



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96934 (13) C2

(51) МПК

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ДІТЕЙ МОЛОДШОГО ВІКУ

1

2

(21) a200807749

(22) 20.12.2006

(24) 26.12.2011

(86) PCT/EP2006/069979, 20.12.2006

(31) 0526232.4

0607087.4

0609902.2

0620336.8

0620337.6

0620815.1

0620816.9

PCT/GB2006/004634

0607088.2

(32) 22.12.2005

07.04.2006

18.05.2006

12.10.2006

12.10.2006

19.10.2006

19.10.2006

12.12.2006

07.04.2006

(33) GB

GB

GB

GB

GB

GB

GB

GB

GB

GB

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) БІМАНС РАЛЬФ ЛЕОН, БЕ, ГАРСОН НАТАЛІ  
МАРІ-ДЖОЗЕФ, БЕ, ГЕРМАН ФІЛІПП ВІНСЕНТ,  
БЕ, ПОЛМАН ЯН, БЕ, ВАН МЕХЕЛЕН МАРСЕЛЛЬ  
ПОЛЕТТ, БЕ

(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.,  
БЕ

(56) LEXAU C.A. ET AL: "Changing epidemiology of  
invasive pneumococcal disease among older adults in  
the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine."  
JAMA : THE JOURNAL OF THE AMERICAN  
MEDICAL ASSOCIATION 26 OCT 2005, vol. 294, no.  
16, 26 October 2005 (2005-10-26), pages 2043-2051.  
MOORE M. R.: "Epidemiology of invasive  
pneumococcal disease in adults" INTERNET  
ARTICLE, [Online] 17 November 2005 (2005-11-17),

XP002438871 Retrieved from the Internet:  
URL: [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188s2\\_3.ppt](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188s2_3.ppt) [retrieved on 2007-06-20].

HENCKAERTS I. ET AL: "Validation of a routine  
opsonophagocytosis assay to predict invasive  
pneumococcal disease efficacy of conjugate vaccine  
in children" VACCINE, vol. 25, no. 13, March 2007  
(2007-03), pages 2518-2527.

HAUSDORFF W. P. ET AL: "Which pneumococcal  
serogroups cause the most invasive disease:  
implications for conjugate vaccine formulation and  
use, part I" CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, THE  
UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL,  
US, vol. 30, no. 1, 6 January 2000 (2000-01-06),  
pages 100-121.

BEALL B. ET AL: "Pre- and postvaccination clonal  
compositions of invasive pneumococcal serotypes for  
isolates collected in the United States in 1999, 2001,  
and 2002." JOURNAL OF CLINICAL  
MICROBIOLOGY MAR 2006, vol. 44, no. 3, March  
2006 (2006-03), pages 999-1017.

PRYMULA R. ET AL: "Pneumococcal capsular  
polysaccharides conjugated to protein D for  
prevention of acute otitis media caused by both  
Streptococcus pneumoniae and non-typable  
Haemophilus influenzae: a randomised double-blind  
efficacy study" LANCET THE, LANCET LIMITED.  
LONDON, GB, vol. 367, no. 9512, 4 March 2006  
(2006-03-04), pages 740-748.

US 2003099672 A1, 29.05.2003.

WO 0200249 A, 03.01.2002.

WO 0056360 A, 28.09.2000.

WO 03051392 A, 26.06.2003.

(57) 1. Імуногенна композиція для дітей молодшого  
віку, яка включає мультивалентну вакцину  
Streptococcus pneumoniae, що містить 2 або біль-  
ше (наприклад, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) кап-  
сулярних сахаридних кон'югатів з різних серотипів,  
де композиція включає серотип 22F сахаридного  
кон'югату для застосування у лікуванні або запобі-  
ганні захворюванням, спричиненим Streptococcus  
pneumoniae, де захворювання являє собою менін-  
гіт, бактеріємію, пневмонію та/або кон'юнктивіт у  
дітей молодшого віку.

2. Імуногенна композиція за п. 1, яка додатково  
включає кон'югати капсулярних сахаридів 4, 6B,  
9V, 14, 18C та 23F S. pneumoniae.

(13) C2

(11) 96934

(19) UA

3. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1, 2, в якій 2 різні білки-носії є окремо кон'югованими принаймні з 2 різними серотипами капсулярного сахариду *S. pneumoniae*.
4. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-3, яка включає 22F капсулярний сахарид, кон'югований з білком-носієм через лінкер.
5. Імуногенна композиція за п. 4, де лінкер являє собою ADH.
6. Імуногенна композиція за п. 4 або 5, де лінкер є приєднаним до білка-носія за допомогою карбодіімідного зв'язку, переважно з використанням EDAC.
7. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 4-6, де сахарид 22F є кон'югованим з білком-носієм або з лінкером при використанні методу CDAP.
8. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-7, яка включає сахаридний кон'югат 22F, де співвідношення білка-носія та сахариду 22F знаходиться в межах від 5:1 до 1:5, від 4:1 до 1:1 або від 2:1 до 1:1 (ваг./ваг.).
9. Імуногенна композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка містить 22F сахаридний кон'югат,

де середній розмір ( $M_w$ ) сахариду 22F складає більше 100 кДа.

10. Імуногенна композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково включає один або більше некон'югованих або кон'югованих білків *S. pneumoniae*.

11. Імуногенна композиція за п. 10, яка містить згаданий один або більше білків *S. pneumoniae*, вибраних із родини поліглістидинової триади (PhtX), родини холінзв'язувальних білків (CbpX), вкорочених версій CbpX, родини LytX, вкорочених версій LytX, химерних білків вкорочений CbpX - вкорочений LytX, детоксикованого пневмолізіну (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 та Sp133.

12. Імуногенна композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка додатково включає ад'ювант.

13. Вакцина, яка включає імуногенну композицію за будь-яким з пп. 1-12 та фармацевтично прийнятний наповнювач.

14. Спосіб приготування вакцини за п. 13, що включає етап змішування імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-12 з фармацевтично прийнятним наповнювачем.

#### Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до вдосконаленої вакцини проти Стрептококової пневмонії (*Streptococcus pneumoniae*).

#### Обґрунтування винаходу

Діти віком молодше 2 років не мають закріпленого імунного відгуку до більшості полісахаридних вакцин, таким чином необхідно компенсувати полісахариди алергенні (антигенні) хімічною кон'югацією до протеїнових носіїв. Поєднання полісахариду, Т-незалежного антигену, з протеїном, Т-залежний антиген, надає полісахариду властивості Т залежності, включаючи ізотип комутації, розвиток афінності та індукціювання пам'яті.

Однак, можуть існувати результати з повторним використанням полісахарид-протеїнових кон'югатів або поєднанням полісахарид-протеїнових кон'югатів для утворення мультивалентної вакцини. Наприклад, повідомлялось, що *Haemophilus influenzae* типу b полісахаридну (PRP) вакцину, використовуючи анатоксин правцю (TT) як протеїн носій, тестували в діапазоні доз з одночасною імунізацією з (без) TT та кон'югатом пневмококовий полісахарид - TT вакциною наступною стандартною дитячою програмою. Зі зростанням дози пневмококової вакцини імунний відгук до PRP полісахаридної долі Hib кон'югату вакцини зменшувався, показуючи імунний вплив полісахариду, можливо через використання такого ж носія протеїну (Dagan et al., Infect Immun. (1998); 66: 2093-2098).

Також доведено, щоб багаторазово покращити, ефект дози носія-протеїну на гуморальний відгук до самого протеїну. Повідомлялось, що у дітей людини зростання дози чотирихвалентного кон'югату анатоксину правцю в результаті призводить до зниження відгуку на носій правцю (Dagan et al. supra). Класичний аналіз цих ефектів поєднання вакцин був описаний як носій викликаний епітоп-

ним пригніченням, яке повністю не зрозуміле, але вважався результатом надлишкової кількості носію-протеїну (Fattom, Vaccine 17: 126 (1999)). Це виникає в результаті конкуренції для Th-клітин, В-клітинами до носію-протеїну, та В-клітин до полісахариду. Якщо В-клітини до носію-протеїну домінують, то не існує достатньо Th-клітин здатних надавати необхідну допомогу В-клітинам специфічним до полісахариду. Однак, імунологічні ефекти, що спостерігаються, несумісні з загальною кількістю носіїв протеїнів в деякій окремих прикладах зростання імунного відгуку, та в інших випадках зниження імунного відгуку.

Тому, залишаються технічні труднощі в поєднанні полісахаридних кон'югатів зі складною структурою в одинарні ефективні формулювання вакцини.

