувати кон'югацію на окремих В- та/або Т-клітинних епітопах для кожного відмінного кон'югату.

Наприклад, у MenAC вакцині MenA може бути зв'язаним з хімічною групою першого типу (такої, як карбоксил) на білку носія, а MenC є зв'язаним з такою другого типу (такою, як аміногрупа). В MenCY вакцині MenC може бути зв'язаним з хімічною групою першого типу (такої, як карбоксил) на білку носія, а MenY є зв'язаним з такою другого типу (такою, як аміногрупа). В MenACWY вакцині MenAC може бути зв'язаним з хімічною групою першого типу (такою, як карбоксил) на білку носія, а MenWY є зв'язаним з такою другого типу (такою, як аміногрупа), або MenA може бути зв'язаним з хімічною групою першого типу (такою, як карбоксил) на білку носія, а MenCWY є зв'язаним з такою другого типу (такою, як аміногрупа).

Згідно з додатковим аспектом винаходу забезпечується спосіб імунізації хазяйського організму людини проти захворювання, спричиненого *Neisseria meningitidis*, що включає введення хазяїну імунопротективної дози імуногенної композиції або вакцини згідно з винаходом.

Згідно з додатковим аспектом винаходу забезпечується імуногенна композиція згідно з винаходом для застосування у лікуванні або запобіганні захворювання, спричиненого *Neisseria meningitidis*.

Згідно з додатковим аспектом винаходу забезпечується застосування імуногенної композиції або вакцини згідно з винаходом у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання захворювань, спричинених *Neisseria meningitidis*.

Опис фігур

Фігура 1-A - Гістограма, яка показує GMC відповіді в анти-MenY ELISA. ENYTT012 являє собою MenY-ТТ кон'югат, одержаний з нативного MenY полісахариду. ENYTT014 являє собою MenY-ТТ кон'югат, одержаний з мікропсевдозрідженого MenY полісахариду, який піддавали 40 циклам мікропсевдозрідження. ENYTT015bis являє собою MenY-ТТ кон'югат, одержаний з мікропсевдозрідженого MenY полісахариду, який піддавали 20 циклам мікропсевдозрідження.

- В - Гістограма, яка показує GMC відповіді в анти-MenY SBA аналізі. ENYTT012 являє собою MenY-ТТ кон'югат, одержаний з мікропсевдозрідженного MenY полісахариду, який піддавали 40 циклам мікропсевдозрідження. ENYTT014 являє собою MenY-ТТ кон'югат, одержаний з мікропсевдозрідженного MenY полісахариду, який піддавали 40 циклам мікропсевдозрідження. ENYTT015bis являє собою MenY-ТТ кон'югат, одержаний з мікропсевдозрідженного MenY полісахариду, який піддавали 20 циклам мікропсевдозрідження.

#### Детальний опис

В одному аспекті даного винаходу забезпечується імуногенна композиція, що включає принаймні 2 відмінні капсулярні полісахариди *N. meningitidis*, де один або більше є вибраним(и) з першої групи, яка складається з MenA, MenC, MenY та MenW, який/які є кон'югованим(и) за допомогою лінкера з білком(білками) носія, та один або більше відмінних сахаридів, який/які є вибраним(и) з другою групою, яка складається з MenA, MenC, MenY та MenW, який/які є безпосередньо кон'югованим(и) з білком(білками) носія.

Зокрема, перша група може складатися з MenA та MenC, а друга група складається з MenC, MenY та MenW. Окремі втілення винаходу являють собою імуногенні композиції, що включають: MenA капсулярний сахарид, кон'югований за допомогою лінкера з білком носія, та MenC капсулярний сахарид, безпосередньо кон'югований з білком носія; MenC капсулярний сахарид, кон'югований за допомогою лінкера з білком носія та MenY капсулярний сахарид, безпосередньо кон'югований з білком носія; MenA та MenC капсулярні полісахариди, кон'юговані за допомогою лінкера з білком(ами) носія, та MenY та Men W капсулярні полісахариди, безпосередньо кон'юговані з білком(ами) носія; MenA капсулярний сахарид, кон'югований за допомогою лінкера з білком(ами) носія, та MenC, MenY та Men W капсулярні полісахариди, безпосередньо кон'юговані з білком(ами) носія. У будь-якому з цих втілень може також включатися Hib кон'югат, який є зв'язаним з білком носія (див. список носії вище та нижче, наприклад, ТТ) безпосередньо або за допомогою лінкера.

Термін "сахарид" у цьому описі може позначати полісахарид або олігосахарид та включає обидва. Полісахариди ізолюють з бактерій або ізолюють з бактерій та в деякій мірі класифікують їх за розміром за допомогою відомих способів (див., наприклад, EP497524 та EP497525) та, необов'язково, за допомогою мікропсевдозрідження. Полісахариди можуть бути зменшені за розмірами для того, щоб знизити в'язкість у зразках полісахариду та/або для підвищення здатності до фільтрації для кон'югованих продуктів. Олігосахариди мають низьку кількість повторюваних одиниць (типово 5-30 повторюваних одиниць) та є типово гідролізованими полісахаридами.

Кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* (та/або Hib) може бути кон'югований з білком носія, незалежно вибраним з групи, яка складається з ТТ, DT, CRM197, фрагменту С ТТ та білка D. Більш повний список білкових носіїв, що можуть використовуватися у кон'югатах згідно з винахо-

дом, представлений нижче. Хоча один або більше капсулярних сахаридів *N. meningitidis* (та/або Hib) можуть бути кон'юговані з різними білками носіїв, в одному втіленні винаходу їх кон'югують до того самого білка носія. Наприклад, вони усі можуть бути кон'юговані з тим самим білком носія, вибраним з групи, яка складається з ТТ, DT, CRM197, фрагменту С ТТ та білка D. У цьому контексті CRM197 та DT можуть вважатися тим самим білком носія, оскільки вони відрізняються тільки однією амінокислотою. У будь-якому втіленні усі наявні капсулярні полісахариди (та/або Hib) *N. meningitidis* є кон'югованими з ТТ.

Якщо білок носія є таким самим для двох або більше сахаридів у композиції, то сахарид може бути кон'югованим до тієї самої молекули білка носія (молекули носія мають 2 або більше сахариди, кон'юговані до нього) [див., наприклад, WO 04/083251; наприклад, один білок носія може бути кон'югований до MenA та MenC; MenA та MenW; MenA та MenY; MenC та MenW; MenC та MenY; Men W та MenY; MenA, MenC та MenW; MenA, MenC та MenY; MenA, MenW та MenY; MenC, MenW та MenY; MenA, MenC, MenW та MenY; Hib та MenA; Hib та MenC; Hib та MenW; або Hib та MenY]. Альтернативно, кожний із сахаридів може бути окремо кон'югований до різних молекул білка носія (кожна молекула білкового носія має тільки один тип сахариду, кон'югованого до неї).

Імуногенні композиції згідно з першим аспектом винаходу можуть також мати будь-яку або усі додаткові характеристики другого аспекту винаходу та навпаки.

У другому аспекті згідно з винаходом представлена імуногенна композиція, що включає принаймні два різні сахаридні кон'югати, кон'юговані окремо до того самого типу білка носія, де один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) до білка носія за допомогою першого типу хімічної групи на білковому носії, та один або більше сахарид(ів) є кон'югованим(и) за допомогою другого (відмінного) типу хімічної групи білкового носія.

В одному втіленні два кон'югати містять той самий сахарид, приєднаний до того самого носія, але за допомогою відмінних хімічних зв'язків кон'югації. В альтернативному втіленні два різні сахариди є кон'югованими до різних груп на білковому носії.

Під виразом "кон'юговані окремо до того самого типу білка носія" розуміють, що сахариди є кон'югованими до того самого носія індивідуально (наприклад, MenA є кон'югованим до токсойда правця через аміногрупу на токсойді правця, а MenC є кон'югованим до токсойда правця через карбоксигрупу на іншій молекулі токсойда правця).

Капсулярний(и) сахарид(и) може(уть) бути кон'югований(и) до того самого білка носія, що є незалежно вибраним з групи, яка складається з ТТ, DT, CRM197, фрагменту С ТТ та білка D. Більш повний список білкових носіїв, які можуть використовуватися у кон'югатах згідно з винаходом, представлений нижче. У цьому контексті CRM197 та DT можуть вважатися тим самим білком носія, оскільки вони відрізняються тільки одні-

єю амінокислотою. У будь-якому втіленні усі наявні капсулярні сахариди є кон'югованими з ТТ.

В одному втіленні перший та другий тип хімічної групи білкового носія є присутніми на окремих В- та/або Т-клітинних епітопах білка носія. Тобто вони є присутніми на відмінних один від одного наборах В- та/або Т-клітинних епітопів. Для прогнозування В-клітинних епітопів для носія можуть використовуватися відомі способи, такі, як один або обидва з наступних двох способів: передбачення 2D-структури та/або антигенний індекс передбачення. Передбачення 2D-структури може бути проведене при використанні програми PSIPRED (від David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). Антигенний індекс може бути підрахований на основі способу, описаного Jameson та Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]). Параметри, що використовуються у цій програмі, являють собою антигенний індекс та мінімальну довжину антигенного пептиду. Антигенний індекс 0,9 для мінімум 5 суміжних амінокислот може використовуватися як порогове значення у програмі. Епітопи клітин Т-хелперів являють собою пептиди, зв'язані з молекулами класу II HLA та впізнаються клітинами Т-хелперів. Передбачення корисних епітопів клітин Т-хелперів може базуватися на відомих методиках, таких, як спосіб TERITOPE, описаний Sturniolo та ін. (Nature Biotech. 17:555-561 [1999]).

Сахариди можуть бути вибрані з групи, яка складається з: капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи А (MenA), капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи С (MenC), капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи Y (MenY), капсулярного сахариду *N. meningitidis* серогрупи W (MenW), капсулярного сахариду *H. influenzae* типу b (Hib), капсулярного сахариду групи I *Streptococcus* групи B, капсулярного сахариду групи II *Streptococcus* групи B, капсулярного сахариду групи III *Streptococcus* групи B, капсулярного сахариду групи IV *Streptococcus* групи B, капсулярного сахариду групи V *Streptococcus* групи B, капсулярного сахариду типу 5 *Staphylococcus aureus*, капсулярного сахариду типу 8 *Staphylococcus aureus*, Vi сахариду з *Salmonella typhi*, LPS *N. meningitidis* (такого, як L3 та/або L2), LPS *M. catarrhalis*, LPS *H. influenzae* та будь-якого з капсулярних пневмококових сахаридів, таких, як з серотипів: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F або 33F. В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом складається або включає два або більше різних сахариди з того самого роду бактерій (наприклад, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* або *Haemophilus*).

Перша та друга хімічні групи, присутні на білковому носії, є відмінними одна від одної та в ідеалі являють собою природні хімічні групи, що можуть легко використовуватися з метою кон'югації. Вони можуть бути незалежно вибрані з групи, яка складається з: карбоксильних груп, аміногруп, сульфгідрильних груп, гідроксильних груп, імідазолільних груп, груп гуанідилу та груп індолілу. В одному втіленні перша хімічна група є карбоксиль-

ною групою, а друга є аміногрупою, або навпаки. Ці групи розглядаються більш детально нижче.

У специфічному втіленні імуногенна композиція включає принаймні 2 різні капсулярні полісахариди *N. meningitidis*, де один або більше є вибраним(и) з першої групи, яка складається з MenA та MenC, який/які є кон'югованим(и) з білком носія за допомогою хімічної групи першого типу на білковому носії (наприклад, карбоксильної групи), а один або більше відмінних сахаридів, який/які є вибраним(и) з другої групи, яка складається з MenC, MenY та MenW, який/які кон'югованим(и) з білком носія за допомогою хімічної групи другого типу на білковому носії (наприклад, аміногрупи).

У додатковому втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає MenA, кон'югований за допомогою першого типу хімічної групи (наприклад, карбоксильної групи), та MenC, кон'югований за допомогою другого типу хімічної групи (наприклад, аміногрупи).

В іншому втіленні імуногенна композиція включає MenC, кон'югований за допомогою першого типу хімічної групи (наприклад, карбоксильної групи), та MenY, кон'югований за допомогою другого типу хімічної групи (наприклад, аміногрупи).

В іншому втіленні імуногенна композиція включає MenA, кон'югований за допомогою першого типу хімічної групи (наприклад, карбоксильної групи), та MenC, MenY та MenW, кон'югований за допомогою другого типу хімічної групи (наприклад, аміногрупи).

В іншому втіленні імуногенна композиція включає MenA та MenC, кон'юговані за допомогою першого типу хімічної групи (наприклад, карбоксильної групи), та MenY та MenW, кон'юговані за допомогою другого типу хімічної групи (наприклад, аміногрупи).

У будь-якому з приведених вище втілень може бути присутній Hib, також кон'югований до того самого типу білкового носія. Hib може бути кон'югованим до носія за допомогою першого або другого типу хімічної групи. В одному втіленні він є кон'югованим за допомогою карбоксильної групи.

Загальний розгляд аспектів винаходу

Сахариди згідно з винаходом (зокрема, сахариди *N. meningitidis* та/або капсулярний сахарид Hib), що включені у фармацевтичні (імуногенні) композиції згідно з винаходом є кон'югованими з білком носія, таким, як токсод правця (ТТ), фрагмент С токсод правця, нетоксичні мутанти токсину правця [примітка: усі такі варіанти ТТ розглядаються як такі, що мають той самий тип білка носія для цілей даного винаходу], токсод дифтерії (DT), CRM197, інші нетоксичні мутанти дифтерійного токсину [такі, як CRM176, CRM 197, CRM228, CRM 45 (Uchida та ін. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 та CRM107 та інші мутації, описані Nicholls та Youle в Genetically Engineered Toxins, ред.: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делеція або мутація Glu-148 на Asp, Gln або Ser та/або Ala 158 на Gly та та інші мутації, розкриті в US 4709017 або US 4950740; мутації принаймні одного або більше залишків Lys 516, Lys 526, Phe 530 та/або Lys 534 та інші мутації, розкриті в US 5917017 або US 6455673; або

фрагмент, розкритий в US 5843711] (примітка: усі такі варіанти DT розглядаються як такі, що мають той самий тип білка носія для цілей даного винаходу), пневмококовий пневмолізін (Kuo та ін. (1995) *Infect Immun* 63; 2706-13), OMPC (білок зовнішньої мембрани менінгококу, який звичайно екстрагують з *N. meningitidis* серогрупи B - EP0372501), синтетичні пептиди (EP0378881, EP0427347), білки теплового шоку (WO 93/17712, WO 94/03208), білки коклюшу (WO 98/58668, EP0471177), цитокіни, лімфокіни, ростові фактори або гормони (WO 91/01146), штучні білки, що включають множинні епітопи CD4+ Т-клітин, що мають походження від антигенів різноманітних патогенів (Falugi та ін. (2001) *Eur J Immunol* 31; 3816-3824) таких, як N19 білок (Baraldoi та ін. (2004) *Infect Immun* 72; 4884-7), пневмококовий поверхневий білок PspA (WO 02/091998), білків, які поглинають залізо (WO 01/72337), токсину A або B *C. difficile* (WO 00/61761) або білка D (EP594610 та WO 00/56360).

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом використовує той самий тип білка носія (незалежно) принаймні у двох, трьох, чотирьох або у кожному із сахаридів (наприклад, у капсулярних полісахаридах *N. meningitidis* та/або Hib), що містяться в них. У втіленні, де є присутніми Hib та капсулярні полісахариди *N. meningitidis*, Hib може бути кон'югованим до того самого типу білка носія, що й принаймні два, три, чотири або кожний із сахаридів *N. meningitidis*. Наприклад, 2, 3 або 4 сахариди *N. meningitidis* (MenA, C, Y, W) є незалежно кон'югованими до токсосоїда правця для утворення 2, 3 або 4 кон'югатів, та необов'язково Hib є також кон'югованим до ТТ.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає сахарид *N. meningitidis*, кон'югований з білком носія, вибраним з групи, яка складається з ТТ, DT, CRM197, фрагменту С ТТ та білка D. В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає Hib сахарид, кон'югований з білком носія, вибраним з групи, яка складається з ТТ, DT, CRM197, фрагменту С ТТ та білка D.

Імуногенна композиція згідно з винаходом необов'язково включає принаймні один менінгококовий сахаридний кон'югат (наприклад, MenA; MenC; MenW; MenY; MenA та MenC; MenA та MenW; MenA та MenY; MenC та Men W; Men C та MenY; Men W та MenY; MenA, MenC та MenW; MenA, MenC та MenY; MenA, MenW та MenY; MenC, MenW та MenY або MenA, MenC, MenW та MenY), що має співвідношення Men сахариду до білка носія від 1:5 до 5:1, від 1:2 до 5:1, від 1:0,5 до 1:2,5 або від 1:1,25 до 1:2,5 (ваг/ваг.).

Імуногенна композиція згідно з винаходом необов'язково включає Hib сахаридний кон'югат, що має співвідношення Hib до білка носія від 1:5 до 5:1; від 1:2 до 2:1; від 1:1 до 1:4; від 1:2 до 1:3,5 або приблизно або точно 1:2,5 або 1:3 (ваг/ваг.).

Співвідношення сахариду та білка носія (ваг./ваг.) у кон'югаті може бути визначене при використанні простерилізованого кон'югату. Кількість білка визначається при використанні реакції Лоурі (наприклад, Lowry та ін. (1951) *J. Biol. Chem.*

193, 265-275 або Peterson та ін. *Analytical Biochemistry* 100, 201-220 (1979)), а кількість сахариду визначається при використанні ICP-OES (спектроскопії на основі індукованого плазмонного випромінювання) для MenA, DMAP аналізу для MenC та резорцинового аналізу для MenW та MenY (Monsigny та ін. (1988) *Anal. Biochem.* 175, 525-530).

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає сахаридний(і) кон'югат(и) *N. meningitidis* та/або кон'югат на основі сахариду Hib, де сахарид(и) *N. meningitidis* та/або Hib сахарид є кон'югованим з білком носія через лінкер, наприклад, біфункціональний лінкер. Лінкер необов'язково є гетерофункціональним або гомофункціональним та має, наприклад, реактивну аміногрупу та реактивну групу карбонової кислоти, 2 реактивні аміногрупи або дві реактивні групи карбонової кислоти. Лінкер містить, наприклад, від 4 до 20, від 4 до 12, від 5 до 10 атомів вуглецю. Можливий лінкер являє собою ADH. Інші лінкери включають В-пропіонамід (WO 00/10599), нітрофенілетиламін (Gever та ін. (1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165; 171-288), галоалкілгаліди (US4057685), глікозидні зв'язки (US4673574, US4808700), гександіамін та 6-амінокапронову кислоту (US4459286).

Сахаридні кон'югати, присутні в імуногенних композиціях згідно з винаходом, можуть бути одержані за допомогою відомих методик злиття. Спосіб кон'югації може базуватися на активації сахариду за допомогою 1-ціано-4-диметиламіно піридинію тетрафторборату (CDAP) з утворенням ціанатного естеру. Активованій сахарид може, таким чином, сполучатися безпосередньо або через спейсерну (лінкерну) групу з аміногрупою на білку носія. Наприклад, спейсер може являти собою цистамін або цистеамін, що забезпечує утворення тіолованого полісахариду, який може бути злитий з носієм через тіоефірний зв'язок, який одержують в результаті реакції з малеїмід-активованим білком носія (наприклад, при використанні GMBS) або з гомоацетилованим білком носія (наприклад, при використанні йодацетаміду або N-сукцинімідилбромацетатбромацетату). Необов'язково, ціанатний естер (необов'язково, одержаний за допомогою хімічної реакції при використанні CDAP) сполучають з гександіаміном або ADH, та амінодериватизований сахарид кон'югують з білком носія при використанні хімічного зв'язку карбодііміду (наприклад, EDAC або EDC) за допомогою карбоксильної групи на білковому носії. Такі кон'югати описуються в опублікованій заявці PCT WO 93/15760 *Uniformed Services University*, WO 95/08348 та WO 96/29094.

Інші прийнятні методики використовують карбініди, гідразиди, активні естери, норборан, п-нітробензойну кислоту, N-гідроксисукцинімід. Багато з них є описаними в WO 98/42721. Кон'югація може втягувати карбонільний лінкер, який може утворюватися шляхом реакції вільної гідроксильної групи сахариду з CDI (Bethell та ін. *J. Biol. Chem.* 1979, 254; 2572-4, Hearn та ін. *J. Chromatogr.* 1981. 218; 509-18), після чого проводять реакцію з білком для одержання карбаматного зв'язку. Це

може передбачати відновлення аномерного кінця до первинної гідроксильної групи, необов'язкову реакцію захисту/зняття захисту з первинної гідроксильної групи за допомогою CDI з утворенням CDI карбаматної проміжної сполуки та злиттям CDI карбаматної проміжної сполуки з аміногрупою на білку.

Кон'югати можуть також бути одержані при використанні методик безпосереднього відновного амінування, як описано в US 4365170 (Jennings) та US 4673574 (Anderson). Інші способи є описаними в EP-0-161-188, EP-208375 та EP-0-477508.

Додатковий спосіб втягує злиття активованого за допомогою ціаногенбромиду (або CDAP) сахариду, дериватизованого при використанні гідразиду адипінової кислоти (ADH), з білком носія шляхом карбодіімідної конденсації (Chu C. та ін. Infect. Immunity, 1983 245 256), наприклад, при використанні EDAC.

В одному втіленні гідроксильна група (необов'язково активована гідроксильна група, наприклад, гідроксильна група, активована ціанатним естером) на сахариді зв'язується з аміногрупою або карбоксильною групою на білку, або безпосередньо або опосередковано (за допомогою лінкера). Коли є наявним лінкер, то гідроксильна група на сахариді необов'язково зв'язується з аміногрупою на лінкері, наприклад, за допомогою CDAP кон'югації. Додаткова аміногрупа у лінкері (наприклад, ADH) може бути кон'югована з групою карбонової кислоти на білку, наприклад, при використанні карбодіімідного зв'язку, наприклад, при використанні EDAC. В одному втіленні H1b або капсулярний(і) сахарид(и) *N. meningitidis* (або сахарид взагалі) кон'югують з лінкером перед тим, як лінкер кон'югують з білком носія. Альтернативно, лінкер може бути кон'югованим з носієм перед кон'югацією з сахаридом.

В загальному випадку для злиття/кон'югації можуть використовуватися наступні типи хімічних груп на білку носія:

А) Карбоксильна група (наприклад, через аспарагінову або глутамінову кислоту). В одному втіленні ця група зв'язується з аміногрупами на сахарадах безпосередньо або з аміногрупою на лінкері за допомогою карбодіімідного зв'язку, наприклад, при використанні EDAC.

В) Аміногрупа (наприклад, через лізин). В одному втіленні ця група зв'язується з карбоксильними групами на сахарадах безпосередньо або з карбоксильною групою на лінкері за допомогою карбодіімідного зв'язку, наприклад, при використанні EDAC. В іншому втіленні ця група зв'язується з гідроксильними групами, активованими за допомогою CDAP або CNBr, на сахарадах безпосередньо або з такими групами на лінкері; з сахарадами або лінкерами, які мають альдегідну групу; з сахарадами або лінкерами, що мають групу сукцинімідного естеру.

С) Сульфгідрильна група (наприклад, через цистеїн). В одному втіленні ця група зв'язується з бром- або хлорацетилкованими сахарадами або лінкером за допомогою малеїмідного зв'язку. В одному втіленні цю групу активують/модифікують при використанні біс-діазобензидину.

Д) Гідроксильна група (наприклад, через тирозин). В одному втіленні цю групу активують/модифікують при використанні біс-діазобензидину.

Е) Імідазолільна група (наприклад, через гістидин). В одному втіленні цю групу активують/модифікують при використанні біс-діазобензидину.

Ф) Гуанідильна група (наприклад, через аргінін).

Г) Індолільна група (наприклад, через триптофан).

В загальному випадку, наступні групи на сахариді можуть використовуватися для злиття: OH, COOH або NH<sub>2</sub>. Альдегідні групи можуть бути одержані після різноманітних способів обробки, відомих в області техніки, а саме: періодат, кислотний гідроліз, пероксид водню, тощо

Підходи прямого злиття:

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний естер + NH<sub>2</sub>-білок → кон'югат

Сахарид-альдегід + NH<sub>2</sub>-білок → Основа Шиффа + NaCNBH<sub>3</sub> → кон'югат

Сахарид-COOH + NH<sub>2</sub>-білок + EDAC → кон'югат

Сахарид-NH<sub>2</sub> + COOH-білок + EDAC → кон'югат

Підходи опосередкованого злиття через спейсер (лінкер):

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний естер + NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> → сахарид — NH<sub>2</sub> + COOH-білок + EDAC → кон'югат

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний естер + NH<sub>2</sub>-SH → сахарид — SH + SH-білок (нативний білок з незахищеним цистеїном або одержаний після модифікації аміногруп білка, наприклад, за допомогою SPDP) → сахарид-Б-Б-білок

Сахарид-OH + CNBr або CDAP → ціанатний естер + NH<sub>2</sub>-SH → сахарид—SH + малеїмід-білок(модифікація аміногруп) → кон'югат

Сахарид-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> → сахарид—NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-білок → кон'югат

Сахарид-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>-SH → сахарид—SH + SH-білок (нативний білок з незахищеним цистеїном або одержаний після модифікації аміногруп білка, наприклад, за допомогою SPDP) → сахарид-S-S-білок

Сахарид-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>-SH → сахарид—SH + малеїмід-білок (модифікація аміногруп) → кон'югат

Сахарид-Альдегід + NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> → сахарид—NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-білок → кон'югат

Примітка: замість EDAC, як описано вище, можна застосовувати будь-який прийнятний карбодіімід.

Підсумовуючи зазначене вище, можна сказати, що типи хімічної групи білка носія, які можуть в загальному випадку використовуватися для злиття з сахаридом, являють собою аміногрупи (наприклад, на залишках лізину), COOH групи (наприклад, на залишках аспарагінової та глутамінової кислоти) та SH групи (якщо це доступно) (наприклад, на цистеїнових залишках).

В одному втіленні Hib сахарид, якщо він присутній, кон'югують з білком носія при використанні CNBr або CDAP, або комбінації CDAP та карбодіімідного зв'язку (такого, як EDAC), або комбінації CNBr та карбодіімідного зв'язку (такого, як EDAC). Необов'язково Hib кон'югують при використанні CNBr та карбодіімідного зв'язку, необов'язково EDAC. Наприклад, CNBr використовують для приєднання сахариду та лінкера, а потім карбодіімідний зв'язок використовують для приєднання лінкера до білкового носія.

В одному втіленні принаймні один з капсулярних полісахаридів *N. meningitidis* (або сахарид в загальному випадку) безпосередньо кон'югують з білком носія; необов'язково MenW та/або MenY та/або MenC сахарид(и) безпосередньо кон'югують з білком носія. Наприклад MenW; MenY; MenC; MenW та MenY; MenW та MenC; MenY та MenC; або MenW, MenY та MenC безпосередньо зв'язуються з білком носія. Необов'язково, коли принаймні один з капсулярних полісахаридів *N. meningitidis* безпосередньо кон'югують за допомогою CDAP. Наприклад MenW; MenY; MenC; MenW та MenY; MenW та MenC; MenY та MenC; або MenW, MenY та MenC безпосередньо зв'язуються з білком носія за допомогою CDAP (див WO 95/08348 та WO 96/29094). В одному втіленні усі капсулярні полісахариди *N. meningitidis* кон'югують до токсоїда правця.

В одному втіленні співвідношення MenW та/або Y сахариду до білка носія складає від 1:0,5 до 1:2 (ваг./ваг.), та/або співвідношення MenC сахариду до білка носія складає від 1:0,5 до 1:4 або від 1:0,5 до 1:1,5 (ваг./ваг.), зокрема, коли ці сахариди є безпосередньо зв'язаними білком, необов'язково при використанні CDAP.

В одному втіленні принаймні один з капсулярних сахаридів *N. meningitidis* (або сахарид в загальному випадку) є кон'югованим до білка носія за допомогою лінкера, наприклад, біфункціонального лінкера. Лінкер є необов'язково гетерофункціональним або гомобіфункціональним та має, наприклад, реактивну аміногрупу та реактивну групу карбонової кислоти, 2 реактивні аміногрупи або 2 реактивні групи карбонової кислоти. Лінкер має, наприклад, від 4 до 20, від 4 до 12, від 5 до 10 атомів вуглецю. Можливий лінкер являє собою ADH.

В одному втіленні MenA; MenC; або MenA та MenC є кон'югованими з білком носія (наприклад, токсоїдом правця) за допомогою лінкера.

В одному втіленні принаймні один з капсулярних сахаридів *N. meningitidis* (або сахарид в загальному випадку) є кон'югованим до білка носія за допомогою лінкера при використанні CDAP та EDAC. Наприклад, MenA; MenC; або MenA та MenC кон'югують з білком за допомогою лінкера (наприклад, такого, що має дві групи гідразино на своїх кінцях, такого, як ADH) при використанні CDAP та EDAC, як описано вище. Наприклад, CDAP використовується для кон'югації сахариду до лінкера, а EDAC використовується для кон'югації лінкера до білка. Необов'язково, кон'югація за допомогою лінкера приводить до одержання співвідношення сахариду до білка носія від 1:0,5 до

1:6; від 1:1 до 1:5 або від 1:2 до 1:4 для MenA; MenC; або MenA та MenC.

В одному втіленні MenA капсулярний сахарид, у разі присутності, є принаймні частково О-ацетилованим, так, що принаймні 50 %, 60 %, 70%, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць є О-ацетилowanними принаймні в одному положенні. О-ацетилювання є, наприклад, присутнім принаймні в О-3 положенні принаймні 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць.

В одному втіленні MenC капсулярний сахарид, у разі присутності, є принаймні частково О-ацетилованим, так, що принаймні 50 %, 60 %, 70%, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % ( $\alpha 2 \rightarrow 9$ )-зв'язаних NeuNAc повторюваних одиниць є О-ацетилованими принаймні в одному або двох положеннях. О-ацетилювання є, наприклад, присутнім в О-7 та/або О-8 положенні принаймні 30 %, 40%, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць.

В одному втіленні MenW капсулярний сахарид, у разі присутності, є принаймні частково О-ацетилованим, так, що принаймні 50 %, 60 %, 70%, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць є О-ацетилованими принаймні в одному положенні. О-ацетилювання є, наприклад, присутнім принаймні в О-7 та/або О-9 положенні принаймні 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць.

В одному втіленні MenY капсулярний сахарид, у разі присутності, є принаймні частково О-ацетилованим, так, що принаймні 20 %, 30 %, 40%, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць є О-ацетилованими принаймні в одному положенні або двох положеннях. О-ацетилювання є, наприклад, присутнім принаймні в 7 та/або 9 положенні принаймні 20 %, 30 %, 40%, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 98 % повторюваних одиниць.

Процент О-ацетилювання відноситься до проценту повторюваних одиниць, які містять О-ацетилювання. Це значення може вимірюватися у сахариді до кон'югації та/або після кон'югації.