*Streptococcus pneumoniae* - це Грам-позитивні бактерії, що відповідають за значну хворобливість та смертність (особливо в юному та похилому віці), спричинену інвазивними захворюваннями, такими як пневмонія, бактеріємія та менінгіт, та захворюваннями, пов'язаними з іннідацією, такими як гострий середній отит. Ступінь пневмококової пневмонії в США серед людей віком старше 60 років складає від 3 до 8 на 100000. В 20% випадків це призводить до бактеріємії та інших проявів, таких як менінгіт з долею смертельних завершень до 30% навіть при лікуванні антибіотиками.

Пневмокок інкапсульований з хімічно зв'язаним полісахаридом, який надає серотипу специфічності. Існує 90 відомих серотипів пневмококів, а капсула - це принципова вірулентність детермінована для пневмококів, так як капсула не тільки захищає внутрішню поверхню бактерії від комплексу, але й сама є трохи імуногенною. Полісахариди - це Т-незалежні антигени і не можуть приймати участь в процесі чи бути присутні-

ми на МНС (головний комплекс гістосумісності) молекулах, що взаємодіють з Т-клітинами. Однак, вони можуть стимулювати імунну систему за альтернативним механізмом, який включає перехресне зв'язування рецепторів поверхні на В-клітинах.

В декількох експериментах показано, що при захисті проти інвазивних пневмококів хвороба найбільш строго корелює з антитілами специфічними для капсули й захист є серотипно специфічним.

*Streptococcus pneumoniae* - це найбільш загальний випадок інвазивної бактеріальної хвороби та середнього отиту у немовлят та молодших дітей. Більш того, у людей похилого віку встановлюється слабкі відгуки на пневмококову вакцину [Roghmann et al., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], тому спостерігається зростання випадків бактеріальної пневмонії в цій верстві населення [Verghese and Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

Основні клінічні синдроми, що мали місце при *S. Pneumoniae*, широко визнані та обговорювалися в усіх стандартних медичних підручниках (Fedson DS, Muscher DM. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4th edition. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588). Наприклад, інвазивне пневмококове захворювання (IPD) визначається як будь-яка інфекція, в якій *S. Pneumoniae* ізолюється від крові чи іншого стерильного місця (Musher DM *Streptococcus pneumoniae*. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious disease (5<sup>th</sup> ed). New York, Churchill Livingstone, 2001, p. 2128-2147). Хронічне обструктивне пульмонологічне захворювання (COPD) визначається як охоплює декілька умов (обструкція потоку повітря, хронічні бронхіти, бронхіоліти чи захворювання малих дихальних шляхів та емфізема), що часто співіснують. Пацієнти страждають від загострення їх стану, що зазвичай супроводжується порушенням дихання й часто наростає кашель, що може виробляти слиз чи гнійне мокротиння (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). COPD визначається наявністю фізіологічно необоротної або частково оборотної обструкції дихальних шляхів у пацієнтів з хронічним бронхітом чи емфіземою (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov; 152(5 Pt 2):S77-121). Загострення COPD часто відбувається через бактеріальну (таку як пневмококову) інфекцію (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr; 14(2):336-63).

Таким чином, об'єктом даного винаходу є розробка покращеного формулювання складного серотипу *Streptococcus pneumoniae* полісахарид кон'югованої вакцини.

Короткі підписи до Рисунків.

Фігура 1 Гістограма, що показує імуногенність 11 валентних кон'югатів у Rhesus мавп похилого віку. Світліший стовпчик представляє GMC після двох щеплень з 11 валентним кон'югатом в алюміній фосфатному ад'юванті. Темніший стовпчик представляє GMC після двох щеплень з 11 валентним кон'югатом в ад'юванті С.

Фігура 2 Гістограма, що показує пам'ять В-клітин для PS3 після щеплення з 11 валентним кон'югатом з ад'ювантом С або з алюміній фосфатним ад'ювантом.

Фігура 3 Гістограма, що показує анти полісахаридну 19F імуногенність в Balb/C мишах для 4 валентних простих полісахаридів та 4 валентних dPly кон'югатів.

Фігура 4 Гістограма, що показує анти полісахаридну 22F імуногенність в Balb/C мишах для 4 валентних чистих полісахаридів та 4 валентних PhtD кон'югатів.

Фігура 5 Гістограма, що показує анти-22F IgG відгук у мишей Balb/c.

Фігура 6 Гістограма, що показує анти-22P опсонофагоцитозні титри у мишей Balb/c.

Фігура 7 Гістограма, що порівнює IgG відгук, індукований в молодих C57B1 мишах після імунізації вакциною 13 валентного кон'югату, формульованою різними ад'ювантами.

Фігура 8 Гістограма, що показує захисну ефективність різних комбінацій вакцин в моделі пневмонії у мавп.

Фігура 9 Гістограма, що показує анти PhtD IgG відгук в Balb/C мишах після імунізації 22F-PhtD або 22F-AH-PhtD кон'югатами.

Фігура 10 Захист проти пневмококового зараження 4 типу у мишей після імунізації 22F-PhtD або 22F-AH-PhtD.

Опис винаходу

Даний винахід обумовлює імуногенну композицію для немовлят (дітей до 7 років), що включає мультивалентну *Streptococcus pneumoniae* вакцину, що містить 2 або більше (наприклад, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) капсульних сахарид кон'югатів від різних серотипів, де композиція включає 22F сахарид кон'югат.

Хоча дитячі інфекції пневмококового серотипу 22F не є дуже загальними, заявники вважають, що присутність 22F в пневмококовій вакцині для дітей буде корисною в виробленні групового імунітету в верстві населення так, що напад серйозного більш раннього захворювання викликаного цим серотипом (таким як пневмонія та/або інвазивне пневмококове захворювання (IPD) та/або загострення хронічного обструктивного пульмонального захворювання (COPD)) може бути попередженим або послабленим в тяжкості. В цілях даного винаходу, «імунізація сукупності людей проти загострення COPD» чи «лікування або попередження загострення COPD» чи «послаблення в тяжкості перебігу загострень COPD» стосується зниження випадків чи ступеню загострень COPD (наприклад, зниження в ступені 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20% чи більше) чи полегшення в тяжкості загострень COPD, як визначено вище, наприклад, в групі пацієнтів, імунізованих композиціями або вакцинами винаходу.

Таким чином, в одному втіленні метод попередження людей похилого віку, від надбання пневмококового захворювання, викликаного *Streptococcus pneumoniae* серотипом 22F інфекції (чи полегшення тяжкості його перебігу) обумовлюється вмістом введення групі дітей віком до 7 років (або верстві дітей віком до 7 років) імунозахисної дози імуногенної композиції чи вакцини винаходу.

Використання імуногенної композиції чи вакцини винаходу в виробництві медикаментів для попередження чи полегшення перебігу захворювання, викликаного серотипом 22F *Streptococcus pneumoniae* інфекції, у пацієнтів похилого віку, де імунозахисна доза композиції чи вакцини вводиться дитині віком до 7 років (чи верстві дітей віком до 7 років).

Втілення імуногенної композиції включає *Streptococcus pneumoniae* капсульовані сахарид кон'югати від серотипів 19A та 19F, необов'язково де 19A кон'югована до першого бактеріального анатоксину, а 19F кон'югована до другого бактеріального анатоксину.

Термін капсульований сахарид включає капсульовані полісахариди та олігосахариди виведені з капсульованого полісахариду. Олігосахарид містить щонайменше 4 цукрових залишки.

Термін бактеріальний анатоксин включає бактеріальні токсини, які інактивовані або генетичною мутацією, або хімічною обробкою, або кон'югацією. Придатні бактеріальні анатоксини включають анатоксин правця, анатоксин дифтерії, анатоксин кашлюку, бактеріальні цитолізину чи пневмолізину. Були описані мутації пневмолізіну (Ply), які зменшують токсичність пневмолізіну (WO 90/06951, WO 99/03884). Також відомі генетичні мутації токсину дифтерії, які зменшують його токсичність (дивись нижче). Генетично детоксоковані аналоги токсину дифтерії включають CRM197 та інші мутанти описані в US 4,709,017, US 5,843,711, US 5,601,827 та US 5,917,017. CRM197 - це нетоксична форма токсину дифтерії, але є імунологічно еквівалентною токсину дифтерії. CRM197 виробляється *C. diphtheriae*, що інфікована нетоксигенною фазою  $\beta$ 197токс-викликаного мутагенезисом нітрозоганідину карінефара b (Uchida et al. Nature New Biology (1971) 233; 8-11). CRM197 протеїн має таку ж саму молекулярну масу, що й токсин дифтерії але відрізняється від неї однією основною варіацією в структурному гені. Це призводить до гліцин глютамінової варіації амінокислоти в положенні 52, що робить фрагмент А нездатний до зв'язування NAD а значить до не токсичності (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983 p. 560-564).