В одному втіленні імуногенної композиції згідно з винаходом, присутній сахарид або кожний присутній капсулярний сахарид *N. meningitidis* є кон'югованим з ТТ. У додатковому втіленні кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є окремо кон'югованим з окремим білком носія. У додатковому втіленні кожний кон'югат капсулярного сахариду *N. meningitidis* має співвідношення сахарид:носій 1:5-5:1 або 1:1-1:4 (ваг/ваг). У додатковому втіленні принаймні один, два або три кон'югат(и) капсулярного сахариду *N. meningitidis* є безпосередньо кон'югований(и) з білком носія. У додатковому втіленні Men W та/або MenY, MenW та/або MenC, MenY та/або MenC, або MenW та MenC та MenY є безпосередньо кон'югованими з білком носія. У додатковому втіленні принаймні один, два або три сахаридний(и) кон'югат(и) *N. meningitidis* є безпосередньо кон'югованим(и) за допомогою хімічної реакції при використанні CDAP. У додатковому втіленні співвідношення Men W та/або Y сахариду та білка носія знахо-

диться в межах від 1:0,5 до 1:2 (ваг./ваг.). У додатковому втіленні співвідношення MenC сахариду та білка носія знаходиться в межах від 1:0,5 до 1:2 (ваг./ваг.). У додатковому втіленні принаймні один, два або три капсулярний(і) сахарид(и) *N. meningitidis* є кон'югованим(и) з білком носія через лінкер (який може бути біфункціональним, наприклад, таким, що має дві реактивні аміногрупи (таким, як ADH) або дві реактивні карбоксильні групи, або реактивну аміногрупу на одному кінці та реактивну карбоксильну групу на іншому). Лінкер містить від 4 до 12 атомів вуглецю. У додатковому втіленні один або кожний капсулярний(і) сахарид(и) *N. meningitidis*, кон'юговані за допомогою лінкера, є кон'югованими з лінкером за допомогою реакції при використанні CDAP. У додатковому втіленні білок носія є кон'югованим з лінкером при використанні карбодімідного зв'язку, наприклад, при використанні EDAC. У додатковому втіленні один або кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* кон'югують з лінкером перед кон'югацією білка носія з лінкером. У додатковому втіленні MenA кон'югують з білком носія за допомогою лінкера (співвідношення MenA сахариду та білка носія може бути від 1:2 до 1:5 (ваг./ваг.)). У додатковому втіленні MenC кон'югують з білком носія за допомогою лінкера (співвідношення MenC сахариду та білка носія може складати від 1:2 до 1:5 (ваг./ваг.)).

Винахідники також помітили, що раніше уся увага була звернена на застосування олігосахаридів завдяки легкості одержання кон'югату. Винахідники виявили, що при використанні нативних полісахаридних кон'югатів або полісахаридних кон'югатів, які класифіковані за розмірами, можуть бути реалізовані наступні переваги: 1) кон'югат має високу імуногенність та проходить через фільтр з розміром пор 0,2 мікрона; 2) може бути поліпшена імунна пам'ять (як у прикладі 3); 3) змінене співвідношення полісахариду до білка у кон'югаті, так, що співвідношення полісахариду до білка (ваг./ваг.) у кон'югаті може бути підвищене (це може приводити до зниження супресійного ефекту носія); 4) імуногенні кон'югати, що піддаються гідролізу (такі, як MenA кон'югати), можуть бути стабілізовані при використанні більш великих полісахаридів для кон'югації. Застосування більш великих полісахаридів може приводити до більш високого перехресного зв'язування з носієм кон'югату та може знижувати вивільнення вільного сахариду з кон'югату. Кон'югатні вакцини, описані в області техніки, піддаються деполімеризації полісахаридів перед кон'югацією для того, щоб поліпшити кон'югацію. Винахідники даного винаходу виявили, що менінгококова (або сахаридна) кон'югатна вакцина, яка зберігає більший розмір сахариду, може забезпечувати хорошу імунну відповідь проти менінгококового захворювання.

Імуногенна композиція згідно з винаходом може, таким чином, включати сахаридні кон'югати, в яких середній розмір кожного сахариду до кон'югації є більшим за 50 кДа, 75 кДа, 100 кДа, 110 кДа, 120 кДа або 130 кДа. В одному втіленні цей кон'югат після кон'югації може легко фільтруватися через фільтр з розміром пор 0,2 мікрона, так, що

після фільтрації одержують вихід більший, ніж 50, 60, 70, 80, 90 або 95 % у порівнянні зі зразком, який не піддавали фільтрації.

Зокрема, імуногенна композиція згідно з винаходом включає капсулярні полісахариди *N. meningitidis* принаймні з однієї, двох, трьох або чотирьох серогруп A, C, W та Y, кон'юговані з білком носія, де середній розмір (середньовагова молекулярна вага; Mw) принаймні одного, двох, трьох або чотирьох або кожного сахариду *N. meningitidis* є більшою за 50 кДа, 60 кДа, 75 кДа, 100 кДа, 110 кДа, 120 кДа або 130 кДа.

Імуногенна композиція може включати капсулярні полісахариди *N. meningitidis* з однієї, двох, трьох або чотирьох серогруп A, C, W та Y, кон'юговані з білком носія, де принаймні один, два, три, чотири або кожний сахарид *N. meningitidis* є або нативним сахаридом, або є каліброваним за розміром (зменшеним за розміром) з коефіцієнтом x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 або x10 відносно середньовагової молекулярної ваги нативного полісахариду.

Для цілей даного винаходу термін "нативний полісахарид" відноситься до сахариду, який не піддавався процесу, мета якого зменшити сахарид за розміром.

Полісахарид може в незначній мірі бути зменшений у розмірі під час проведення звичайних процедур очистки. Такий сахарид все ще є нативним. Тільки тоді, коли полісахарид піддавали процедурам калібрування за розміром, він не вважається нативним.

Для цілей даного винаходу термін "калібрований за розміром з коефіцієнтом до 2" означає, що сахарид піддають процесу, призначеному для зменшення розміру сахариду але залишають розмір більшим, ніж половина розміру нативного полісахариду. x3, x4 тощо інтерпретуються таким самим чином, тобто сахарид піддають процесу, призначеному для зменшення розміру полісахариду, але залишають розмір більшим, ніж третина, чверть, тощо розміру нативного полісахариду.

В одному аспекті винаходу імуногенна композиція включає капсулярні полісахариди *N. meningitidis* з однієї, двох, трьох або чотирьох серогруп A, C, W та Y, кон'юговані з білком носія, де принаймні один, два, три, чотири або кожний сахарид *N. meningitidis* є нативним полісахаридом.

В одному аспекті винаходу імуногенна композиція включає капсулярні полісахариди *N. meningitidis* з однієї, двох, трьох або чотирьох серогруп A, C, W та Y, кон'юговані з білком носія, де принаймні один, два, три, чотири або кожний сахарид *N. meningitidis* є каліброваним за розміром з коефіцієнтом до x1,5, x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 або x10.

Імуногенні композиції згідно з винаходом необов'язково включають кон'югати: капсулярний сахарид *N. meningitidis* серогрупи C (MenC), капсулярний сахарид серогрупи A (MenA), капсулярний сахарид серогрупи W135 (MenW), капсулярний сахарид серогрупи Y (MenY), капсулярні сахариди серогруп C та Y (MenCY), капсулярні сахариди серогруп C та A (MenAC), капсулярні сахариди серогруп C та W (MenCW), капсулярні сахариди

серогруп A та Y (MenAY), капсулярні сахариди серогруп A та W (MenAW), капсулярні сахариди серогруп W та Y (Men WY), капсулярний сахарид серогруп A, C та W (MenACW), капсулярні сахариди серогруп A, C та Y (MenACY); капсулярні сахариди серогруп A, W135 та Y (MenAWY), капсулярні сахариди серогруп C, W135 та Y (MenCWY); або капсулярні сахариди серогруп A, C, W135 та Y (MenACWY). Це є визначенням "однієї, двох, трьох або чотирьох" або "принаймні однієї з" серогруп A, C, W та Y, або кожного сахариду *N. meningitidis*, який згадується в даній заявці.

В одному втіленні середній розмір принаймні одного двох, трьох, чотирьох або кожного сахариду *N. meningitidis* складає від 50 кДа до 1500 кДа, від 50 кДа до 500 кДа, від 50 кДа до 300 кДа, від 101 кДа до 1500 кДа, від 101 кДа до 500 кДа, від 101 кДа до 300 кДа, як визначено MALLS.

В одному втіленні MenA сахарид, у разі присутності, має молекулярну вагу 50-500 кДа, 50-100кДа, 100-500 кДа, 55-90 кДа, 60-70 кДа або 70-80 кДа або 60-80 кДа.

В одному втіленні MenC сахарид, у разі присутності, має молекулярну вагу 100-200 кДа, 50-100кДа, 100-150 кДа, 101-130 кДа, 150-210 кДа або 180-210 кДа.

В одному втіленні MenY сахарид, у разі присутності, має молекулярну вагу 60-190 кДа, 70-180кДа, 80-170 кДа, 90-160 кДа, 100-150 кДа або 110-140 кДа, 50-100 кДа, 100-140 кДа, 140-170 кДа або 150-160 кДа.

В одному втіленні MenW сахарид, у разі присутності, має молекулярну вагу 60-190 кДа, 70-180кДа, 80-170 кДа, 90-160 кДа, 100-150 кДа, 110-140 кДа, 50-100 кДа або 120-140 кДа.

Молекулярна вага або середня молекулярна вага сахариду в даній заявці відноситься до середньомолекулярної молекулярної ваги (Мв) сахариду, що вимірюється за допомогою кон'югації та вимірюється за допомогою MALLS.

Методика MALLS є добре відомою в області техніки, її типово здійснюють так, як описано у прикладі 2. Для MALLS аналізу менингококових сахаридів можна використовувати дві колонки у комбінації (TSKG6000 та 5000PWxl), при цьому сахариди піддають елюванню водою. Сахариди визначають при використанні детектора світлового розсіювання (наприклад, Wyatt Dawn DSP, оснащеного 10 мВ аргонним лазером 488 нм) та інтерферометричного рефрактометра (наприклад, Wyatt Otilab DSP, оснащеного P100 камерою та червоним фільтром при 498 нм).

В одному втіленні сахариди *N. meningitidis* є нативними полісахаридами або нативними полісахаридами, які зменшені у розмірах при проведенні нормального процесу екстракції.

В одному втіленні сахариди *N. meningitidis* зменшують за розмірами при використанні механічного розщеплення, наприклад, за допомогою мікропсевдозрідження або обробки ультразвуком. Мікропсевдозрідження та обробка ультразвуком мають перевагу у зменшенні розміру більш великих нативних полісахаридів у достатній мірі для того, щоб забезпечити одержання здатного до фільтрації кон'югату (наприклад, проходження

через фільтр з розміром пор 0,2 мікрона). Зменшення розміру є таким, що має коефіцієнт, не більший за x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3, x2 або x1,5.

В одному втіленні імуногенна композиція включає кон'югати *N. meningitidis*, які одержані із суміші нативних полісахаридів та сахаридів, які зменшені у розмірах на коефіцієнт, не більший, ніж x20. Наприклад, сахариди з MenC та/або MenA є нативними. Наприклад, сахариди з MenY та/або MenW є зменшеними за розмірами з коефіцієнтом, не більшим за x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 або x2. Наприклад, імуногенна композиція містить кон'югат, одержаний з MenY та/або MenW та/або MenC та/або MenA, який має розмір, зменшений на коефіцієнт, не більший за x10 та/або є мікропсевдозрідженим. Наприклад, імуногенна композиція містить кон'югат, виготовлений з нативного MenA та/або MenC та/або MenW та/або MenY. Наприклад, імуногенна композиція включає кон'югат, виготовлений з нативного MenC. Наприклад, імуногенна композиція включає кон'югат, виготовлений з нативного MenC та MenA, який є зменшеним за розміром при використанні коефіцієнта, не більшого за x10 та/або є мікропсевдозрідженим. Наприклад, імуногенна композиція включає кон'югат, виготовлений з нативного MenC та MenY, який є зменшеним за розміром при використанні коефіцієнта, не більшого за x10 та/або є мікропсевдозрідженим.

В одному втіленні полідисперсність сахариду складає 1-1,5, 1-1,3, 1-1,2, 1-1,1 або 1-1,05, а після кон'югації полідисперсність кон'югату складає 1,0-2,5, 1,0-2,0, 1,0-1,5, 1,0-1,2, 1,5-2,5, 1,7-2,2 або 1,5-2,0. Усі вимірювання полідисперсності проведені за допомогою MALLS.

Сахариди необов'язково піддають зменшенню розміру до 1, 5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 або 20 разів у порівнянні з розміром полісахариду, ізоляваного з бактерій.

В одному втіленні кожний сахарид *N. meningitidis* є або нативним полісахаридом або є зменшеним у розмірі при використанні коефіцієнту, не більшого за x10. У додатковому втіленні кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є нативним полісахаридом. У додатковому втіленні принаймні один, два, три або чотири капсулярний(і) сахарид(и) *N. meningitidis* є зменшеним у розмірах за допомогою мікропсевдозрідження. У додатковому втіленні кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* є зменшеним за розміром на коефіцієнт, не більший за x10. У додатковому втіленні кон'югати *N. meningitidis* є виготовленими із суміші нативних полісахаридів та сахаридів, які є зменшеними за розмірами на коефіцієнт, не більший за x10. У додатковому втіленні капсулярний сахарид з серогрупи Y є зменшеним за розмірами на коефіцієнт, не більший за x10. У додатковому втіленні капсулярні полісахариди з серогруп A та C являють собою нативні полісахариди, а сахариди з серогруп W135 та Y є зменшеними за розмірами з коефіцієнтом, не більшим за x10. У додатковому втіленні середній розмір кожного капсулярного сахариду *N. meningitidis* знаходиться в межах від 50 кДа до 300 кДа або від 50 кДа до 200 кДа. У додатковому втіленні імуногенна композиція вклю-

чає MenA капсулярний сахарид, що має середній розмір, більший за 50 кДа, 75 кДа, 100 кДа, або середній розмір, що складає 50-100 кДа або 55-90 кДа або 60-80 кДа. У додатковому втіленні імуногенна композиція включає MenC капсулярний сахарид, що має середній розмір, більший за 50 кДа, 75 кДа, 100 кДа або такий, що складає 100-200 кДа, 100-150 кДа, 80-120 кДа, 90-110 кДа, 150-200 кДа, 120-240 кДа, 140-220 кДа, 160-200 кДа або 190-200 кДа. У додатковому втіленні імуногенна композиція включає MenY капсулярний сахарид, що має середній розмір, більший за 50 кДа, 75 кДа, 100 кДа, або такий, що складає 60-190 кДа або 70-180 кДа або 80-170 кДа або 90-160 кДа або 100-150 кДа, 110-145 кДа або 120-140 кДа. У додатковому втіленні імуногенна композиція включає MenW капсулярний сахарид, що має середній розмір, більший за 50 кДа, 75 кДа, 100 кДа, або такий, що складає 60-190 кДа або 70-180 кДа або 80-170 кДа або 90-160 кДа або 100-150 кДа, 140-180 кДа, 150-170 кДа або 110-140 кДа.

Імуногенна композиція згідно з винаходом може включати капсулярний сахарид *H. influenzae b* (Hib), кон'югований з білком носія. Такий може бути кон'югований з білком носія, вибраним з групи, яка складається з TT, DT, CRM197, фрагменту C TT та білка D, наприклад, TT. Hib сахарид може бути кон'югованим до того самого білка носія, що й принаймні, один, два, три або усі капсулярні сахаридні кон'югати *N. meningitidis*, наприклад, TT. Співвідношення Hib до білка носія в Hib капсулярному сахаридному кон'югаті може бути у межах від 1:5 до 5:1 (ваг/ваг), наприклад, від 1:1 до 1:4, від 1:2 до 1:3,5 або близько 1:3 (ваг/ваг.). Hib капсулярний сахарид може бути кон'югованим до білка носія за допомогою лінкера (див. вище). Лінкер може бути біфункціональним (з двома реактивними аміногрупами, таким, як ADH, або двома реактивними групами карбонової кислоти, або реактивною аміногрупою на одному кінці та реактивною групою карбонової кислоти на іншому кінці). Він може містити від 4 до 12 атомів вуглецю. Hib сахарид може бути кон'югованим до білка носія або лінкера при використанні CNBr або CDAP. Білок носія може бути кон'югованим до Hib сахариду через лінкер при використанні способу, що передбачає наявність карбодімідного хімічного зв'язку, наприклад, при використанні EDAC (за допомогою карбоксильної хімічної групи на носії). Доза Hib сахаридного кон'югату може складати від 0,1 дог 9 мкг, від 1 до 5 мкг або від 2 до 3 мкг сахариду.

У додатковому втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає Hib сахаридний кон'югат та принаймні два сахаридні кон'югати *N. meningitidis*, де Hib кон'югат є присутнім у більш низькій дозі сахариду, ніж середнє значення дози сахариду принаймні двох сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*. Альтернативно, Hib кон'югат є присутнім у більш високій дозі сахариду, ніж доза сахариду кожного з принаймні двох сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*. Наприклад, доза Hib кон'югату може бути принаймні на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % або 80 % нижчою за середнє значення найнижчої дози сахариду принаймні двох додаткових сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*.

Середнє значення дози визначають шляхом додання доз усіх додаткових сахаридів та ділення на число додаткових сахаридів. Додаткові сахариди являють собою усі сахариди в імуногенній композиції окремо від Hib та можуть включати капсулярні полісахариди *N. meningitidis*. "Доза" являє собою кількість імуногенної композиції або вакцини, що вводиться людині.

Hib сахарид являє собою капсулярний полісахарид на основі полірибозилфосфату (PRP) *Haemophilus influenzae* типу b або олігосахарид, який має походження від цього мікроорганізму.

Принаймні, два додаткові бактеріальні сахаридні кон'югати узяті для визначення двох додаткових бактеріальних сахаридних кон'югатів у доповнення до Hib кон'югату. Два додаткові бактеріальні кон'югати можуть включати капсулярні сахаридні кон'югати *N. meningitidis*.

Імуногенні композиції згідно з винаходом можуть включати додаткові сахаридні кон'югати, які походять від одного або більше мікроорганізмів: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Група A Streptococci*, *Група B Streptococci*, *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* або *Staphylococcus epidermidis*. В одному втіленні імуногенна композиція включає капсулярні полісахариди, які мають походження від однієї або більше серогруп A, C, W135 та Y *Neisseria meningitidis*. Додаткове втілення включає капсулярні полісахариди, які походять від *Streptococcus pneumoniae*. Пневмококові антигени на основі капсулярного сахариду є не обов'язково вибраними з серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F та 33F (необов'язково з серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F). Додаткове втілення включає капсулярні полісахариди типу 5, типу 8 або 336 *Staphylococcus aureus*. Додаткове втілення включає капсулярні полісахариди типу I, типу II або типу III *Staphylococcus epidermidis*. Додаткове втілення включає Vi сахарид з *S. typhi*. Додаткове втілення включає капсулярні полісахариди типу Ia, типу Ic, типу II, типу III або типу V *Streptococcus* групи B. Додаткове втілення включає капсулярні полісахариди *Streptococcus* групи A, необов'язково додаткове включає принаймні один M білок та необов'язково множинні типи M білка.

Імуногенні композиції згідно з винаходом можуть також включати DTPa або DTPw вакцину (наприклад, таку, що містить DT, TT, та або цільні частинки протикоклюшної (Pw) вакцини, або безклітинну вакцину коклюшу (Pa) (що містить, наприклад, токсин коклюшу, FHA, пертактин та, необов'язково, аглютиногени 2 та 3). Такі комбінації можуть також включати вакцину проти гепатиту B (наприклад, вона може включати поверхневий антиген вірусу гепатиту B [HepB], необов'язково адсорбований на фосфаті алюмінію). В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає DTPwHepBHibMenAC вакцину, в якій HibMenAC компонент є таким, як описано вище.

Імуногенні композиції згідно з винаходом необов'язково включають додаткові вірусні антигени, що забезпечують захист проти захворювання, спричиненого збудниками кори та/або епідемічного

паротиту та/або краснухи та/або вітряної віспи. Наприклад, імуногенна композиція згідно з винаходом містить антигени збудника кору, епідемічного паротиту, краснухи та вітряної віспи (MMRV). В одному втіленні ці вірусні антигени є необов'язково присутніми у тому самому контейнері, що й менінгококовий та/або Hib сахаридний(и) кон'югат(и). В одному втіленні ці вірусні антигени є ліофілізованими.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом додатково включає антиген з *N. meningitidis* серогрупи B. Антиген є необов'язково капсулярним полісахаридом з *N. meningitidis* серогрупи B (MenB) або полісахаридом зменшеного розміру або олігосахаридом, який походить від нього, що можуть бути кон'юговані з білковим носієм. Антиген є необов'язково препаратом везикули зовнішньої мембрани *N. meningitidis* серогрупи B, як описано в EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 та WO 04/14419.

В загальному випадку імуногенна композиція згідно з винаходом може включати дозу кожного сахаридного кон'югату у межах від 0,1 до 20 мкг, від 2 до 10 мкг, від 2 до 6 мкг або від 4 до 7 мкг сахариду.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом містить кожний капсулярний сахарид *N. meningitidis* у дозі 0,1-20 мкг; 1-10 мкг; 2-10 мкг, 2,5-5 мкг, приблизно або точно 5 мкг; або приблизно або точно 2,5 мкг. В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає MenA, MenC, MenW та MenY (необов'язково кон'югований до токсикоїда правця) у дозах 2,5, 2,5, 2,5 та 2,5 мкг, відповідно, 5, 5, 5 та 5 мкг відповідно, або 5, 5, 2,5 та 2,5 мкг, відповідно.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом, наприклад, містить Hib сахаридний кон'югат при дозі сахариду від 0,1 до 9 мкг; від 1 до 5 мкг або від 2 до 3 мкг або приблизно або точно 2,5 мкг. У додатковому втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом, наприклад, містить Hib сахаридний кон'югат з дозою сахариду від 0,1 до 9 мкг; від 1 до 5 мкг або від 2 до 3 мкг або приблизно або точно 2,5 мкг та кожний з полісахаридних кон'югатів *N. meningitidis* при дозі сахариду від 2 до 20 мкг, від 3 до 10 мкг, або від 4 до 7 мкг або приблизно або точно 5 мкг.

"Приблизно" або "близько" визначається як значення, що перебуває у межах 10 % більше або менше даної цифри для цілей даного винаходу.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом може містити дозу сахариду Hib сахаридного кон'югату, яка є, наприклад, меншою, ніж 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % або 10 % середнього значення сахаридної дози принаймні двох, трьох, чотирьох або кожного з сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*. Доза сахариду для Hib сахариду є, наприклад, такою, що знаходиться в межах від 20 % до 60 %, від 30 % до 60 %, від 40 % до 60 % або приблизно або точно 50 % середнього значення дози сахариду принаймні двох, трьох, чотирьох або кожного з сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом містить дозу сахариду Hib сахарид-

ного кон'югату, яка є, наприклад, меншою, ніж 90 %, 80 %, 75 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % або 10 % найнижчої дози сахариду принаймні двох, трьох, чотирьох або кожного з сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*. Сахаридна доза Hib сахариду є, наприклад, такою, що знаходиться в межах від 20 % до 60 %, від 30 % до 60 %, від 40 % до 60 % або приблизно або точно 50 % найнижчої дози сахариду принаймні двох, трьох, чотирьох або кожного з сахаридних кон'югатів *N. meningitidis*.

В одному втіленні винаходу доза сахариду кожного з принаймні двох, трьох чотирьох або кожного із сахаридних кон'югатів *N. meningitidis* є необов'язково такою самою або приблизно такою самою.

Приклади імуногенних композицій згідно з винаходом являють собою композиції, що складають з або включають:

Hib кон'югат, MenA кон'югат та MenC кон'югат, необов'язково при співвідношеннях доз сахариду 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (ваг./ваг). Необов'язково, коли доза MenA сахариду є більшою, ніж доза MenC сахариду.

Hib кон'югат, MenC кон'югат та MenY кон'югат, необов'язково при співвідношеннях доз сахариду 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (ваг./ваг). Необов'язково, коли доза MenC сахариду є більшою, ніж доза MenY сахариду.

Hib кон'югат, MenC кон'югат та MenW кон'югат, необов'язково при співвідношеннях доз сахариду 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (ваг./ваг). Необов'язково, коли доза MenC сахариду є більшою, ніж доза MenW сахариду.

Hib кон'югат, MenA кон'югат та MenW кон'югат, необов'язково, при співвідношеннях доз сахариду 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (ваг./ваг). Необов'язково, коли доза MenA сахариду є більшою, ніж доза MenW сахариду.

Hib кон'югат, MenA кон'югат та MenY кон'югат, необов'язково при співвідношеннях доз сахариду 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (ваг./ваг). Необов'язково, коли доза MenA сахариду є більшою, ніж доза MenY сахариду.

Hib кон'югат, MenW кон'югат та MenY кон'югат, необов'язково при співвідношеннях доз сахариду 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3:6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (ваг./ваг). Необов'язково, коли доза MenY сахариду є більшою, ніж доза MenW сахариду.

MenA, MenC, MenW та MenY при співвідношеннях доз сахариду 1:1:1:1 або 2:1:1:1 або 1:2:1:1 або 2:2:1:1 або 1:3:1:1 або 1:4:1:1 (ваг./ваг).

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою вакцину, що включає імуногенну композицію згідно з винаходом та фармацевтично прийнятний наповнювач.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом доводиться до значення pH від pH 7,0 до 8,0, від pH 7,2 до 7,6 або приблизно або точно pH 7,4.

Імуногенна композиція або вакцина згідно з винаходом є необов'язково ліофілізованими у присутності стабілізуючого агенту, наприклад, поліолу, такого, як сахароза або трегалоза.

Необов'язково, коли імуногенна композиція або вакцина згідно з винаходом містить кількість ад'юванту, достатню, для поліпшення імунної відповіді на імуноген. Прийнятні ад'юванти включають, але не обмежені такими, як солі алюмінію (фосфат алюмінію або гідроокис алюмінію), суміші сквалену (SAF-1), мураміловий пептид, похідні сапоніну, препарати стінок клітин мікобактерій, монофосфорил ліпід А, похідні міколевої кислоти, поверхнево-активні речовини на основі неіонних блок-співполімерів, Quil А, субодиницю холерного токсину В, поліфосфазен та його похідні, а також імуностимулювальні комплекси (ISCOM), такі, як ті, що описані Takahashi та ін. (1990) Nature 344:873-875.

Для комбінацій N. meningitidis або HibMen, які обговорюються вище, є бажаним не використовувати ад'ювант на основі будь-якої солі алюмінію або будь-який ад'ювант взагалі.

Як з усіма імуногенними композиціями або вакцинами, імунологічно ефективні кількості імуногенів повинні визначатися емпірично. Фактори, які необхідно враховувати, включають імуногенність, чи буде імуноген створювати комплекс або буде ковалентно приєднуватися до ад'юванту або білка носія або іншого носія, спосіб введення та кількість імунізуючих дозувань, які вводяться.

Активний агент може бути присутній у різних концентраціях у фармацевтичній композиції або вакцині згідно з винаходом. Є типовим, коли мінімальна концентрація речовини є кількістю, необхідною для досягнення заданої мети, у той час, коли максимальна концентрація є максимальною кількістю, яка буде залишатися у розчині або гомогенно суспендуватися у початковій суміші. Наприклад, мінімальна кількість терапевтичного агенту є необов'язково такою, що буде забезпечувати одиничну терапевтично ефективну дозу. Для біоактивних речовин мінімальна концентрація є кількістю, необхідною для біоактивності при відновленні, а максимальна концентрація знаходиться у точці, в якій не може підтримуватися гомогенна суспензія. В загальному випадку очікується, що кожна доза буде включати 1-100 мкг білкового антигену, необов'язково, 5-50 мкг або 5-25 мкг. Наприклад, дози бактеріальних сахаридів складають 10-20 мкг, 5-10 мкг, 2,5-5 мкг або 1-2,5 мкг сахариду у кон'югаті.

Вакцинні препарати згідно з даним винаходом можуть використовуватися для захисту або лікування ссавця (наприклад, пацієнта-людини), чутливого до інфекції, за допомогою введення вказаної вакцини при використанні системного шляху або шляхом введення через слизову оболонку. Пацієнт-людина є необов'язково немовлям (менше 12 місяців), дитиною, що починає ходити (12-24, 12-16 або 12-14 місяців), дитиною (2-10, 3-8 або 3-5 років), підлітком (12-21, 14-20 або 15-19 років) або дорослою людиною. Ці введення можуть включати внутрішньом'язове, інтраперитонеальне, інтрадермальне або підшкірне введення, або вве-

дення через слизову оболонку до орально-го/травного, респіраторного, сечостатевого трактів. Інтраназальне введення вакцин для лікування пневмонії або отиту є переважним (оскільки назофарингеальне носійство пневмококів може більш ефективно запобігатися, послаблюючи, таким чином, інфекцію на ранній стадії). Незважаючи на те, що вакцина згідно з винаходом може вводитися як одинична доза, її компоненти можуть також сумісно вводитися одночасно або в різні моменти часу (наприклад, якщо сахариди є присутніми у вакцині, то такі можуть вводитися окремо у той самий час або через 1-2 тижні після введення вакцини на основі бактеріального білка для оптимальної координації імунних відповідей стосовно кожної іншої). У доповнення до одного шляху введення, можуть використовуватися 2 різні шляхи введення. Наприклад, вірусні антигени можуть вводитися ID (інтрадермально), у той час як бактеріальні білки можуть вводитися IM (внутрішньом'язово) або IN (інтраназально). У разі присутності сахаридів, вони можуть вводитися IM (або ID), а бактеріальні білки можуть вводитися IN (або ID). У доповнення до цього вакцини згідно з винаходом можуть вводитися IM для примуючих дозувань та IN доз для бустерних ін'єкцій.

Приготування вакцин є описаним у загальних рисах в виданні "Конструювання вакцин" («Субодиничний та ад'ювантний підхід» (ред. Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Інкапсуляція у ліпосоми є описаною Fullerton, Патент США 4,235,877.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою вакцинний набір для сумісного або послідовного введення, що включає дві мультівалентні імуногенні композиції для забезпечення захисту хазяїна проти захворювання, що викликається Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Neisseria meningitidis та, необов'язково, Haemophilus influenzae. Наприклад, набір необов'язково включає перший контейнер, що містить один або більше компонентів:

токсоїд правця (TT),

дифтерійний токсойд (DT), та

цільноклітинні або неклітинні компоненти коклюшу

другий контейнер, що містить:

імуногенну композицію згідно з винаходом, як описано вище (наприклад, таку, що включає комбінації сахаридних кон'югатів Men або HibMen).

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою вакцинний набір для сумісного або послідовного введення, що включає дві мультівалентні імуногенні композиції для забезпечення захисту хазяїна проти захворювання, що викликається Streptococcus pneumoniae та Neisseria meningitidis та необов'язково Haemophilus influenzae. Наприклад, набір необов'язково включає перший контейнер, що містить:

один або більше кон'югатів білкового носія та капсулярного сахариду, одержаного з Streptococcus pneumoniae [де капсулярний сахарид є необов'язково одержаним з пневмококового серопиту, вибраного з групи, яка складається з серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A,

11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F та 33F].

другий контейнер, що містить:

імуногенну композицію згідно з винаходом, як описано вище (наприклад, таку, що включає комбінації сахаридних кон'югатів Men або HibMen)

Приклади Hib кон'югату та полісахаридних кон'югатів *N. meningitidis* є такими, як описано вище.

Типово, коли вакцина *Streptococcus pneumoniae* у вакцинному наборі згідно з даним винаходом (або у будь-якій імуногенній композиції згідно з винаходом, описаній вище) буде включати сахаридні антигени (необов'язково кон'юговані), де сахариди є такими, що походять від принаймні чотирьох серотипів пневмококів, вибраних з групи, яка складається з серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F та 33F. Необов'язково, коли чотири серотипи включають 6B, 14, 19F та 23F. Необов'язково, принаймні 7 серотипи включаються у композицію, наприклад, такі, що одержані із серотипів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, та 23F. Необов'язково, більше 7 серотипів включаються у композицію, наприклад принаймні 10, 11, 12, 13 або 14 серотипів. Наприклад, композиція в одному втіленні включає 10 або 11 капсулярних полісахаридів, які походять від серотипів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F та, необов'язково, 3 (усі необов'язково кон'юговані). В одному втіленні згідно з винаходом у композицію включаються принаймні 13 сахаридних антигенів (необов'язково кон'югованих), хоча додаткові сахаридні антигени, наприклад, 23-валентні (такі, як серотипи 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F та 33F), також передбачаються даним винаходом.