Перший та другий бактеріальні анатоксини можуть бути однаковими або різними. У випадку, коли перший та другий бактеріальні анатоксини є різними, це означає, що вони мають різну амінокислотну послідовність.

Наприклад, 19A та 19F можуть бути кон'югованими до анатоксину правця та анатоксину дифтерії; анатоксину дифтерії та анатоксину дифтерії; Crm197 та CRM197, пневмолізіну та пневмолізіну, анатоксину правця та анатоксину дифтерії; анатоксину правця та CRM197; анатоксину правця та пневмолізіну; анатоксину дифтерії та анатоксину правця; анатоксину дифтерії та CRM197; анатоксину дифтерії та пневмолізіну; CRM197 та анатоксину правця; CRM197 та анатоксину дифтерії; CRM197 та пневмолізіну; пневмолізіну та анатоксину правця; пневмолізіну та анатоксину

дифтерії; або пневмолізіну та CRM197, відповідно.

У втіленні, в додатку до *S. pneumoniae* сахарид кон'югату 22F (та необов'язково 19A та 19F), імуногенна композиція надалі містить кон'югати *S. pneumoniae* капсульованих сахаридів 4, 6B, 9V, 14, 18C та 23F.

У втіленні, в додатку до *S. pneumoniae* сахарид кон'югату 22F (та необов'язково 19A та 19F), імуногенна композиція надалі містить кон'югати *S. pneumoniae* капсульованих сахаридів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C та 23F.

У втіленні, в додатку до *S. pneumoniae* сахарид кон'югату 22F (та необов'язково 19A та 19F), імуногенна композиція надалі містить кон'югати *S. pneumoniae* капсульованих сахаридів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F та 23F.

У втіленні, в додатку до *S. pneumoniae* сахарид кон'югату 22F (та необов'язково 19A та 19F), імуногенна композиція надалі містить кон'югати *S. pneumoniae* капсульованих сахаридів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F та 23F.

У втіленні, в додатку до *S. pneumoniae* сахарид кон'югату 22F (та необов'язково 19A та 19F), імуногенна композиція надалі містить кон'югати *S. pneumoniae* капсульованих сахаридів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F та 23F.

Типово, *Streptococcus pneumoniae* вакцина даного винаходу буде містити капсульовані сахаридні антигени (переважно кон'юговані), де сахариди є похідними від щонайменш десяти серотипів *S. pneumoniae*. Кількість *S. pneumoniae* капсульований сахаридів може варіювати від 10 різних серотипів (або "V", валентності) до 23 різних серотипів (23V). В одному втіленні існує 10, 11, 12, 13, 14 чи 15 різних серотипів. В іншому втіленні винаходу, вакцина може містити кон'юговані *S. pneumoniae* сахариди та некон'юговані *S. pneumoniae* сахариди. Переважно загальна кількість сахаридних серотипів менша чи дорівнює 23. Наприклад, винахід може містити 10 кон'югованих серотипів та 13 некон'югованих сахаридів. В подібному способі вакцина може містити 11, 12, 13, 14 чи 16 кон'югованих сахаридів та 12, 11, 10, 9 чи 7, відповідно, некон'юговані сахариди.

В одному втіленні мультивалентна пневмокова вакцина винаходу може бути відібрана з наступних 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, хоча приймається до уваги, що один або два інших серотипи могли б бути заміщеними в залежності від віку пацієнту, що отримує вакцину та географічному розташуванні, де вакцина буде введена. Наприклад, 10-валентна вакцина може містити полісахариди від серотипів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, та 23F. 11-валентна вакцина може також включати сахариди від серотипу 3. 12 чи 13-валентна педіатрична (дитяча) вакцина може також включати 10 чи 11 валентне формулювання доповнене серотипами 6A та 19A, чи 6A та 22F, 19A та 22F, чи 6A та 15B, чи 19A та 15B, чи 22F та 15B, де 13-валентна вакцина для осіб похилого віку може включати 11 валентне формулювання доповнене серотипами 19A та 22F, чи 8 та 12F, чи 8 та 15B, чи 8 та 19A, чи 8 та 22F, чи 12F та 15B,

чи 12F та 19A, чи 12F та 22F, чи 15B та 19A, чи 15B та 22F. 14-валентна педіатрична вакцина може включати 10 валентне формулювання, описане вище, доповнене серотипами 3, 6A, 19A та 22F, серотипами 6A, 8, 19A та 22F, серотипами 6A, 12F, 19A та 22F, серотипами 6A, 15B, 19A та 22F, серотипами 3, 8, 19A та 22F, серотипами 3, 12F, 19A та 22F, серотипами 3, 15B, 19A та 22F, серотипами 3, 6A, 8 та 22F, серотипами 3, 6A, 12F та 22F, серотипами 3, 6A, 15B та 22F.

Композиція в одному втіленні включає капсульовані сахариди похідні від серотипів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F (переважно кон'югованих). В подальшому втіленні винаходу включено щонайменш 11 сахаридних антигенів (переважно кон'югованих), наприклад, капсульовані сахариди похідні від серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F. В подальшому втіленні винаходу включено щонайменш 12 або 13 сахаридних антигенів, наприклад, вакцина може містити капсульовані сахариди похідні від серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F та 23F, хоча надалі сахаридні антигени, наприклад 23-валентні (такі як 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 розглядаються винаходом.

Вакцина даного винаходу може містити протеїн D (PD) з *Haemophilus influenzae* (дивись також EP 0594610). *Haemophilus influenzae* є ключовим хвороботворним організмом середнього отиту, й даний винахід показав, що, включаючи цей протеїн в *Streptococcus pneumoniae*, вакцина буде забезпечувати рівень захисту проти *Haemophilus influenzae* пов'язаний з середнім отитом (посилання на РОЕТ публікацію). В одному втіленні композиція вакцини містить протеїн D. В одному варіанті PD присутній як носій-протеїн для одного чи більше сахаридів. В іншому втіленні протеїн D міг би бути присутнім в композиції вакцини як вільний протеїн. В наступних втіленнях протеїн D присутній і як носій-протеїн і як вільний протеїн. Протеїн D може використовуватися як протеїн повної довжини або як фрагмент (WO 0056360). В наступних втіленнях протеїн D присутній як носій-протеїн для більшості сахаридів, наприклад, 6, 7, 8, 9 чи більше сахаридів можуть бути кон'югованими до протеїну D. В цьому втіленні протеїн D також може бути присутнім як вільний протеїн.

Вакцина даного винаходу містить один, два чи більше різних типів носіїв-протеїнів. Кожен тип носіїв-протеїнів може виступати як носій для більше ніж одного сахариду, де сахариди можуть бути однаковими або різними. Наприклад, серотипи 3 та 4 можуть бути кон'югованими до однакових носіїв-протеїнів, або однакових молекул носіїв-протеїнів, або до різних молекул однакових носіїв-протеїнів. В одному втіленні два або більше різних сахаридів можуть бути кон'югованими до однакових носіїв-протеїнів, або однакових молекул носіїв-протеїнів, або до різних молекул однакових носіїв-протеїнів.

Будь-які *Streptococcus pneumoniae* капсульовані сахариди, присутні в імуногенній композиції винаходу, можуть бути кон'югованими до носіїв-протеїнів незалежно відібраних з групи, що містить

TT, DT, CRM197, фрагмент C з TT, PhtD, PhtDE злиті (особливо тих, що описані в WO 01/98334 та WO 03/54007), детоксифікованого пневмолізіну та протеїну D. Більш повний список протеїнів-носіїв, що можуть використовуватись в кон'югатах винаходу, представлений нижче.

Носій-протеїн кон'югований до одного чи більше S *pneumoniae* капсульованих сахаридів в кон'югатах присутніх в імуногенних композиціях винаходу - це необов'язково член поліглістидинової тріади сімейства (Pht) протеїнів, фрагментів чи злиттів цих протеїнів. PhtA, PhtB, PhtD чи PhtE протеїни можуть мати амінокислотну послідовність, що розподіляються 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% чи 100% ідентичності з послідовністю, виявлених в WO 00/37105 чи WO 00/39299 (наприклад, з амінокислотною послідовністю 1-838 чи 21-838 SEQ ID NO: 4 WO 00/37105 для PhtD). Наприклад, злиті протеїни складаються з повної довжини або фрагментів 2, 3 або 4 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Прикладами злитих протеїнів є PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B та PhtE/D, де протеїни зв'язані з вперше згаданим в N- терміналі (дивись, наприклад, WO 01/98334).

В тих випадках коли фрагменти Pht протеїнів використовуються (окремо або як частина злитого протеїну), кожен фрагмент необов'язково містить одну або більше глістидинового(их) фрагменту(ів) тріад та/або областей подвійної спіралі таких поліпептидів. Глістидиновий фрагмент тріади - це частина поліпептиду, що має послідовність HxxHxH, де H - глістидин та x - амінокислота інша ніж глістидин. Область подвійної спіралі - це область прогнозована алгоритмом "спіралі" (Lupus, A et al. (1991) Science 252; 1162-1164). У втіленні винаходу кожен фрагмент включає один або більше глістидиновий фрагмент тріади а також щонайменш одну область подвійної спіралі. У втіленні винаходу кожен фрагмент включає саме або щонайменш 2, 3, 4 або 5 глістидинових фрагментів тріади (необов'язково з природною Pht послідовністю між 2 чи більше тріадами, або внутрішньо-тріадною послідовністю, що є більшою за 50, 60, 70, 80, 90 чи 100% ідентичною до природної пневмококової внутрішньо-тріадною Pht послідовністю - наприклад, внутрішньо-тріадна послідовність показана в SEQ ID NO: 4 з WO 00/37105 для PhtD). У втіленні винаходу кожен фрагмент включає саме або щонайменш 2, 3 або 4 області подвійної спіралі. У втіленні винаходу Pht протеїн, розкритий тут, включає протеїн повної довжини з приєднаною сигнальною послідовністю, зрілий протеїн повної довжини з відщепленим сигнальним пептидом (наприклад, 20 амінокислот на N-терміналі), природні варіанти Pht протеїну та імуногенні фрагменти Pht протеїну (наприклад, фрагменти, описані вище, або поліпептиди, що містять щонайменш 15 чи 20 суміжних амінокислот з амінокислотної послідовності описані в WO 00/37105 або WO 00/39299, де згаданий поліпептид - здатний до викликання специфічного імунного відгуку для амінокислотної послідовності згаданої в WO 00/37105 або WO 00/39299).

Зокрема термін "PhtD" як використано тут включає протеїн повної довжини з приєднаною сигнальною послідовністю, зрілий повної довжини протеїн з відщепленим сигнальним пептидом (наприклад, 20 амінокислот на N-терміналі), природні варіанти PhtD та імуногенні фрагменти PhtD (наприклад, фрагменти, описані вище, або поліпептиди, що містять щонайменш 15 чи 20 суміжних амінокислот з PhtD амінокислотної послідовності описані в WO 00/37105 або WO 00/39299, де згаданий поліпептид - здатний до викликання специфічного імунного відгуку для PhtD амінокислотної послідовності згаданої в WO 00/37105 або WO 00/39299 (наприклад SEQ ID NO: 4 з WO 00/37105 для PhtD). Якщо протеїн-носіє є однаковим для 2 чи більше сахаридів в композиції, сахариди могли б бути кон'югованими до такої ж молекули протеїну-носія (молекули носію мають 2 більш різних сахаридів, кон'югованих до неї) [дивись приклади WO 04/083251]. Альтернативно сахариди можуть кожен окремо бути кон'югованим до різних молекул протеїну-носія (кожна молекула протеїну-носія має тільки один тип сахариду, кон'югованого до неї).

Приклади носіїв-протеїнів, які можуть бути використаними в даному винаході є DT (анатоксин дифтерії), TT (анатоксин правця) або фрагмент С з TT, DT CRM197 (мутант DT), інші точкові мутанти, такі як CRM 176, CRM 228, CRM 45 (Uchida et al. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9, CRM 45, CRM 102, CRM 103 та CRM 107 та інших мутацій описаних Nicholls та Youle в Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делеція або мутація Glu-148 до Asp, Gln чи Ser та/або Ala 158 до Gly та інші мутації розкриті в US 4709017 або US 4950740; мутації щонайменш одного чи більше залишків Lys 516, Lys 526, Phe 530 та/або Lys 534 та інші мутації розкриті в US 5917017 чи US 6455673; або фрагмент розкритий в US 5843711, пневмококовий пневмолізину (Kuo et al. (1995) Infect Immun 63; 2706-13) включаючи виток детоксифікований в деякій формі наприклад, dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) або dPLY-формальдерід, PhtX, включаючи PhtA, PhtB, PhtD, PhtE та злиті Pht протеїни, наприклад PhtDE злиті, PhtBE злиті (WO 01/98334 та WO 03/54007), (Pht A-E описані більш детально нижче) ОМПС (менінгококова зовнішня протеїнова мембрана - зазвичай екстрагована з *N. meningitidis* серогрупи B - EP 0372501), Po9rB (з *N. meningitidis*), PD (протеїн D *Haemophilus influenzae* - дивись, наприклад, EP 0594610B), чи його імунологічно функціональні еквіваленти, синтетичні пептиди (EP 0378881, EP 04727347), протеїни температурного шоку (WO 93/17712, WO 94/03208), протеїни коклюшу (WO 98/58668, EP 0471177), цитокіни, лімфокіни, фактори росту або гормони (WO 91/01146), штучні протеїни, що містять багатократні людські CD4+ Т клітинні епітопи з різних патогенних похідних антигенів (Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824) такі як N19 протеїн (Baraldoi et al. (2004) Infect Immun 72; 4884-7) пневмококовий поверхневий протеїн PspA (WO 02/091998), залізо поглинаючи протеїни (WO

01/72337), токсин А чи В з *C. difficile* (WO 00/61761).

Nurkka et al. Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11):1008-14, 2004 Nov. описували 11валентну пневмококову вакцину з всіма серотипами кон'югованими до PD. Однак, даний винахід показав, що опсонофагоцитозна активність вдосконалена для антитіл викликаних кон'югатами, що мають 19F кон'югований до DT порівняно з 19F кон'югованим до PD. На додаток, даний винахід показав, що більшу перехресну реактивність до 19A спостерігається з 19F кон'югованим до DT. Тому, особливість композиції даного винаходу полягає в тому, що серотип 19F є кон'югованим до бактеріального анатоксину, наприклад TT, пневмолізину, DT чи CRM 197. В одному втіленні серотип 19F кон'югований до DT. Також особливістю винаходу є те, що серотип 19A кон'югований до бактеріального анатоксину, наприклад TT, пневмолізину, DT чи CRM 197. Залишкові сахаридні серотипи імуногенної композиції можуть повністю бути кон'югованими до одного чи більше носіїв-протеїнів, що не є DT (тобто тільки 19F кон'югований до DT), або можуть розщеплюватися між одним чи більше носіями-протеїнами, що не є DT чи DT по суті. В одному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а всі залишкові серотипи кон'юговані до PD. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, та TT чи DT чи CRM 197. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а не більше ніж один сахарид кон'югований до TT. В одному аспекті цього втілення згаданим одним сахаридом є 18C або 12F. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а не більше ніж два сахариди кон'юговані до TT. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, TT та DT чи CRM 197. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, TT та пневмолізином. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, TT та CRM 197. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, TT, пневмолізином та не обов'язково PhtD чи PhtD/E злитим протеїном. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, 19A кон'югований до пневмолізину чи TT, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, TT, пневмолізином та не обов'язково PhtD чи PhtD/E злитим протеїном. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, 19A кон'югований до пневмолізину чи TT, а залишкові серотипи розщеплюються між PD, TT, пневмолізином та не обов'язково PhtD чи PhtD/E злитим протеїном. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, 19A кон'югований до пневмолізину, один додатковий сахарид кон'югований до TT, один додатковий сахарид кон'югований до PhtD чи PhtD/E та всі додаткові сахариди кон'юговані до PD. В наступному втіленні 19F кон'югований до DT чи CRM 197, 19A кон'югований до пневмолізину, один додатковий сахарид кон'югований до TT, один додатковий сахарид кон'югований до пневмолізину, 2 додаткових сахариди кон'юговані до PhtD чи PhtD/E та всі додаткові сахариди кон'юговані до PD.

В одному втіленні імуногенна композиція винаходу містить протеїн D з *Haemophilus influenzae*. В цьому винаході, якщо PD є не одним з протеїнів-носіїв, використаних для кон'югації будь-яких сахаридів інших за 19F, наприклад 19F кон'югований до DT доки інші серотипи кон'юговані до одного чи більше носіїв-протеїнів, які є не PD, то PD буде присутнім в композиції вакцини як вільний протеїн. Якщо PD є одним з носіїв-протеїнів, використаних для кон'югації сахаридів інших за 19F, то може необов'язково бути присутнім в композиції вакцини як вільний протеїн.

Термін "сахарид" у всіх відношеннях специфікації можуть коротко позначати полісахариди або олігосахариди та включає обидва. Полісахариди виділені з бактерій та можуть бути підігнаними до певного ступеню відомими методами (дивись наприклад EP 497524 та EP 497525) й переважно мікрофлюїдизацією. Полісахариди можуть бути сортованими з метою зниження в'язкості в полісахаридних зразках та/або покращення здатності до фільтрування для кон'югованих продуктів. Олігосахариди мають низьке число одиниць, що повторюються (типово 5-30 одиниць, що повторюються) і є типово гідролізованими полісахаридами.