Пневмококові сахариди є незалежно кон'югованими з будь-яким білком носія, наприклад, CRM197, токсодом правця, дифтерійним токсодом, білком D або будь-якими іншими білками носія, які згадуються вище.

Необов'язково, коли вакцинний набір згідно з винаходом включає третій компонент. Наприклад, набір необов'язково включає перший контейнер, що містить один або більше компонентів:

токсоїд правця (TT),

дифтерійний токсод (DT), та

цільноклітинні або неклітинні компоненти коклюшу

другий контейнер, що містить:

один або більше кон'югатів білкового носія та капсулярного сахариду, одержаного з *Streptococcus pneumoniae* [де капсулярний сахарид є необов'язково одержаним з пневмококового серопиту, вибраного з групи, яка складається з серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F та 33F].

та третій контейнер, що містить:

імуногенну композицію згідно з винаходом, як описано вище (наприклад, таку, що включає комбінації Men або HibMen сахаридного кон'югату).

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою спосіб одержання імуногенної композиції

або вакцини згідно з винаходом, що включають етап змішування сахаридів згідно з винаходом, наприклад, змішування капсулярних полісахаридів *N. meningitidis* принаймні з однієї, двох, трьох або усіх чотирьох серогруп A, C, W та Y, кон'югованих до білка носія, з фармацевтично прийнятним носієм.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою спосіб імунізації людини-хазяїна проти захворювання, спричиненого бактеріями, наприклад, інфекції *N. meningitidis* та, необов'язково, *Haemophilus influenzae*, що включає введення хазяїну імунопротективної дози імуногенної композиції або вакцини або набору згідно з винаходом, необов'язково, при використанні одиначної дози.

Незалежний аспект згідно з винаходом являє собою спосіб імунізації людини-хазяїна імуногенною композицією, що включає принаймні 2 різні кон'югати капсулярних сахаридів *N. meningitidis*, вибрані з групи, яка складається з серогруп A, C, W та Y (необов'язково, MenA, C, W та Y), де введення одиначної дози (необов'язково, підліткам, дорослим, дітям) приводить до того, що кров, узята через місяць після введення, виявляє 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 95 % респондерів у SBA аналізі, який вимірює рівні відповіді проти MenA, MenC, MenW та/або MenY. Необов'язково, коли SBA є таким, як описаним у Прикладі 9, з респондером, якого піддавали аналізу так, як описано у Прикладі 9.

Додатковий незалежний аспект згідно з винаходом являє собою імуногенну композицію, що включає MenA, MenC, MenW та/або MenY кон'югати, які є здатними викликати імунну відповідь після введення одиначної дози, так, що більше 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 95 % людей (дітей, підлітків або дорослих), яких було інокульовано, класифікують як респондерів у SBA аналізі при використанні зразків крові, узятих через місяць після інокуляції (необов'язково при використанні критерію, описаного у Прикладі 9).

Така імуногенна композиція необов'язково має додаткові структурні характеристики, описані в даній заявці.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою імуногенну композицію згідно з винаходом для застосування у лікуванні або запобіганні захворювання, спричиненого бактеріями, наприклад, інфекції *N. meningitidis* та, необов'язково, *Haemophilus influenzae*.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою застосування імуногенної композиції або вакцини або набору згідно з винаходом у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання захворювань, спричинених бактеріями, наприклад, інфекції *N. meningitidis* та, необов'язково, *Haemophilus influenzae*.

Терміни "такий, що включає", "включають" та "включає" в даній заявці призначені для застосування по чергово з термінами "такий, що складається", "складаються з" "складається з".

Усі посилання або патентні заявки, що цитуються в даному описі, введені в дану заявку як посилання.

Винахід ілюструється прикладами, що його супроводжують. Приклади, представлені нижче, здійснені при використанні стандартних методик, які є добре відомим та звичайними для спеціаліста в даній області техніки, за винятком тих випадків, де інше є детально описаним. Приклади є ілюстративними, але не обмежують винахід.

#### Приклади

Приклад 1 - одержання полісахаридних кон'югатів

Ковалентне зв'язування PRP полісахариду *Haemophilus influenzae* (Hib) з ТТ здійснювали за допомогою хімічного злиття, що була розроблена Chu та ін. (*Infection and Immunity* 1983, 40 (1); 245-256). Hib PRP полісахарид активували шляхом додання CNBr та інкубації при pH 10,5 протягом 6 хвилин. Знижували значення pH до pH 8,75 та додавали дигідрозид адипінової кислоти (ADH), інкубацію продовжували протягом додаткових 90 хвилин. Активований PRP приєднували до очищеного токсойда правця за допомогою карбодіімідної конденсації при використанні 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDAC). EDAC додавали для активації PRP до досягнення заключного співвідношення 0,6 мг EDAC/мг активованого PRP. Значення pH доводили до 5,0 та додавали очищений токсойд правця до досягнення концентрації 2 мг ТТ/мг активованого PRP. Одержаний розчин залишали на 3 дні при слабкому перемішуванні. Після фільтрування через фільтр 0,45 мкм кон'югат очищали на сефакриловій колонці S500HR (Pharmacia, Sweden), урівноваженій у 0,2M NaCl.

MenC - ТТ кон'югати одержували при використанні нативних полісахаридів (більше 150 кДа, як вимірювали за допомогою MALLS) або таких, що піддавали незначному мікропсевдозрідженню. MenA-ТТ кон'югати одержували при використанні або нативного полісахариду або в незначній мірі мікропсевдозрідженого полісахариду вагою, більшою за 60 кДа, як вимірювали за допомогою MALLS способом Прикладу 2. MenW та MenY-ТТ кон'югати одержували при використанні зменшених у розмірі полісахаридів з вагою приблизно 100-200 кДа, як вимірювали за допомогою MALLS (див. Приклад 2). Зменшення розмірів здійснювали шляхом мікропсевдозрідження при використанні гомогенізатора Emulsiflex C-50. Потім полісахариди фільтрували через фільтр 0,2 мкм.

Активацію злиття проводили так, як описано в WO96/29094 та WO 00/56360. Коротко, полісахарид при концентрації 10-20 мг/мл в 2M NaCl pH 5,5-6,0 змішували з розчином CDAP (100 мг/мл свіжоприготовленого в ацетонітрилі/WFI, 50/50) до заключного співвідношення CDAP/полісахарид 0,75/1 або 1,5/1. Через 1,5 хвилини підвищували значення pH до 10,0 за допомогою гідроокису натрію. Через три хвилини додавали токсойд правця до досягнення співвідношення білок/полісахарид 1,5/1 для MenW, 1,2/1 для MenY, 1,5/1 для MenA або 1,5/1 для MenC. Реакцію проводили протягом однієї-двох годин.

Після етапу злиття додавали гліцин до заключного співвідношення гліцин/PS (ваг./ваг.) 7,5/1, та значення pH доводили до pH 9,0. Суміш залишали

на 30 хвилин. Кон'югат освітлювали при використанні 10 мкм фільтра Kleenpak та потім завантажували у колонку Sephacryl S400HR при використанні буфера для елюювання 150 mM NaCl, 10 mM або 5 mM Трис pH 7,5. Партію для клінічних досліджень фільтрували на фільтрі для стерилізації Opticlar 4. Одержані кон'югати мали середнє значення співвідношення полісахарид:білок 1:1-1:5 (ваг./ваг.).

Приклад 1a - одержання MenA та MenC полісахаридних кон'югатів згідно з винаходом

MenC - ТТ кон'югати одержували при використанні нативних полісахаридів (більше 150 кДа, як вимірювали за допомогою MALLS) або таких, що піддавали незначному мікропсевдозрідженню. MenA-ТТ кон'югати одержували при використанні або нативного полісахариду або в незначній мірі мікропсевдозрідженого полісахариду вагою, більшою за 60 кДа, як вимірювали за допомогою MALLS способом Прикладу 2. Зменшення розмірів здійснювали шляхом мікропсевдозрідження при використанні гомогенізатора Emulsiflex C-50. Потім полісахариди фільтрували через фільтр 0,2 мкм.

Для кон'югації MenA капсулярного полісахариду до токсойда правця через спейсер використовували наступний спосіб. Ковалентне зв'язування полісахариду зі спейсером (ADH) здійснювали при використанні реакції спарювання, за допомогою якої полісахарид активували при контрольованих умовах при використанні агента для ціанілування 1-ціано-4-диметиламіно-піридинію тетрафторборату (CDAP). Спейсер вступав у реакцію з ціанілованим PS через гідрозинової групи з утворенням стабільного ізосечовинного зв'язку між спейсером та полісахаридом.

10 мг/мл розчин MenA (pH 6,0) [3,5 г] оброблювали свіжоприготовленим 100 мг/мл розчином CDAP у суміші ацетонітрил/вода (50/50 (об./об.)) з одержанням співвідношення CDAP/MenA 0,75 (ваг./ваг.). Через 1,5 хвилини підвищували значення pH до 10,0. Через 3 хвилини додавали ADH з одержанням співвідношення ADH/MenA 8,9. Значення pH підвищували до 8,75 та проводили реакцію протягом 2 годин, підтримуючи це значення pH (температуру підтримували на рівні 25 °C).

Розчин PSAAH концентрували до одержання чверті початкового об'єму, а потім піддавали діалізації з 30 об'ємами 0,2M NaCl при використанні фільтра Filtron Omega з границею пропускання 10 кДа, та продукт концентрування піддавали фільтрації.

Перед проведенням реакції кон'югації (карбодіімідна конденсація) очищений розчин ТТ та розчин PSAAH розводили до досягнення концентрації 10 мг/мл для PSAAH та 10 мг/мл для ТТ.

Додавали EDAC (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід) до розчину PSAH (2 г сахариду) для того, щоб досягти заключного співвідношення 0,9 мг EDAC/мг PSAAH. Значення pH доводили до 5,0. Додавали очищений токсойд правця при використанні перистальтичного насоса (протягом 60 хвилин) до досягнення концентрації 2 мг ТТ/мг PSAAH. Одержаний розчин залишали на 60 хвилин при температурі +25°C при перемішуванні для одержання заключного часу спарювання

120 хвилин. Розчин нейтралізували шляхом додавання 1М Трис-НСІ рН 7,5 (1/10 заключного об'єму) та залишали на 30 хвилин при температурі +25 °С, потім протягом ночі при температурі від +2 °С до +8 °С.

Освітлювали кон'югат при використанні фільтра 10 мкм та очищали при використанні колонки Sephacryl S400HR (Pharmacia, Sweden). Колонку урівнювали за допомогою 10 мМ Трис-НСІ (рН 7,0), 0,075 М NaCl та кон'югат (приблизно 660 мл) завантажували у колонку (від +2 °С до +8 °С). Збирали пул елювання як функцію оптичної густини при 280 нм. Збір починали, коли поглинання підвищувалося до 0,05. Збір продовжували до тих пір, поки Kd не досягав значення 0,30. Кон'югат стерилізували через фільтр при +20 °С, а потім зберігали при температурі від +2 °С до +8 °С. Одержаний кон'югат мав співвідношення полісахарид:білок 1:2-1:4 (ваг/ваг).

Для того, щоб кон'югувати MenC капсулярний полісахарид до токсойда правця через спейсер, використовували наступний спосіб. Ковалентне зв'язування полісахариду та спейсера (ADH) здійснювали при використанні реакції спарювання, за допомогою якої полісахарид активували при контрольованих умовах при використанні агента для ціанілування 1-ціано-4-диметиламіно-піридинію тетрафторборату (CDAP). Спейсер вступав у реакцію з ціанілованим PS через гідразинові групи з утворенням стабільного ізосечовинного зв'язку між спейсером та полісахаридом.

20 мг/мл розчину MenC (рН6,0) (3,5 г) оброблювали свіжопротвореним розчином 100 мг/мл CDAP у суміші ацетонітрил/вода (50/50 (об./об.)) з одержанням співвідношення CDAP/MenC 1,5 (ваг/ваг). Через 1,5 хвилини підвищували значення рН до 10,0. Через 3 хвилини додавали ADH з одержанням співвідношення ADH/MenC 8,9. Значення рН підвищували до 8,75 та проводили реакцію протягом 2 годин (температуру підтримували на рівні 25 °С).

Розчин PSAAH концентрували до одержання мінімального об'єму 150 мл, а потім піддавали діалізації з 30 об'ємами 0,2М NaCl при використанні фільтра Filtron Omega з границею пропускання 10 кДа, та продукт концентрування піддавали фільтрації.

Перед проведенням реакції кон'югації очищений розчин ТТ та розчин PSAAH (2 г) розводили в 0,2М NaCl до досягнення концентрації 15 мг/мл для PSAAH та 20 мг/мл для ТТ.

Очищений токсойд правця додавали до розчину PSAH для того, щоб досягти заключного співвідношення 2 мг ТТ/мг PSAAH. Значення рН доводили до 5,0. Додавали EDAC (16,7 мг/мл в Трис 0,1М рН 7,5) при використанні перистальтичного насоса (протягом 10 хвилин) до досягнення концентрації 0,5 мг EDAC/мг PSAAH. Одержаний розчин залишали на 110 хвилин при +25 °С при перемішуванні та регуляції значення рН для одержання заключного часу спарювання 120 хвилин. Потім розчин нейтралізували шляхом додавання 1М Трис-НСІ рН 9,0 (1/10 заключного об'єму) та залишали на 30 хвилин при +25 °С, а потім протягом ночі при температурі від +2 °С до +8 °С.

Освітлювали кон'югат при використанні фільтра 10 мкм та очищали при використанні колонки Sephacryl S400HR (Pharmacia, Sweden). Колонку урівнювали 10 мМ Трис-НСІ (рН 7,0), 0,075 М NaCl, та кон'югат (приблизно 460 мл) завантажували у колонку (температура від +2 °С до +8 °С). Збирали пул елювання як функцію оптичної густини при 280 нм. Збір починали, коли поглинання підвищувалося до 0,05. Збір продовжували до тих пір, поки Kd не досягав значення 0,20. Кон'югат стерилізували через фільтр при +20 °С, а потім зберігали при температурі від +2 °С до +8 °С. Одержаний кон'югат мав співвідношення полісахарид:білок 1:2-1:4 (ваг/ваг).

Приклад 2 - визначення молекулярної ваги при використанні MALLS

Детектори приєднували до колонки високоефективної хроматографії за розмірами молекул, з якої елювали зразки. З одного боку детектор розсіювання лазерного світла вимірював інтенсивність світла, розсіяні при куті 16 градусів за допомогою макромoleкулярного розчину, а з іншого боку, інтерферометричний рефрактометр, вбудований у систему, дозволяв проводити визначення кількості елюованого зразка. Зі значень цих інтенсивностей можна визначити розмір та форму макромoleкул у розчині.

Середнє значення молекулярної ваги ( $M_w$ ) визначали як суму ваги усіх видів, помноженої на їх відносну молекулярну вагу та поділену на суму ваги усіх видів.

а) Середньовагова молекулярна вага:  $-M_w$

$$M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

б) Середньокількісна молекулярна вага:  $-M_n$

$$M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

с) Корінь з квадрату середнього значення радіусу:  $-R_w$  та  $R^2_w$  являє собою квадрат радіусу, який визначається рівнянням:

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

( $-m_i$  являє собою масу центру розсіювання, а  $-r_i$  являє собою відстань між центром розсіювання та центром тяжіння макромoleкули).

д) Полідисперсність визначають як співвідношення  $-M_w / M_n$ .