Капсульовані полісахариди *Streptococcus pneumoniae* містять олігосахаридні одиниці, що повторюються, які включають до 8 цукрових залишків. Для огляду олігосахаридних одиниць для ключа *Streptococcus pneumoniae* серотипів дивись JONES, Christopher. Вакцини, що ґрунтуються на клітинних поверхневих карбогідратах патогенних бактерій. An. Acad. Bras. Cienc. June 2005, vol.77, p. 293-324. ISSN 0001-3765. В одному втіленні капсульований сахаридний антиген може бути полісахаридом повної довжини, однак, в інших він може бути однією олігосахаридною одиницею, або коротшою за довжину природного сахаридного ланцюгу олігосахаридних одиниць, що повторюються. В одному втіленні всі сахариди присутні у винаході є полісахаридами. Полісахариди повної довжини можуть бути "сортованими" тобто їх розмір може бути зменшеним різними методами, такими як кисла гідролізна обробка, гідроген пероксидна обробка, сортування *emulsiflex*® з наступною гідроген пероксидною обробкою до утворення олігосахаридних фрагментів або мікрофлюїдизація.

Заявники також відмічають, що суть способу полягає у використанні олігосахаридів для полегшення отримання кон'югатів. Заявники знайшли, що використання природних або трохи сортованих полісахаридних кон'югатів, одна чи більше наступних переваг, може бути реалізовано: 1) кон'югат, що має високу імуногенність, який є здатним до фільтрування, 2) відношення полісахариду до протеїну в кон'югаті може бути змінено так що відношення полісахариду до протеїну (w/w) в кон'югаті може зростати (який може мати вплив на ефект супресії носія), 3) імуногенні кон'югати, що піддаються гідролізу, можуть бути стабілізованими використанням більших сахаридів для кон'югації. Використання більших полісахаридів може мати наслідком більше перехресне зв'язування з кон'югатним носієм та може зменшувати виділення у вільному стані сахариду з кон'югату. Кон'юговані

вакцини, описані в прототипі, містять в собі елементи до деполімерізації полісахаридів, що передують кон'югації з метою покращення кон'югації. Заявники винайшли, що сахаридні кон'юговані вакцини, що утримують сахариди більших розмірів, можуть забезпечити гарний імунний відгук проти пневмококового захворювання.

Імуногенна композиція винаходу може таким чином містити один або більше сахаридних кон'югатів, в яких середній розмір (наприклад, вага-середня молекулярна маса  $M_w$ ) кожного сахариду до кон'югації є понад 80 кДа, 100 кДа, 200 кДа, 300 кДа, 400 кДа, 500 кДа чи 1000 кДа. В одному з втілень один чи більше сахаридних кон'югатів винаходу мали б середній розмір сахариду до кон'югації 50-1600, 80-1400, 100-1000, 150-500, чи 200-400 кДа (відмічено, що середній розмір є  $M_w$ , "кДа" - одиниці, що заміщували б тут " $\times 10^3$ "). В одному втіленні кон'югат після кон'югації був би здатним легко фільтруватися через фільтр 0.2 мікрона так, щоб отримувати вихід після фільтрації більший за 50, 60, 70, 80, 90 або 95% порівняно зі зразком до фільтрації.

Для цілей винаходу "природний полісахарид" відноситься до сахариду, що не піддавався до процесу (наприклад, після очищення), мета з якою є зменшення розміру сахариду. Полісахарид стає трохи меншим за розміром під час звичайних процедур очищення. Такий сахарид залишається природним. Тільки якщо полісахарид піддавався до методів сортування, то полісахариди не вважаються природними.

Для цілей винаходу "сортований за фактором аж до  $\times 2$ " означає, що сахарид піддається до процесу, призначеного для зменшення розміру сахариду, але утримується розмір більший ніж половина розміру природного полісахариду.  $\times 3$ ,  $\times 4$  і т.д. інтерпретується таким же чином, тобто сахарид піддається до процесу, призначеного для зменшення розміру сахариду, але утримується розмір більший ніж третя, четверта і т.д. частина розміру природного полісахариду.

У втіленні винаходу імуногенна композиція містить *Streptococcus pneumoniae* сахариди від щонайменш 10 серотипів кон'югованих до носію-протеїну, де щонайменш 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або кожен *S. pneumoniae* сахарид є природним полісахаридом.

У втіленні винаходу імуногенна композиція містить *Streptococcus pneumoniae* сахариди від щонайменш 10 серотипів кон'югованих до носію-протеїну, де щонайменш 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або кожен *S. pneumoniae* сахарид є сортованим за фактором аж до  $\times 2$ ,  $\times 3$ ,  $\times 4$ ,  $\times 5$ ,  $\times 6$ ,  $\times 7$ ,  $\times 8$ ,  $\times 9$  чи  $\times 10$ . В одному втіленні цього аспекту більшість сахаридів, наприклад 6, 7, 8 чи більше сахаридів, сортовані за фактором аж до  $\times 2$ ,  $\times 3$ ,  $\times 4$ ,  $\times 5$ ,  $\times 6$ ,  $\times 7$ ,  $\times 8$ ,  $\times 9$  чи  $\times 10$ .

Молекулярна маса або середня молекулярна маса (або розмір) сахариду тут приписується середньо-ваговій молекулярній масі ( $M_w$ ) сахариду, виміряній до кон'югації та вимірюється згідно MALLS.

Метод MALLS добре відомий в способі й типово виконується як описано в прикладі 2. Для

MALLS аналізу пневмококових сахаридів, дві колонки (TSKG6000 та 5000PWxl) можуть використовуватись в комбінації та сахариди елююють водою. Сахариди детектують, використовуючи детектор світло розсіювання (наприклад Wyatt Dawn DSP устаткований аргонним лазером потужністю 100мВт з довжиною хвилі 488 нм) та інфракрасний рефрактометр (наприклад Wyatt Otilab DSP устаткований P100 ячейкою та червоним фільтром 498 нм).

У втіленні винаходу *S. pneumoniae* сахариди - це природні полісахариди чи природні полісахариди, які зменшені в розмірі підчас нормального процесу екстракції.

У втіленні винаходу *S. pneumoniae* сахариди сортовані механічним розщепленням, наприклад, мікрофлюїдизацією чи сонацією. Мікрофлюїдизація та сонація мають достатню перевагу зниження розміру більших природних полісахаридів, щоб забезпечити здатність кон'югату до фільтрування. Сортування відбувається за фактором не більшим за x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 або x2.

У втіленні винаходу імуногенна композиція містить *S. pneumoniae* кон'югати, що виробляють з суміші природних полісахаридів та сахаридів, що сортовані за фактором не більшим за x20. В одному способі даного втілення більшість сахаридів, наприклад 6, 7, 8 чи більше сахаридів сортовані за фактором до x2, x3, x4, x5 або x6.

У втіленні винаходу *Streptococcus pneumoniae* сахарид кон'югований до носію-протеїну через лінкер, наприклад біфункціональний лінкер. Лінкер необов'язково гетеро біфункціональний чи гомо біфункціональний, маючи, наприклад, реакційноздатну аміно групу та реакційноздатну карбоксильну групу, 2 реакційноздатних аміно групи чи дві реакційноздатних карбоксильних групи. Лінкер має, наприклад, між 4 та 20, 4 та 12, 5 та 10 атомів вуглецю. Можливим лінкером є ADH. Інші лінкери включають В-пропіонамідо (WO 00/10599), нітрофеніл-етиламін (Gever et al. (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), галоалкілгаліди (US 4057685), глікозидний зв'язки (US 4673574, US 4808700), гексан діамін та 6-амінокапронова кислота (US 4459286). У втіленні винаходу ADH використовується як лінкер для кон'югування сахариду з серотипу 18С. У втіленні винаходу ADH використовується як лінкер для кон'югування сахариду з серотипу 22F.

Сахаридні кон'югати присутні в імуногенних композиціях винаходу можуть бути приготовлені будь-якою відомою парою методик. Метод кон'югації може припускати активацію сахариду 1-ціано-4-диметиламіно піридином тетрафторборатом (CDAP) до утворення ціанатного естеру. Активованій сахарид може, таким чином, бути сполученням напряму або через спейсерну (лінкерну) групу з аміно групою на носії-протеїні. Наприклад, спейсером може бути цистамін або цистеамін, щоб атакувати тіольований полісахарид, який міг би сполучитися з носієм через тіоефірний зв'язок, отриманий після реакції з малеїмід- активованим носієм-протеїном (наприклад, використовуючи GMBS) або галоацетилованим носієм-протеїном (наприклад, використовуючи йодоацетимід [напри-

клад, етил йодоацетимід HCl] або N-сукцинімідил бромацетат чи SIAB, SIA, чи SBAP). Переважно, ціанатний естер (необов'язково виготовлений за CDAP хімією) сполучають з гексан діаміном або ADH, та аміно похідну сахариду кон'югують до носію-протеїну, використовуючи карбодіімідну (наприклад, EDAC чи EDC) хімію через карбоксильну групу протеїну-носія. Такі кон'югати описані в PCT опублікованій заявці WO 93/15760 Uniformed Services University та WO 95/08348 та WO 96/29094.

Інші придатні методики використовують карбодіімід, гідразиди, активні естери, норборан, п-нітробензойну кислоту, N-гідроксисукцинімід, S-NHS, EDC, TSTU. Багато описано в WO 98/42721. Кон'югація може включати карбонільний лінкер, який може бути утворений за реакцією вільної гідроксильної групи сахариду з CDI (Bethell et al. J. Boil. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al. J. Chromatogr. 1981, 218; 509-18) з наступною реакцією з протеїном до утворення карбаматного зв'язку. Це може включати відновлення аномерного кінця до первинної гідроксильної групи, необов'язкова захисна/незахисна первинної гідроксильної групи реакція первинної гідроксильної групи з CDI до утворення CDI карбаматного інтермедіату та сполучення CDI карбаматного інтермедіату з аміно групою на протеїні.

Кон'югати можуть також бути приготовленими прямими методами амінування як описано в US 4365170 (Jennings) та US 4673574 (Anderson). Інші методи описані в EP-0-161-188, EP-208375 та EP-0-477508.

Надалі метод включає сполучення ціаноген броміду (чи CDAP) активованої похідної сахариду гідразидом адипінової кислоти (ADH) з протеїном-носієм Карбодіімідною конденсацією (Chu C et al. Infect. Immunity, 1983 245 256), наприклад, використовуючи EDAC.

У втіленні винаходу, гідроксильна група (переважно активована гідроксильна група, наприклад, гідроксильна група активована для отримання ціанатного естеру [наприклад з CDAP]) на сахариді є або напряму або не напряму зв'язаною з аміно або карбоксильною групою на протеїні (через лінкер). У випадку, коли лінкер присутній, гідроксильна група на сахариді переважно пов'язана з аміно групою на лінкері, наприклад, використовуючи CDAP кон'югацію. Надалі аміно група в лінкері (наприклад, ADH) може бути кон'югована до карбоксильної групи на протеїні, наприклад, використовуючи карбодіімідну хімію, наприклад, використовуючи EDAC. У втіленні винаходу, пневмококовий(і) капсульований(і) сахарид(и) спочатку кон'югований(і) з лінкером до кон'югації лінкера з носієм-протеїном. Альтернативно лінкер може бути кон'югованим з носієм до кон'югації з сахаридом.

Також може бути використана комбінація методів, з деякими сахарид-протеїновими кон'югатами, що готувалися з CDAP, а деякі відновлюючим амінуванням.

В основному наступні типи хімічних груп на протеїнах-носіях можуть бути використані для сполучення/кон'югації:



А) Карбоксильна (наприклад, через аспарагінову кислоту чи глютамінову кислоту). В одному втіленні ця група зв'язана з аміно групами на сахарадах напряду або з аміно групою на лінкері використовуючи карбодіімідну хімію тобто використовуючи EDAC.

В) Аміно група (наприклад, через лізин). В одному втіленні ця група зв'язана з карбоксильними групами на сахарадах напряду або з карбоксильною групою на лінкері використовуючи карбодіімідний хімічний метод тобто використовуючи EDAC. В іншому втіленні ця група зв'язана з гідроксильними групами активованими CDAP чи CNBr на сахарадах напряду або з такими групами на лінкері; з сахарадами чи лінкерами, що містять альдегідну групу; з сахарадами чи лінкерами, що мають сукцинімідну естерну групу.

С) Сульфогідрил (наприклад, через цистеїн). В одному втіленні ця група зв'язана з бром або хлор ацетильованим сахариним чи зв'язана використовуючи малеїмідний хімічний метод. В одному втіленні ця група активована/модифікована використовуючи біс-діазобензидин.

Д) Гідроксильна група (наприклад, через тирозин). В одному втіленні ця група активована/модифікована використовуючи біс-діазобензидин.

Е) Імідазолільна група (наприклад, через гістидин). В одному втіленні ця група активована/модифікована використовуючи біс-діазобензидин.

Г) Гуанідильна група (наприклад, через аргінін).

Г) Індолільна група (наприклад, через триптофан).

В основному на сахарадах присутні наступні групи, що можуть використовуватися для сполучення: OH, COOH чи NH<sub>2</sub>. Альдегідні групи можуть генеруватися після різноманітних обробок відомим фахівцям, такими як: періодат, кислотний гідроліз, перекис водню, та інш.

Підходи прямого сполучення:

Сахарид-OH + CNBr чи CDAP → цианатний естер + NH<sub>2</sub>-Prot → кон'югат

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

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

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

Підходи непрямого сполучення через спейсер (лінкер):

Сахарид-OH + CNBr чи CDAP → цианатний естер + NH<sub>2</sub>----NH<sub>2</sub> → сахарид----NH<sub>2</sub> + COOH-Prot + EDAC → кон'югат

Сахарид-OH + CNBr чи CDAP → цианатний естер + NH<sub>2</sub>----SH → сахарид----SH + SH-Prot (природний Протеїн з незахищеним цистеїном або отриманим після модифікації аміно груп протеїну, наприклад, SPDP) → сахарид-S-S-Prot

Сахарид-OH + CNBr чи CDAP → цианатний естер + NH<sub>2</sub>----SH → сахарид----SH + малеїмід - Prot (модифікація аміно груп) → кон'югат

Сахарид -OH + CNBr чи CDAP → цианатний естер + NH<sub>2</sub>----SH → Сахарид-SH + галогенацильований-Prot → кон'югат

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

Сахарид-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>----SH → сахарид----SH + SH-Prot (природний Протеїн з незахищеним цистеїном або отриманим після модифікації аміно груп протеїну, наприклад, SPDP) → сахарид-S-S-Prot

Сахарид-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>----SH → сахарид----SH + малеїмід-Prot (модифікація аміно груп) → кон'югат

Сахарид-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>----SH → Сахарид-SH + галогенацильований-Prot → кон'югат

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

Примітка: замість EDAC, зазначеного вище, може використовуватись прийнятий карбодіімід.

Підсумовуючи, типи хімічних груп протеїнів-носіїв, що можуть бути в основному використані для сполучення з сахариним є аміно групи (наприклад, на залишках лізину), COOH групи (наприклад, на залишках аспарагінової та глютамінової кислот) та SH групи (якщо доступні) (наприклад, на залишках цистеїну).

Переважаю ввагове співвідношення носію-протеїну до S. Pneumoniae знаходиться в межах від 1:5 до 5:1; наприклад, між 1:0.5-4:1, 1:1-3.5:1, 1:2-1-3:1, 1.5:1-2.5:1; наприклад, між 1:2 та 2.5:1; 1:1 та 2:1. У втіленні винаходу більшість кон'югатів, наприклад, 6, 7, 8, 9 чи більше кон'югатів мають співвідношення носію-протеїну до сахариду, що більше за 1:1, наприклад, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1 чи 1.6:1.

У втіленні винаходу, щонайменше один S. Pneumoniae сахарид кон'югований до носію-протеїну через лінкер, використовуючи CDAP чи EDAC. Наприклад, 18C або 22F можуть бути кон'югованими до протеїну через лінкер (наприклад ті, що з двома гідразинними групами на кінцях, такі як ADH) використовуючи CDAP чи EDAC як описано вище. Коли використовується лінкер, CDAP можуть використовувати для кон'югації сахариду до лінкеру, а EDAC може використовуватись потім для кон'югації лінкеру до протеїну, або альтернативно EDAC може використовуватись спочатку для кон'югації лінкеру до протеїну, після чого CDAP можуть використовувати для кон'югації лінкеру до сахариду.

В основному імуногенна композиція винаходу може містити дозу кожного сахаридного кон'югату в межах від 0.1 до 20 мкг, від 1 до 10 мкг або від 1 до 3 мкг сахариду.

У втіленні, імуногенна композиція винаходу містить кожен S. Pneumoniae капсульований сахарид дозою в межах 0.1-20 мкг, 0.5-10мкг, 0.5-5 мкг або 1-3 мкг сахариду. У втіленні винаходу, капсульовані сахариди можуть знаходитись в різних дозах, наприклад, деякі капсульовані сахариди можуть знаходитись дозою точно 1 мкг або деякі капсульовані сахариди можуть знаходитись дозою точно 3 мкг. У втіленні винаходу сахариди від серотипів 3, 18C та 19F (чи 4, 18C та 19F) присутні в більш високій дозі ніж інші сахариди. В одному аспекті цього втілення серотипи 3, 18C та 19F (чи

4, 18C та 19F) присутні в дозі близькій або точно 3 мкг, в той час коли інші сахариди імуногенної композиції присутні в дозі близькій або точно 1 мкг.