Менінгококові полісахариди піддають аналізу за допомогою MALLS шляхом завантажування у дві колонки BEPX (TSKG6000 та 5000PWxl), що використовуються у комбінації. 25 мкл полісахариду завантажують у колонку та піддають елюванню 0,75 мл профільтрованої води. Полісахариди визначають при використанні детектора розсіяного світла (Wyatt Dawn DSP, оснащеного 10 мВ аргонним лазером, при 488 нм) та інтерферометрич-

ного рефрактометра (Wyatt Otilab DSP, оснащеного Р100 камерою та червоним фільтром 498 нм).

Молекулярну вагу полідисперсій та відновлених розчинів для усіх зразків підраховували за допомогою способу Дебая при використанні послідовності підбору многочлена 1 у програмі Astra 4,72.

Приклад 3 - клінічний дослід, що підтверджує імунізацію за допомогою Meningitec або MenC-TT кон'югату більшого розміру

Фаза II, відкрите, контрольоване дослідження проводили для порівняння менингококової кон'югатної вакцини серогрупи С (MenC) GSK Biologicals з кон'югатною вакциною Haemophilus influenzae b-менингококової серогрупи С GSK Biological's (Hib-MenC) або Meningitec®. Кожна доза Meningitec® містила 10 мкг олігосахариду менингококу серогрупи С, кон'югованого з 15 мкг CRM197, що виробляється Wyeth. MenC кон'югати GSK містили нативні полісахариди розміром приблизно 200 кДа, кон'юговані з токсойдом правця (TT).

Дослідження складалося з п'яти груп, кожна з яких була запрограмована на 100 осіб, розділених на дві паралельні гілки, як описано далі:

У цьому дослідженні усі особи обох гілок дослідження одержували одну п'яту (1/5) дози Mencevax™ ACWY та супутню дозу Infanrix™ гекса у віці 12-15 місяців (дослідження місяць 0). У цих осіб відбирали два зразки крові (дослідження місяць 0 та дослідження місяць 1). Гілка 1 складалася з чотирьох груп дослідження первинної вакцинації, які піддавали примуванню у віці 3, 4 та 5 місяців за допомогою наступних вакцин:

- Група К: кон'югат MenC (10 мкг), не адсорбований (не адс), токсойд правця (TT) та Infanrix™ гекса (MenC10-TT + Infanrix™ гекса)

- Група L: Hib (10 мкг)-MenC (10 мкг), не адс, TT кон'югат та Infanrix™ пента (Hib10-MenC10-TT + Infanrix™ пента)

- Група M: Hib (5 мкг)-MenC (5 мкг), не адс, TT кон'югат та Infanrix™ пента (Hib5-MenC5-TT + Infanrix™ пента)

- Група N: Meningitec™ та Infanrix™ гекса (Meningitec™ + Infanrix™ гекса)

Дві вакцинні групи Hib-MenC-TT (групи L та M) залишали сліпими у бустерному дослідженні щодо точного складу кандидатної вакцини. Гілка 2 - (Група О) складалася з відібраних за віком осіб, яких раніше не піддавали вакцинації при використанні менингококової вакцини серогрупи С, але таких, що одержували традиційні педіатричні вакцини у відповідності з Німецькою постійною комісією з імунізації.

Критерії для оцінки:

Імуногенність: Визначення бактерицидних титрів антитіл проти менингокока С (SBA-MenC) за допомогою бактерицидного аналізу (граничне значення: розведення 1:8) та ELISA вимірювання антитіл проти менингококової серогрупи С (граничне значення аналізу: 0,3 мкг/мл), Hib полісахариду PRP (граничне значення аналізу: 0,15 мкг/мл) та токсойда правця (граничне значення аналізу: 0,1 МО/мл) у зразках крові, одержаних до вакцинації та приблизно через місяць після вакцинації усіх осіб.

Статистичні методи:

Демографія: Визначення середнього віку у місяцях (із середнім значенням, інтервалом, та стандартним відхиленням [CB]), расовим та статевим складом АТР та загальної групи вакцинованих.

Імуногенність:

Проводили два аналізи на основі АТР групи на імуногенність (для аналізів імунної пам'яті та бустерної відповіді) або АТР групи на безпечність (для аналізу персистенції). Такі включали:

Оцінку імунної відповіді для MenC та бустерної відповіді для Hib та правця (за один місяць перед введенням та через один місяць після введення 1/5 дози чистої полісахаридної вакцини):

- Визначення середнього геометричного значення титрів та концентрацій (GMT та GMC) з 95 % довірчими інтервалами (95 % ДІ)

- Визначення проценту осіб з титром антитіл/концентрацією, вищою за передбачені граничні значення точно з 95 % ДІ (значення серопозитивності/серозахисту)

- Дослідження титрів антитіл/концентрації після вакцинації при використанні обернених інтегральних кривих

- Обчислення стандартизованого асимптотичного 95 % ДІ для відмінності у значенні серопозитивності/серозахисту між примованою групою (групи К, L, M та N) та непримованою групою (група О)

- Визначення середньгеометричного значення індивідуального співвідношення SBA-MenC титру та концентрації анти-PSC з 95 % ДІ

- Визначення 95 % ДІ для співвідношення GMT/С після вакцинації між групами К, L, M та контрольною групою N для анти-PRP та антиправцевих антитіл та між кожною з примованих груп (групи К, L, M та N) та непримованою групою (група О) для SBA-MenC та анти-PSC при використанні моделі ANOVA

Результати

Таблиця 1

Титри SBA-MenC та концентрація анти-PSC антитіл після бустерної вакцинації

Антитіло	Група	N	GMT/C	95 % ДІ Нижня границя	95 % ДІ Верхня границя
SBA-MenC	K - MenC-TT	71	3508,9	2580,1	4772,2
	L - HibMenC	79	2530,1	1831,7	3494,7
	M - HibMenC	81	5385,4	4425,0	6554,2
	N - Meningitec	85	1552,6	1044,4	2307,9
	O - Контроль	91	9,3	6,3	13,6
Анти-PSC	K - MenC-TT	70	28,10	22,59	34,95
	L - HibMenC	71	30,01	24,09	37,38
	M - HibMenC	76	34,58	29,10	41,09
	N - Meningitec	78	16,59	12,98	21,21
	O - Контроль	94	3,05	2,36	3,93

Група K: особи, яких піддавали примуванню за допомогою MenC10-TT + Infanrix гекса. Група L: особи, яких піддавали примуванню за допомогою Hib10-MenC10-TT + Infanrix пента. Група M: особи, яких піддавали примуванню за допомогою Hib5-MenC5-TT + Infanrix пента. Група N: особи, яких піддавали примуванню за допомогою Meningitec + Infanrix гекса; Група O: особи контролю (тобто особи, яких не піддавали примуванню за допомогою MenC кон'югатної вакцини)

N: кількість осіб з прийнятними результатами  
Більш високі титри антитіл проти MenC та більш високі титри SBA були одержані шляхом примування за допомогою кон'югатних вакцин на основі MenC полісахариду, що піддавався відбору на більший розмір (групи K, L та M) у порівнянні з олігосахаридною кон'югатною вакциною Meningitec.

Таблиця 2

Середньоеометричне значення співвідношення титр SBA MenC/концентрація анти-PSC

Група	Час	N	GMR	Нижня границя	Верхня границя
K	До	70	49,470	34,939	70,044
	Після	66	126,138	101,419	156,882
L	До	76	36,528	25,849	51,621
	Після	70	90,200	70,153	115,975
M	До	77	51,298	36,478	72,139
	Після	74	164,950	139,304	195,318
N	До	84	22,571	16,521	30,837
	Після	76	90,168	67,757	119,991
O	До	3	91,634	0,651	12889,8
	Після	87	2,708	1,767	4,149

В усіх трьох примованих групах (групи K, L, M та N) GMR значно підвищувалося у період часу перед бустерною вакцинацією - після бустерної вакцинації, що вказувало на наявність дозрівання

антитіл та їх функціональність. GMR у групі M (примовані за допомогою Hib5-MenC5-TT) було вищим, ніж у групі N (примовані за допомогою Meningitec™).

Таблиця 3

Персистенція у віці 12-15 місяців безпосередньо перед введенням бустерної вакцини

Кінцеві точ-ки	Група	N	%	Група	N	%	Відмінність	Значення %
1	2	3	4	5	6	7	8	9
SBAMenC ≥1:8	K	79	88,6	N	91	80,2	N-K	-8,4
	L	84	93,3	N	91	80,2	N-L	-3,1
	M	85	87,1	N	91	80,2	N-M	-6,8

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65,8	N	91	51,6	N-K	-14,2
	L	84	56,0	N	91	51,6	N-L	-4,3
	M	85	64,7	N	91	51,6	N-M	-13,1
Анти-PSC ≥0,3 мкг/мл	K	79	100,0	N	91	100,0	N-K	0,0
	L	84	100,0	N	91	100,0	N-L	0,0
	M	88	98,9	N	91	100,0	N-M	1,1
Анти-PSC ≥2 мкг/мл	K	79	72,2	N	91	81,3	N-K	9,2
	L	84	64,3	N	91	81,3	N-L	17,0
	M	88	64,3	N	91	81,3	N-M	8,6
Анти-PRP ≥0,15мкг/мл	K	81	88,9	N	91	85,7	N-K	-3,2
	L	86	96,5	N	91	85,7	N-L	-10,8
	M	90	98,9	N	91	85,7	N-M	-13,2
Анти-PRP ≥1 мкг/мл	K	81	33,3	N	91	28,6	N-K	-4,8
	L	86	55,8	N	91	28,6	N-L	-27,2
	M	90	74,4	N	91	28,6	N-M	-45,9
Анти- правцеві ≥0,1МО/мл	K	81	100,0	N	91	96,7	N-K	-3,3
	L	86	100,0	N	91	96,7	N-L	-3,3
	M	90	100,0	N	91	96,7	N-M	-3,3

Група К особи, яких піддавали примуванню за допомогою MenC10-TT + Infanrix™ гекса, Група L особи, яких піддавали примуванню за допомогою Hib10-MenC10-TT + Infanrix™ пента, Група M особи, яких піддавали примуванню за допомогою Hib5-MenC5-TT + Infanrix™ пента, Група N особи, яких піддавали примуванню за допомогою Meningitec™ + Infanrix™ гекса;

N: кількість осіб з прийнятними результатами

Більш високих титрів SBA проти MenC досягали при примуванні за допомогою MenC більшого розміру (групи K, L та M) у порівнянні з примуванням Meningitec™ на основі MenC-олігосахаридного кон'югату

Імунна пам'ять (група ATP для імуногенності)

Введення 1/5 дози ACWY вакцини на основі чистого полісахариду викликало одержання дуже високого титру SBA-MenC в усіх чотирьох примованих групах зі значеннями 98,7-100 % та 97,5-100 % осіб, примованих при використанні кандидатної вакцини, демонструючи титри ≥1:8 та ≥1:128, відповідно У групі, примованій за допомогою Meningitec™, існувала тенденція до більш низького проценту осіб з титрами ≥1:128 (91,8 %) Для порівняння, 17,6 % непримованих осіб мали титри SBA MenC ≥ 1:8 та ≥1:128

Приклад 4 Фаза II клінічного дослідження при використанні HibMenAC-TT кон'югатної вакцини, змішаної з DTPw-HepB

Модель дослідження: Відкрите, рандомізоване (11111), одноцентрове дослідження з п'ятьма групами. П'ять груп одержували наступні режими вакцинації відповідно, у віці 6, 10 та 14 тижнів

- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/2,5/2,5 далі згадується як 2,5/2,5/2,5

- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2,5/5/5 далі згадується як 2,5/5/5

- Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5 далі згадується як 5/5/5

- Tritanrix™-HepB + Hiberix™: далі згадується як Hiberix

- Tritanrix™-HepB/Hiberix™ + Meningitec™: далі згадується як Meningitec

Зразки крові брали при введенні першої вакциної дози (До) та через один місяць після введення третьої вакциної дози (Після-доза 3)

Tritanrix являє собою DTPw вакцину, яка продається GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

105 осіб використовували у кожній з п'яти груп, вони давали загальну кількість 525 осіб у дослідженні

Таблиця 4

Склад GSK вакцинних композицій

Компоненти на дозу (0,5мл)	2,5/2,5/2,5*	2,5/5/5	5/5/5
Hib капсулярний полісахарид PRP, кон'югований до токсоеда правця (TT)	2,5мкг	2,5 мкг	5мкг
Капсулярний полісахарид (PSA) Neisseria meningitidis A, кон'югований до TT	2,5мкг	5мкг	5мкг
Капсулярний полісахарид (PSC) Neisseria meningitidis C, кон'югований до TT	2,5мкг	5мкг	5мкг

\* Вакцина 2,5/2,5/2,5 являла собою розведення дози вакцини Hib-MenAC 5/5/5GSK Biologicals, що містить 2,5 мкг кожного з PRP-TT, MenA-TT та MenC-TT.

Hib-MenAC вакцинні композиції змішували перед введенням з Tritanrix-НерВ. GSK Biologicals', поєднаної з вакциною на основі дифтерії, правця, цільних клітин Bordetella pertussis - гепатиту В (DTPw-HB) (Tritanrix-НерВ), що містить не менше 30 міжнародних одиниць (МО) дифтерійного токсоїда, не менше 60 МО токсоїда правця, не менше 4 МО вбитих клітин Bordetella pertussis та 10 мкг рекомбінантного поверхневого антигену гепатиту В.

Стандартна терапія, доза, спосіб введення, номер партії

Графік вакцинації/місце введення: Одна група одержувала вакцину Tritanrix-НерВ внутрішньом'язово у ліве стегно та Hiberix внутрішньом'язово у праве стегно у віці 6, 10 та 14 тижнів. Інша група одержувала Tritanrix-НерВ/Hiberix вакцину і внутрішньом'язово у ліве стегно та

Meningitec вакцину у внутрішньом'язово у праве стегно у віці 6, 10 та 14 тижнів.

Вакцини/склад/доза/номер партії: Вакцина Tritanrix-НерВ, що використовувалася, була такою, як описано вище.

Одна доза (0,5 мл) кон'югатної вакцини на основі Haemophilus influenzae типу b GSK Biologicals': Hiberix™ містила 10 мкг PRP, кон'югованого з токсоїдом правця. У групі Hiberix™ її змішували зі стерильним розріджувачем, а в групі Meningitec™ її змішували з Tritanrix™-НерВ.

Одна доза (0,5 мл) вакцини MENINGITEC™ Wyeth Lederle's містила: 10 мкг капсулярного олигосахариду менингокової групи C, кон'югованого з 15 мкг білка Corynebacterium diphtheria CRM197 та солями алюмінія.

Результати - імунні відповіді, одержані проти Hib, MenA та MenC

Таблиця 5a

## Анти- PRP (мкг/ мл)

Група	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ	
		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ
%≥0,15	100	96,5	100	99,0	94,8	100	100	96,5	100	100	96,5	100	100	96,5	100
GMC	20,80	15,96	27,10	22,62	17,72	28,88	19,36	15,33	24,46	38,55	29,93	49,64	10,94	8,62	13,88

Таблиця 5b

## SBA -MenC

Група	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	% GMC/Т	95% ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ	
		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ
%≥1:8	99	94,7	100	100	96,5	100	100	96,5	100	2,9	0,6	8,4	100	96,5	100
GMT	3132	2497	3930	4206	3409	5189	3697	3118	4384	4,7	3,9	5,6	4501	3904	5180

Таблиця 5c

## SBA MenA

Група	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ	
		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ
%≥1:8	99,7	91,9	99,7	100	95,8	100	100	96,2	100	6,8	2,5	14,3	9,1	4,0	17,1
GMT	316,7	251,4	398,9	418,5	358,6	488,5	363	310,5	424,4	5,6	4,3	7,4	5,6	4,4	7,2

Таблиця 5d

## Анти-PSC (мкг/мл)

Група	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ	
		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ
%≥0,3	100	96,5	100	100	96,4	100	100	96,5	100	8,2	3,6	15,6	100	96,5	100
GMC	49,03	43,24	55,59	71,11	62,49	80,92	61,62	54,88	69,20	0,17	0,15	0,19	58,02	51,42	65,46

Таблиця 5е

## Анти - PSA (мкг/мл)

Група	2,5/2,5/2,5			2,5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	% GMC/Т	95% ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ		% GMC/Т	95 % ДІ	
		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ		НГ	ВГ
%≥0, 3	100	36,4	100	100	96,5	100	99,0	94,8	100	1,0	0,0	5,4	5,9	2,2	12,5
GMC	18,10	15,34	21,35	26,51	22,93	30,79	23,40	20,05	27,30	0,15	0,15	0,15	0,17	0,15	0,18

## Висновок

Порівняння результатів імуногенності, досягнутої при використанні кон'югатної вакцини на основі олігосахариду MenC-CRM197 та трьох композицій GSK, що містять полісахаридні кон'югати MenA-TT та MenC-TT, показало, що полісахаридні Мен кон'югати є здатними викликати хорошу імуногенну відповідь, подібну до такої, що досягається при використанні олігосахаридної кон'югатної вакцини Meningitec. Усі досліджувані композиції давали відповідь на МенС у 100 % пацієнтів.