"Близько" або "наближено" визначено як в межах 10% більше або менше наведеного числа для цілей винаходу.

У втіленні винаходу, щонайменше один *S. Pneumoniae* капсульований сахарид є напряду кон'югованим до носію-протеїну (наприклад, використовуючи один з хімічних методів, що описані вище). Переважно щонайменше один *S. Pneumoniae* капсульований сахарид є напряду кон'югованим CDAP. У втіленні винаходу більшість капсульованих сахаридів, наприклад, 5, 6, 7, 8, 9 чи більше напряду зв'язані з носієм-протеїном через CDAP (дивись WO 95/08348 та WO 96/29094).

Імуногенна композиція може містити *Streptococcus pneumoniae* протеїни, тут позначені *Streptococcus pneumoniae* протеїни винаходу. Такі протеїни можуть використовуватись як носії-протеїни, або можуть бути присутніми як вільні протеїни, або можуть бути присутніми і як носії-протеїни і як вільні протеїни. *Streptococcus pneumoniae* протеїни винаходу є або поверхнево незахищеними, щонайменше протягом частини життєвого циклу пневмококів, або є протеїнами, які виділені чи роз'єднані пневмококами. Переважно протеїни винаходу відібрані з наступних категорій, такі як протеїни, що мають фрагмент Типу II Сигнальної послідовності LXXC (де X - будь-яка амінокислота, наприклад, семейство поліглістидинової тріади (PhtX)), холін зв'язані протеїни (CbpX), протеїни, що мають фрагмент Типу I Сигнальної послідовності (наприклад, Sp101), протеїни, що мають LPXTG фрагмент (де X - будь-яка амінокислота, наприклад, Sp128, Sp130), та токсини (наприклад, Ply). Більш прийнятні приклади з цих категорій (чи фрагментів) - це наступні протеїни, або їх імунологічно функціональні еквіваленти.

В одному втіленні, імуногенна композиція винаходу містить щонайменше 1 протеїн відібраний з групи, що складається з семейства Полі Гістидинової Тріади (PhtX), семейства Холін Зв'язаного Протеїна (CbpX), CbpX укорочених, семейства LytX, LytX укорочених, CbpX укорочений-LytX укорочених химерних протеїнів (злитих), пневмолізін (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 та Sp133. В наступному втіленні, імуногенна композиція містить 2 чи більше протеїнів відібраних з групи, що складається з семейства Полі Гістидинової Тріади (PhtX), семейства Холін Зв'язаного Протеїна (CbpX), CbpX укорочених, семейства LytX, LytX укорочених, CbpX укорочений-LytX укорочених химерних протеїнів (злитих), пневмолізін (Ply), PspA, PsaA, та Sp128. В одному більш втіленні, імуногенна композиція містить 2 чи більше протеїнів відібраних з групи, що складається з семейства Полі Гістидинової Тріади (PhtX), семейства Холін Зв'язаного Протеїна (CbpX), CbpX укорочених, семейства LytX, LytX укорочених, CbpX укорочений-LytX укорочених химерних протеїнів (злитих), пневмолізін (Ply) та Sp128.

Сімейство Pht (Полі Гістидинова Тріада) містить протеїни PhtA, PhtB, PhtD та PhtE. Сімейство

характеризується ліпідацийною послідовністю, двох доменів відділених багатим на пролін регіоном та декількома гістидиновими триадами, можливо включеними в метал чи нуклеозид зв'язуючий чи ензиматичної активності, (3-5) областями подвійної спіралі, збереженими N-кінцем та гетерогенним C кінцем. Присутні в усіх штаммах пневмококи тестовані. Гомологічні протеїни також виявлені в інших *Streptococci* та *Neisseria*. В одному втіленні винаходу, Pht протеїн винаходу є PhtD. Зрозуміло, однак, що терміни Pht A, B, D та E посилаються до протеїнів, що мають послідовності розкриті в цитатах нижче, а також, що природно зустрічаються (та створені людиною) їх варіанти, що мають гомологічну послідовність, яка щонайменш на 90% ідентична до реферованих протеїнів. Переважно існує щонайменше 95% ідентичного та найбільш переважно - 97% ідентичного.

Що стосується PhtX протеїнів, PhtA розкрито в WO 98/18930, та також посилаються до Sp36. Як зазначалося вище, існує протеїн з семейства поліглістидинової тріади та має сигнальний фрагмент типу II LXXC. PhtD розкрито в WO 00/37105, та також посилаються до SpO36D. Як зазначалося вище, також існує протеїн з семейства поліглістидинової тріади та має сигнальний фрагмент типу II LXXC. PhtB розкрито в WO 00/37105, та також посилається до SpO36B. Інший член семейства PhtB - це C3-поліпептид, що розпадається, як розкрито в WO 00/17370. Це протеїн є також з семейства поліглістидинової тріади та має сигнальний фрагмент типу II LXXC. Переважний імунологічно функціональний еквівалент - це протеїн Sp42 розкритий в WO 98/18930. PhtB укорочений (близько 79kD) розкрито в WO99/15675, який також вважається членом семейства PhtX. PhtE розкрито в WO00/30299, та посилаються до як BVH-3. Де будь-який Pht протеїн є згаданим тут, мається на увазі, що можуть використовуватись імуногенні фрагменти чи їх злиття Pht протеїну. Наприклад, посилення до PhtX включає імуногенні фрагменти чи їх злиття з будь-яким Pht протеїном. Посилення до PhtD чи PhtB є також посиленням до PhtDE чи PhtBE злиттів як знайдено, наприклад, в WO0198334.

Пневмолізін - це мультифункціональний токсин з відмінним цитолітичним (гемолітичним) та комплементною активаційною активністю (Rubins et al., Am . Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). Токсин не виділяється пневмококами, але вивільняється на стадії лізису пневмококів під впливом аутолізу. Їх ефекти включають, наприклад, стимуляцію вироблення запальних цитокінів моноцитами людини, інгібування пульсуючих вій на респіраторному епітелії людини, та зниження бактеріальної активності та міграцію нейтрофіл. Найбільш очевидний ефект пневмолізіну є в лізисі червоних кров'яних клітин, що включає зв'язування холестерину. Так як він є токсином, то він потребує бути детоксикованим (тобто, нетоксичним до людини, коли забезпечена прийнятна доза для захисту) до того, як може вводитися in vivo. Експресія та клонування дикого (немутованого) типу чи природного пневмолізіну відомі фахівцям. Дивись, наприклад, Walker et al. (Infect Immun, 55:1184-

1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) and Mitchell et al. (NAR, 18:4010 (1990)). Детоксикація Ply може бути проведена хімічними способами, наприклад, піддавати обробці формаліном чи глутаровим альдегідом або комбінацією обох (WO 04081515, РСТ/ЕР2005/010258). Такі методи добре відомі фахівцям для різних токсинів. Альтернативно, ply може бути генетично детоксикованим. Таким чином, винахід охоплює похідні пневмококових протеїнів, які можуть бути, наприклад, мutowаними протеїнами. Термін "мutowаний" використовується тут в значенні молекула, яка піддавалася делеції, додавання або заміщення однієї чи більше амінокислот використовуючи добре відомі методики для сайту направлено мутагенезису або будь-який інший традиційний метод. Наприклад, як описано вище, мutowаний ply протеїн може бути змінений таким чином, що він стає біологічно неактивним в поки придушені підтримуючі його імунотенні епітопи, дивись, наприклад, WO90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999)) та WO99/03884.

Як використано тут, мається на увазі, що термін "Ply" вказує на мutowаний чи детоксикований пневмолізину прийнятний для медичного використання (тобто нетоксичний).

Стосовно сімейства Холін Зв'язаного Протеїну (CbpX), члени того сімейства першочергово визначалися як пневмококові протеїни, що могли б бути очищені холін-афінною хроматографією. Всі з холін зв'язаних протеїнів нековалентно зв'язані з фосфорилхоліновими половинами тейхоївої кислоти перегородки клітини та мембран-асоційованої ліпотейхоївої кислоти. Структурно, вони мають декілька областей в загальному над повним сімейством, хоча, точна природа протеїнів (амінокислотна послідовність, довжина, і т.д.) може змінюватись. Взагалі, холін зв'язані протеїни містять N кінцеву область (N), збережені області повторення (R1 та/чи R2), пролін збагачену область (P) та збережену холін зв'язану область (C), приготовлені багаторазовими повторюваннями, що містять наближено половину протеїну. Як використано в цій заявці, термін "сімейство Холін Зв'язаного Протеїну (CbpX)" відібрано з групи, що складається з Холін Зв'язаних Протеїнів як встановлено в WO97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, та CbpG. CbpA розкрито в WO97/41151. CbpD та CbpG розкриті в WO00/29434. PspC розкрито в WO97/09994. PbcA розкрито в WO98/21337. SpsA - це Холін зв'язаний протеїн розкритий в WO 98/39450. Переважно Холін Зв'язані Протеїни відібрані з групи, що складається з CbpA, PbcA, SpsA та PspC.