Приклад 5 - Фаза II клінічне дослідження при сумісному введенні Hib MenCY та Infanrix пента згідно з графіком введення у 2-, 3- та 4 місяці

Модель дослідження: Фаза II, відкрите (частково подвійне, сліпе\*), рандомізоване, контрольоване, мультицентрове дослідження з 5 групами, які піддавалися трьохдозовому графіку вакцинації при використанні вакцин, представлених нижче:

Група Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ пента

Група Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ пента

Група Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ пента

Група Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + Infanrix™ пента

Група Menjugate: Menjugate™\*\* + Infanrix™ гекса (Контроль).

\*Hib-MenCY 2,5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 та Hib-MenC вводили при використанні подвійного сліпого способу, у той час, як Hib-MenCY 5/5/5 група та група Menjugate були відкритими. Композиції 2,5/5/5, 5/10/10 та 5/5/5 Hib-MenCY містили МенС нативні полісахариди та МенУ полісахариди, які були мікропсевдозріждженими.

\*\*Menjugate™ містить 10 мкг МенС олігосахаридів, кон'югованих з 12,5-25 мкг CRM197 на дозу, вказана вакцина виробляється Chiron.

Вакцинація у +/- 2, 3, 4 місячному віці (Дослідження місяць 0, місяць 1 та місяць 2), та зразки крові (3,5 мл) від осіб за один місяць та через один місяць після первинної вакцинації (Дослідження місяць 0 та місяць 3).

Досліджувана вакцина, доза, спосіб введення, номер партії: Три дози вводили внутрішньом'язово з одномісячними інтервалами приблизно у віці 2, 3 та 4 місяців так, як описано нижче:

Таблиця 6

## Вакцини, що вводяться (Дослідження та Контроль), група, режим/сайт та доза

Група	Режим (вік у місяцях)	Вакцинна доза, що вводиться місце - у ліву верхню частину стегна	Вакцини, що вводяться сумісно місце - у праву верхню частину стегна
Hib-MenCY 2,5/5/5	2, 3, та 4	Hib (2,5 мкг) - MenC-TT (5 мкг)-MenY-TT (5 мкг)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ пента)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3, та 4	Hib(5мкг)-MenC-TT(10 мкг)-MenY-TT (10 мкг)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ пента)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3, та 4	Hib (5 мкг)-MenC-TT (5 мкг)-MenY-TT (5 мкг)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ пента)
Hib-MenC	2, 3, та 4	Hib (5 мкг)-Men C (5 мкг)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ пента)
Menjugate™	2, 3, та 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ гекса)

Імуногенність: Вимірювання титрів/концентрацій антитіл проти кожного вакцинного антигену:

Перед введенням першої дози (Місяць 0) та приблизно через один місяць після введення третьої дози (Місяць 3) в усіх осіб на: SBA-MenC та SBA-MenY, анти-PSC та анти-PSY, анти-PRP, анти-T, анти-FHA, анти-PRN та анти-PT. При використанні сироваткової бактерицидної активності проти N. meningitidis серогруп C та Y (SBA-MenC та SBA-MenY граничне значення: 1:8 та 1:128); ELISA аналіз з граничним значенням: ≥0,3

мкг/мл та ≥2 мкг/мл для антитіл проти полісахаридів N. meningitidis серогруп C та Y (анти-PSC IgG та анти-PSY IgG); ≥0,15 мкг/мл та ≥1,0 мкг/мл для Hib полісахариду полірибозилпрібітол фосфату (анти-PRP IgG); 5EL од./мл для анти-FHA, анти-PRN, анти-PT; ≥0,1 МО/мл антитіл до токсина правця (анти-TT). Тільки через місяць після введення третьої дози (Місяць 3) в усіх осіб: анти-D, анти-HBs та антитіл проти поліомієліту 1, 2 та 3. При використанні ELISA аналізів з граничними значеннями: 0,1 МО/мл для антитіл проти дифтерії (анти-D); ≥10 мМО/мл для антитіл проти

гепатиту В (анти-HBs); та граничні значення для аналізу мікронейтралізації: 1:8 для антитіл проти поліомієліту 1, 2 та 3 (анти-поліо 1, 2 та 3).

Статистичні методи:

Співвідношення серозахисту/серопозитивності та середньоеометричне значення концентрацій/(GMC/GMT) з 95 % довірчими інтервалами (95 % ДІ) розраховували на групу, для SBA-MenC, анти-PSC, SBA-MenY, анти-PSY, анти-PRP, антитіл проти правця, анти-PT, анти-FHA та анти-PRN за один місяць до вакцинації і через один місяць після вакцинації; для антитіл проти дифтерії, анти-HBs, антитіл проти поліомієліту 1, антитіл проти поліомієліту 2 та антитіл проти поліомієліту 3 через місяць після вакцинації. Відповіді на вакцини (виникнення антитіл в осіб, які раніше були серонегативними або, принаймні, підтримання концентрацій антитіл в осіб, які раніше були серопозитивними) з 95 % ДІ для анти-PT, анти-PRN та анти-FHA також обчислювали через один місяць після вакцинації. Зворотні криві розподілу для кожного антитіла через 3 місяці також представляли. Відмінність між Hib-MenCY та Hib-MenC групами, у порівнянні з Menjugate™ контрольною групою оцінювали пошуковим чином для кожного антитіла, за винятком SBA-MenY та анти-PSY, у значеннях (1) різ-

ниці між Menjugate™ групою (мінус) Hib-MenCY та Hib-MenC групами для одержання процентного значення кількості осіб, які мали значення, більші за вказані граничні значення або відповіді на вакцину, з їх стандартизованими 95 % ДІ, (2) GMC або GMT співвідношення Menjugate™ групи та Hib-MenCY та Hib-MenC груп з їх 95 % ДІ. Подібне порівняння проводили для оцінки відмінності між кожною парою Hib-MenCY композицій для анти-PRP, SBA-MenC, анти-PSC, SBA-MenY, анти-PSY та анти-TT антитіл.

Загальну кількість випадків місцевих та загальних симптомів та симптомів, які надаються на вимогу, підраховували для групи згідно з типом симптому, їх інтенсивністю та зв'язком з вакцинацією (як процент осіб, що повідомили загальні, місцеві та будь-які симптоми, які надаються на вимогу, протягом 8 днів після вакцинації та їх точний 95 % ДІ). Кількість випадків симптомів, які надавалися на вимогу, підраховували на групу. Для симптомів типу 3 забезпечувалися початок виникнення ≤48 годин, медичний догляд, тривалість, зв'язок з вакцинацією та вихід. Серйозні побічні наслідки були повністю описані.

Співвідношення серозахист/серопозитивність та GMC/T (ATP група для імуногенності)

Таблиця 7a

Анти-PRP (мкг/мл)

Група	N	%≥0,15	НГ	ВГ	≥1	НГ	ВГ	GMC	НГ	ВГ
Hib MenCY 2,5/5/5	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,01	7,25	11,21
HibMenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	98,5	92,0	100,0	9,4	7,72	11,65
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	98,6	92,3	100,0	8,08	6,53	9,98
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	98,6	92,7	100,0	10,44	8,49	12,83
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	80,3	69,1	88,8	2,60	1,97	3,43

Таблиця 7b

SBA -MenC (титр)

Група	N	%≥1:8	НГ	ВГ	≥1:128	НГ	ВГ	GMC	НГ	ВГ
Hib MenCY 2,5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	95,7	88,0	99,1	1005,8	773,5	1308,0
HibMenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	94,0	85,4	98,3	1029,8	799,7	1326,0
Hib MenCY 5/5/5	71	100,0	94,9	100,0	94,4	86,2	98,4	906,9	691,3	1189,8
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	95,9	88,6	99,2	871,0	677,3	1120,0
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	3557,6	2978,8	4248,8

Таблиця 7c

Анти-PSC (мкг/мл)

Група	N	%≥ 0,3	НГ	ВГ	≥2	НГ	ВГ	GMC	НГ	ВГ
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	21,70	18,36	25,65
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	27,26	23,26	31,95
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	19,02	16,49	21,93
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	100,0	95,1	100,0	21,08	18,24	24,35
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	38,49	33,64	44,05

Таблиця 7d

## SBA-MenY(титр)

Група	N	% $\geq 1:8$	НГ	ВГ	$\geq 1:128$	НГ	ВГ	GMC	НГ	ВГ
Hib MenCY 2,5/5/5	69	97,1	89,9	99,6	92,8	83,9	97,6	470,7	351,1	631,2
Hib MenCY 5/10/10	66	97,0	89,5	99,6	86,4	75,7	93,6	437,1	322,0	593,4,8
Hib MenCY 5/5/5	71	98,6	92,4	100,0	95,8	88,1	99,1	635,3	501,5	804,8
Hib MenC	74	21,6	12,9	32,7	13,5	6,7	23,5	9,3	6,3	13,7
Menjugate™	71	19,7	11,2	30,9	9,9	4,1	19,3	7,5	5,4	10,4

Таблиця 7e

## Анти-PSY(мкг/мл)

Група	N	% $\geq 0,3$	НГ	ВГ	$\geq 2$	НГ	ВГ	GMC	НГ	ВГ
Hib MenCY 2,5/5/5	69	100,0	94,8	100,0	100,0	94,8	100,0	26,86	22,86	31,56
Hib MenCY 5/10/10	66	100,0	94,6	100,0	100,0	94,6	100,0	37,02	31,84	43,04
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	100,0	94,9	100,0	23,57	19,94	27,86
Hib MenC	74	8,1	3,0	16,8	4,1	0,8	11,4	0,19	0,15	0,25
Menjugate™	71	5,6	1,6	13,8	1,4	0,0	7,6	0,17	0,15	0,19

Таблиця 7f

## Антиправцеві антитіла (МО/мл)

Група	N	% $\geq 0,1$	нг	ВГ	GMC	НГ	ВГ
Hib MenCY 2,5/5/5	68	100,0	94,7	100,0	3,06	2,63	3,55
Hib MenCY 5/10/10	67	100,0	94,6	100,0	3,25	2,88	3,68
Hib MenCY 5/5/5	70	100,0	94,9	100,0	2,97	2,59	3,41
Hib MenC	74	100,0	95,1	100,0	3,15	2,73	3,64
Menjugate™	71	100,0	94,9	100,0	1,66	1,39	1,97

Група Hib-MenCY 2,5/5/5: Hib-MenCY (2,5/5/5) + Infanrix™ пента

Група Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + Infanrix™ пента

Група Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + Infanrix™ пента

Група Hib-MenC: Hib-Men (5/5) + Infanrix™ гекса

Група Menjugate: Menjugate™ + Infanrix™ пента

N = кількість осіб з прийнятними результатами. % = процент осіб з концентрацією/титром у межах вказаного інтервалу

GMC/Т: середньгеометричне значення концентрації/титру, 95 % ДІ = 95 % довірчий інтервал; НГ = нижня границя; ВГ = верхня границя

## Висновок

MenC та Y полісахаридні кон'югати забезпечували одержання хорошої імунної відповіді в усіх осіб з 100 % осіб, які давали значення, яке є більшим за 0,3 мкг/мл у відповідь на MenC та MenY.

Приклад 6 - Фаза II клінічне дослідження, що порівнює три композиції MenACWY-TT з Meningites MenC-CRM197 кон'югатною вакциною на основі олігосахариду.

Цей приклад демонструє фазу II відкритого (частково сліпого), рандомізованого дослідження з контрольованим інтервалом дози для оцінки

імуногенності трьох різних композицій кон'югатної вакцини (MenACWY-TT) GlaxoSmithKline Biological's на основі менингококових серогруп A, C, W-135, Y та токсодя правця у порівнянні з кон'югатною вакциною MenC олігосахарид-CPM197 (Meningites™), які вводилися у вигляді однієї дози дітям у віці 12-14 місяців.

Клінічне дослідження було відкритим (частково подвійно сліпим\*), контрольованим, мультицентричним дослідженням, в якому прийнятних осіб у віці 12-14 місяців піддавали рандомізованому розподілу (1:1:1:1) до однієї з чотирьох паралельних груп, що склалися з 50 осіб для одержання однієї первинної дози при першому візиті так, як описано нижче:

Форма 1Т: MenACWY-TT при дозі 2,5 мкг MenA полісахариду, кон'югованого з токсодом правця (ТТ), 2,5 мкг MenC полісахариду, кон'югованого з ТТ, 2,5 мкг MenW полісахариду, кон'югованого з ТТ та 2,5 мкг MenY полісахариду, кон'югованого з ТТ.

Форма 2Т: MenACWY-TT при дозі 5 мкг MenA полісахариду, кон'югованого з ТТ, 5 мкг MenC полісахариду, кон'югованого з ТТ, 5 мкг MenW полісахариду, кон'югованого з ТТ та 5 мкг MenY полісахариду, кон'югованого з ТТ.

Форма 3Т: MenACWY-TT при дозі 2,5 мкг MenA полісахариду, кон'югованого з ТТ, 10 мкг MenC полісахариду, кон'югованого з ТТ, 2,5 мкг

MenW полісахариду, кон'югованого з TT та 2,5 мкг MenY полісахариду, кон'югованого з TT.

Контроль Т: 10 мкг MenC олігосахариду, кон'югованого з 12,5-25 мкг CRM197 (Meningitec).

\*Три різні композиції MenACWY-TT вводили у подвійному сліпому способі.

Режим вакцинації/сайт: Одну вакцинну дозу вводили внутрішньом'язово у лівий дельтовидний м'яз при візиті 1 (Дослідження місяць 0) згідно з рандомізованим розподілом. Усі кандидатні вакцини забезпечувалися у вигляді ліофілізованих гранул у пробірці для монодоз (0,5 мл після відновлення за допомогою розріджувача на основі фізіологічного розчину).

Імуногенність: Вимірювання титрів/концентрацій антитіл проти менінгококових вакцинних антигенних компонентів у зразках крові, одержаної перед дослідженням введення вакцинної дози (Місяць 0) та приблизно через місяць після введення вакцинної дози (Місяць 1) в усіх осіб. Визначення титрів бактерицидних антитіл

проти *N. meningitidis* серогруп A, C, W-135 та Y (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW та SBA-MenY) за допомогою бактерицидного аналізу (граничні значення аналізу: розведення 1:8 та 1:128) та вимірювання за допомогою ELISA анти-тіл проти *N. meningitidis* серогруп A, C, W-135 та Y (анти-PSA, анти-PSC, анти-PSW та анти-PSY, граничні значення аналізу  $\geq 0,3$  мкг/мл та  $\geq 2$  мкг/мл), токсойда правця (антитіла проти токсойда правця, граничне значення аналізу 0,1 МО/мл).

#### Результати

Антитілогенез у значеннях проценту респондерів по SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW та SBA-MenY через один місяць після вакцинації (первинна кінцева точка) показане у Таблиці 8. Відповідь визначали як більш високу або рівну 4-кратному підвищенню для серопозитивних осіб або сероконверсію для серонегативних осіб до вакцинації.

Таблиця 8

Відповіді на введення вакцини для SBA антитіла через один місяць після вакцинації

Антитіло	Група	N	%	ВГ	НГ
SBA-MenA	Композиція 1Т	42	61,9	45,6	76,4
	Композиція 2Т	39	82,1	66,5	92,5
	Композиція 3Т	40	62,5	45,8	77,3
	Meningitec™	36	11,1	3,1	26,1
SBA-MenC	Композиція 1Т	46	97,8	88,5	99,9
	Композиція 2Т	43	100,0	91,8	100,0
	Композиція 3Т	44	95,5	84,5	99,4
	Meningitec™	49	91,8	80,4	97,7
SBA-MenW	Композиція 1Т	45	100,0	92,1	100,0
	Композиція 2Т	43	97,7	87,7	99,9
	Композиція 3Т	45	100,0	92,1	100,0
	Meningitec™	46	15,2	6,3	28,9
SBA-MenY	Композиція 1Т	47	97,9	88,7	99,9
	Композиція 2Т	44	88,6	75,4	96,2
	Композиція 3Т	45	93,3	81,7	98,6
	Meningitec™	49	4,1	0,5	14,0

Таблиця 9 показує кількість осіб, які досягали титрів SBA, що перевищують граничні точки 1:8 та 1:128, а також GMT.

Таблиця 9

Значення серопозитивності та GMT SBA антитіл через один місяць після вакцинації

	Група	N	%	$\geq 1:8$ НГ	ВГ	%	$\geq 1:128$ НГ	ВГ	GMT
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SBA-MenA	Композиція 1Т	46	100	92,3	100	100	92,3	100	1457,3
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	97,8	88,2	99,9	1776,9
	Композиція 3Т	48	97,9	88,9	99,9	97,9	88,9	99,9	1339,5
	Meningitec™	41	51,2	35,1	67,1	43,9	28,5	60,3	42,8
SBA-MenC	Композиція 1Т	47	97,9	88,7	99,9	78,7	64,3	89,3	281,3
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	84,4	70,5	93,5	428,6
	Композиція 3Т	47	95,7	85,5	99,5	85,1	71,7	93,8	478,4
	Meningitec™	50	94,0	83,5	98,7	62,0	47,2	75,3	200,1

Продовження таблиці 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SBA-MenW	Композиція 1Т	47	100	92,5	100	100	92,5	100	2529,1
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2501,6
	Композиція 3Т	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2300,2
	Meningitec™	48	27,1	15,3	41,8	6,3	1,3	17,2	9,4
SBA-MenY	Композиція 1Т	47	100	92,5	100	100	92,5	100	1987,4
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	100	92,1	100	2464,8
	Композиція 3Т	48	100	92,6	100	97,9	88,9	99,9	2033,7
	Meningitec™	49	49,0	34,4	63,7	28,6	16,6	43,3	25,0

Вакцинація за допомогою усіх трьох композицій ACWY-TT полісахаридного кон'югату приводила до одержання хороших відповідей SBA проти MenA, MenC, MenW та MenY з 95-100 % осіб, які мали титри, вищі, ніж 1:8. Зокрема, 5/5/5/5 та 2,5/10/2,5/2,5 композиції полісахаридних кон'юга-

тів забезпечували одержання більш високої відповіді на MenC, ніж олігосахаридна вакцина Meningitic™, як видно з більш високого співвідношення осіб, які мали титри, вищі за 1:128 та GMT результати.

Таблиця 10

Коефіцієнти серопозитивності та GMC для антитіл проти полісахариду через один місяць після вакцинації

	Група	N	%	≥0,3 мкг/мл НГ	ВГ	%	≥2 мкг/мл НГ	ВГ	GMC мкг/мл
Анти-MenA	Композиція 1Т	47	93,6	82,5	98,7	68,1	52,9	80,9	2,35
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	64,4	48,8	78,1	3,11
	Композиція 3Т	48	95,8	85,7	99,5	37,5	24,0	52,6	1,65
	Meningitec™	50	10,0	3,3	21,8	2,0	0,1	10,6	0,18
Анти-MenC	Композиція 1Т	47	100	92,5	100	100	92,5	100	9,57
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,53
	Композиція 3Т	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	19,29
	Meningitec™	49	98,0	89,1	99,9	93,9	83,1	98,7	7,95
Анти-MenW	Композиція 1Т	47	100	92,5	100	80,9	66,7	90,9	4,56
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	93,3	81,7	98,6	6,83
	Композиція 3Т	48	93,8	82,8	98,7	72,9	58,2	84,7	2,88
	Meningitec™	50	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	7,1	0,15
Анти-MenY	Композиція 1Т	47	100	92,5	100	97,9	88,7	99,9	8,90
	Композиція 2Т	45	100	92,1	100	100	92,1	100	12,78
	Композиція 3Т	47	97,9	88,7	99,9	87,2	74,3	95,2	5,67
	Meningitec™	50	2,0	0,1	10,6	0,0	0,0	7,1	0,15

Усі три композиції ACWY-TT полісахаридної кон'югатної вакцини забезпечували одержання хорошої імунної відповіді на MenA, MenC, MenW та MenY з 93 % -100 % осіб, які досягали титрів, більших за 0,3 мкг/мл. Більш високі результати GMC досягалися при використанні 5/5/5/5 та 2,5/10/2,5/2,5 композицій ACWY-TT полісахаридної кон'югатної вакцини у порівнянні з Meningitec™.

Приклад 7 - порівняння імуногенності нативного та класифікованих за розмірами MenY полісахаридних кон'югатів

Миші (самки DBA/2 у віці 6-8 тижнів) одержували дві ін'єкції PSY-TT, що вводився підшкірно з інтервалом 2 тижні. Зразки крові збирали через 14 днів після другої ін'єкції для того, щоб провести анти-PSY ELISA та аналіз SBA при використанні штаму S1975 menY. Під час ін'єкції миші отримували 1 мкг PSY-TT (ліофілізована неадсорбована композиція).

Використовували кон'югати, описані у Таблиці 11.

Таблиця 11

Кон'югати	ENYTT012	ENYTT014	ENYTT015bis
PSY мікропсевдо-зрідження	Ні	Так (40 циклів)	Так (20 циклів)
TT/PS співвідношення	1/1	1/1	1/1

## Результати

Результати (Фігура 1) показують тенденцію до більш високої імуногенності для кон'югатів, одержаних при використанні PSY зі зменшеними розмірами. Фігура 1А показує результати GMC, одержані в аналізі ELISA для антисироватки, яка одержана проти кон'югатів, приготовлених з нативного MenY (ENYTT012), мікропсевдозрідженого MenY - 40 циклів (ENYTT014) та мікропсевдозрідженого MenY - 20 циклів (ENYTT015 bis). Більш високі значення GMC одержували тоді, коли MenY-TT готували з мікропсевдозрідженого MenY.

Подібні результати одержували, коли антисироватку піддавали аналізу за допомогою SBA (Фігура 1В). І знову більш високі значення GMT досягалися при використанні кон'югатів, приготовлених з мікропсевдозрідженого MenY.

Приклад 8 - Клінічне дослідження для оцінки ефекту лінкера в MenA у MenACWY кон'югатній вакцині

Одиничну дозу різних композицій вакцини MenACWY вводили підліткам у віці 15-19 років у 5 групах, які склалися з 25 осіб, випадковим чином розподілених 1:1:1:1:1 для дослідів. Досліджувані композиції були наступними:

F1 - MenACWY, кон'юговані до токсойда правця за допомогою MenA кон'югату, що містить АН спейсер - 5/5/5/5 мкг

F2 - MenACWY, кон'юговані до токсойда правця за допомогою MenA кон'югату, що містить АН спейсер - 2,5/5/2,5/2,5 мкг

F3 - MenACWY, кон'юговані до токсойда правця за допомогою MenA кон'югату, що містить АН спейсер - 5/5/2,5/2,5 мкг

F4 - MenACWY, кон'юговані до токсойда правця без спейсера у будь-якому кон'югаті- 5/5/5/5 мкг

Контрольна група - Mencevax™ ACWY

Через 30 днів після інокуляції у пацієнтів брали зразки крові.

Зразки крові використовували для оцінки проценту SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 та SBA-MenY респондерів через один місяць після введення вакцинної дози. Відповідь на вакцину визначали як 1) для осіб, які були спочатку серонегативними - титр антитіл після вакцинації  $\geq 1/32$  через один місяць або 2) для осіб, які були спочатку серопозитивними - підвищення титру антитіл  $\geq 4$  рази у порівнянні з титром антитіл до вакцинації.

## Результати

Як показано у Таблиці 13, застосування спейсера у MenA кон'югаті приводить до підвищення імунної відповіді на MenA. Процент респондерів підвищувався з 66 % до 90-95 %, коли додавали АН спейсер. Це відображалося на підвищенні SBA GMT з 4335 до 10000 та у підвищенні GMC з 5 до 20-40. Несподівано виявилось, що АН спейсер також приводить до підвищення імунної відповіді на MenC, як видно зі збільшення проценту респондерів та з підвищення SBA GMT. Підвищення може також спостерігатися у значеннях SBA-GMT проти MenY (6742-7122) та проти MenW (4621-5418), коли вводили спейсер.

Таблиця 12

Композиція	% SBA MenA респондерів	SBA-MenA GMT	Анти-PSA GMC мкг/мл ELISA
F 1 5AH/5/5/5	90,9	9805	20,38
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	75	8517	29,5
F3 5AH/5/2,5/2,5	95,5	10290	47,83
F4 5/5/5/5	66,7	4335	5,46
Mencevax™	85,7	8022	27,39
Композиція	% SBA MenC респондерів	SBA-MenC GMT	Анти-PSC GMC мкг/мл ELISA
F 1 5AH/5/5/5	69,6	3989	12,11
F2 2,5AH/5/2,5/2,5	81,8	3524	12,78
F3 5AH/5/2,5/2,5	81,8	3608	8,4
F4 5/5/5/5	73,9	2391	8,84
Mencevax™	90,0	5447	38,71

Продовження таблиці 12

Композиція	% SBA MenW респондерів	SBA-MenW GMT	Анти-PSW GMC мкг/мл ELISA
F1 5АН/5/5/5	95	5418	9,65
F2 2,5АН/5/2,5/2,5	85	4469	14,55
F3 5АН/5/2,5/2,5	95,5	4257	6,39
F4 5/5/5/5	95,5	4621	10,7
Mencevax™	86,4	2714	13,57
Композиція	% SBA MenY респондерів	SBA-MenY GMT	Анти-PSY GMC мкг/мл ELISA
F1 5АН/5/5/5	91,3	7122	16,3
F2 2,5АН/5/2,5/2,5	87,5	5755	12,52
F3 5АН/5/2,5/2,5	80	5928	8,88
F4 5/5/5/5	91,3	6742	13,88
Mencevax™	91,7	4854	21,02

Приклад 9 - Клінічне дослідження для оцінки ефекту лінкера в MenA та MenC кон'югатах у MenACWY кон'югатній вакцині

Одиничну дозу різних композицій вакцини MenACWY вводили підліткам у віці 15-19 років у 5 групах, які склалися з 25 осіб, випадковим чином розподілених 1:1:1:1:1 для дослідів. Досліджувані композиції були наступними:

F1 - MenACWY, кон'юговані з токсойдом правця за допомогою MenA та MenC кон'югатів, що містять АН спейсер - 2,5/2,5/2,5/2,5 мкг

F2 - MenACWY, кон'юговані з токсойдом правця за допомогою MenA та MenC кон'югатів, що містять АН спейсер - 5/5/2,5/2,5 мкг

F3 - MenACWY, кон'юговані з токсойдом правця за допомогою MenA та MenC кон'югатів, що містять АН спейсер - 5/5/5/5 мкг

F4 - MenACWY, кон'юговані з токсойдом правця за допомогою MenA кон'югату, що містить АН спейсер - 5/5/5/5 мкг

Контрольна група - Mencevax™ ACWY

Через 30 днів після інокуляції у пацієнтів брали зразки крові.

Зразки крові використовували для оцінки проценту SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 та SBA-MenY респондерів через один місяць після введення вакцинної дози. Відповідь на вакцину визначали як 1) для осіб, які були спочатку серонегативними - титр антитіл після вакцинації  $\geq 1/32$  через один місяць або 2) для осіб, які були спочатку серопозитивними - підвищення титру антитіл  $\geq 4$  рази у порівнянні титром антитіл до вакцинації.

Результати

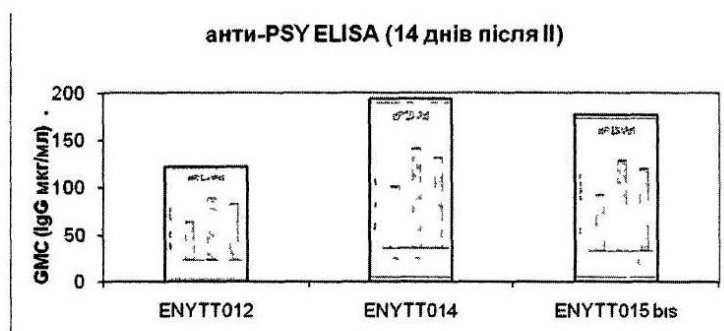
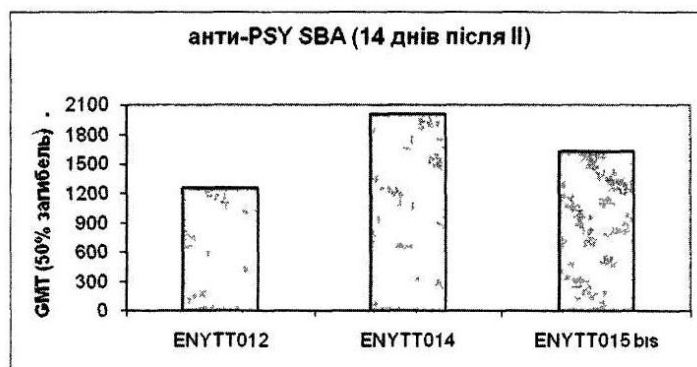
Введення АН спейсера в MenC кон'югат приводило до підвищення імунної відповіді на MenC, як показано у Таблиці 14. Це демонструється підвищенням SBA GMT з 1943 до 4329 та збільшенням рівня анти-PSW GMC з 7,65 до 13,13. Хороші імунні відповіді проти MenA, MenW та MenY підтримувалися.

Таблиця 13

Композиція	% SBA MenA респондерів	SBA-MenA GMT	Анти-PSA GMC мкг/мл ELISA
F1 2,5АН/2,5АН/2,5/2,5	75	8417	20,23
F2 5АН/5АН/2,5/2,5	72	6299	16,07
F3 5АН/5АН/5/5	87	9264	27,26
F4 5АН/5/5/5	77,3	9632	20,39
Mencevax™	78,3	8284	12,93
Композиція	% SBA MenC респондерів	SBA-MenC GMT	Анти-PSW GMC мкг/мл ELISA
F1 2,5АН/2,5АН/2,5/2,5	88	3619	12,82
F2 5АН/5АН/2,5/2,5	88	2833	13,32
F3 5АН/5АН/5/5	95,8	4329	13,13
F4 5АН/5/5/5	95,8	1943	7,65
Mencevax™	91,7	1567	16,55

Продовження таблиці 13

Композиція	% SBA MenW респондерів	SBA-MenW GMT	Анти-PSW GMC мкг/мл ELISA
F1 2,5АН/2,5АН/2,5/2,5	100	5656	7
F2 5АН/5АН/2,5/2,5	96	4679	5,4
F3 5АН/5АН/5/5	91,3	4422	4,45
F4 5АН/5/5/5	88	4947	7,67
Mencevax™	96	3486	11,93
Композиція	% SBA MenY респондерів	SBA-MenY GMT	Анти-PSY GMC мкг/мл ELISA
F1 2,5АН/2,5АН/2,5/2,5	75	3891	17,81
F2 5АН/5АН/2,5/2,5	92	3968	11,96
F3 5АН/5АН/5/5	79,2	2756	9,51
F4 5АН/5/5/5	80	3914	16,76
Mencevax™	88	3056	21,41

**A****B**

Фігура 1