Іншим прийнятним втіленням є CbpX укорочені, де "CbpX" визначено вище та "укорочення" посиляється до CbpX протеїнів, в яких Холін зв'язана область (C) відсутня на 50% чи більше. Переважно такі протеїни не мають повної холін зв'язаної області. Більш прийнятно, такі протеїни укорочень потерпають від нестачі (i) холін зв'язаної області та (ii) частини N-кінцевої половини протеїну а також, ще утримує щонайменше одну область повторення (R1 чи R2). Більш прийнятно все ще, укорочення має 2 області повторення (R1 та R2).

Прикладами таких прийнятних втілень є NR1xR2 та R1xR2 як проілюстровано в WO99/51266 чи WO99/51188, однак, інші холін зв'язані протеїни, що мають нестачу подібних холін зв'язаних областей також розглядаються в рамках цього винаходу.

Сімейство LytX - це мембран асоційовані протеїни пов'язані з лізісом клітини. N-кінцевий домен містить холін зв'язаний домен(и), однак сімейство LytX не має всіх можливостей, знайдених в сімействі CbpA, зазначених вище, й таким чином для даного винаходу, сімейство LytX окремим від сімейства CbpX. На відміну від сімейства CbpX, C-кінцевий домен містить каталітичний домен сімейства LytX протеїну. Сімейство містить LytA, B та C. По відношенню до сімейства LytX, LytA розкрито в Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB розкрито в WO 98/18930, та також посиляється до Sp46. LytC також розкрито в WO 98/18930, та також посиляються до Sp91. Прийнятним членом такого сімейства є LytC.

Іншим прийнятним втіленням є LytX укорочення, де "LytX" визначено вище та "укорочення" посиляється до LytX протеїнів, в яких Холін зв'язана область відсутня 50% чи більше. Переважно такі протеїни не мають повної холін зв'язаної області. Ще іншим прийнятним втіленням цього винаходу є CbpX укорочення-LytX укорочення химерних протеїнів (злитих). Переважно містить NR1xR2 (або R1xR2) CbpX та C-кінцеву частину (Cterm, тобто, нестача холін зв'язаних доменів) LytX (наприклад, LytCCterm або Sp91Cterm). Більш прийнятний CbpX відбирається з групи, що складається з CbpA, PbcA, SpsA та PspC. Більш прийнятним все ще, є CbpA. Переважно, LytX є LytC (також посиляється до Sp91). Іншим втіленням даного винаходу є PspA чи PsaA укорочення, мають нестачу холін зв'язаного домену (C) та експресований як злитий протеїн з LytX. Переважно, LytX є LytC.

Що стосується PsaA та PspA, то обидва є відомими фахівцям. Наприклад, PsaA та його варіанти трансмембранної делеції описані Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64(12):5255-62. PspA та його варіанти трансмембранної розкриті, наприклад, в US 5804193, WO 92/14488, та WO 99/53940.

Sp128 та Sp130 розкриті в WO00/76540. Sp125 є прикладом пневмококового поверхневого протеїну з закріпленням на стінці клітини мотивом LPXTG (де X - будь-яка амінокислота). Будь-який протеїн з цього класу пневмококового поверхневого протеїну з цим фрагментом є знайденим, щоб бути використаним в контексті цього винаходу, а тому надалі вважається протеїном винаходу. Сам Sp125 розкрито в WO 98/18930, а також відомий як ZmpB - цинк металопропротеїназа. Sp101 розкрито в WO 98/06734 (де є посилання # у85993). Він характеризується сигнальною послідовністю Типу I. Sp133 розкрито в WO 98/06734 (де є посилання # у85992). Він також характеризується сигнальною послідовністю Типу I.

Прикладами виділених Moraxella catarrhalis протеїнових антигенів, які можуть бути включеними до комбінованої вакцини (особливо для попередження середнього отиту) є: OMP106 [WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 чи

їх фрагменти (WO 0018910); LbpA та/або LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA та/або TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 та/або UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); Iip006 (GB 9917977.2); Iip010 (GB 9918208.1); Iip011 (GB 9918302.2); Iip018 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpIAI (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); та OmpE. Приклади нетипових *Haemophilus influenzae* антигенів чи їх фрагментів, які можуть входити до комбінованої вакцини (особливо для попередження середнього отиту) включають: Fimbrin протеїн [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] та злиття, що містять пептиди звітти [наприклад, LB1(f) пептидні злиття; US 5843464 (OSU) або WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA та/або TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Nap; D15 (WO 94/12641); P2; та P5 (WO 94/26304).

Протеїни винаходу можуть також бути корисно комбіновані. Під комбінованими розуміється, що імуногенна композиція всіх протеїнів з наступних комбінацій, чи як носіїв-протеїнів, чи як вільних протеїнів чи суміші з двох. Наприклад, в комбінації двох протеїнів, як викладається надалі, обидва протеїни можуть використовуватися як носії-протеїни, чи обидва протеїни можуть бути присутніми як носії та як вільний протеїн, чи один може бути присутнім як носій-протеїн та вільний протеїн доки інший присутній тільки як носій-протеїн або тільки як вільний протеїн, чи один може бути присутнім як носій-протеїн, а інший як вільний протеїн. Існують подібні можливості, де наводиться комбінація з трьох протеїнів. Виділені комбінації включають, але не обмежуються, PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm химерні або злиті протеїни, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm химерні або злиті протеїни, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LysC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LysC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Переважно, NR1xR2 (чи R1xR2) є з CbpA або PspC. Більш прийнятно є з CbpA. Інші комбінації включають комбінації 3 протеїнів, такі як PhtD + NR1xR2 + Ply, та PhtA + NR1xR2 + PhtD. В одному втіленні, композиція вакцини містить детоксикований пневмолізін та PhtD або PhtDE як носії-протеїни. В наступному втіленні, композиція вакцини містить детоксикований пневмолізін та PhtD або PhtDE як вільні протеїни.

В незалежному пункті, даний винахід забезпечує імуногенну композицію, що містить що найменше чотири *S. Pneumoniae* капсульовані сахаридні кон'югати, які містять сахариди з різних *S. Pneumoniae* серотипів, де щонайменше один сахарид є кон'югованим до PhtD чи його злитого про-

теїну та імуногенна композиція припускає виявлення ефективного імунного відгуку проти PhtD.

Ефективний імунний відгук проти PhtD чи його злитого протеїну вимірюється, наприклад, оцінюванням захисту, так як це описано в прикладі 15. Ефективний імунний відгук забезпечує щонайменше 40%, 50%, 60%, 70%, 80% або 90% виживання протягом 7 днів після дії гетерологічним штамом. Встановлено, що дія штаму є гетерологічною, наданий захист є завдяки імунному відгуку проти PhtD чи його злитого протеїну.

Альтернативно, ефективний імунний відгук проти PhtD вимірюється методом ELISA як описано в прикладі 14. Ефективний імунний відгук дає анти-PhtD IgG відгук щонайменше 250, 300, 350, 400, 500, 550 чи 600 мкг/мл GMC.

Наприклад, імуногенна композиція містить щонайменш 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 чи 10 *S. pneumoniae* капсульованих сахаридів з різних серотипів, кон'югованих до PhtD чи його злитого протеїну. Наприклад, серотипи 22F та 1, 2, 3, 4, 5, 6 чи 7 надалі відбираються з серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 23F та 33F кон'югованих до PhtD. У втіленні винаходу два чи три серотипи 3, 6A та 22F кон'юговані до PhtD чи його злитого протеїну.

У втіленні, імуногенна композиція винаходу містить щонайменш один *S. pneumoniae* капсульований сахарид кон'югований до PhtD чи його злитого протеїну, де співвідношення PhtD до сахариду в кон'югаті знаходиться між 6:1 та 1:5, 6:1 та 2:1, 6:1 та 2.5:1, 6:1 та 3:1, 6:1 та 3.5:1 (м/м), чи більше ніж (тобто містить більшу долю PhtD) 2.0:1, 2.5:1, 3.0:1, 3.5:1 чи 4.0:1 (м/м).

У втіленні, імуногенна композиція винаходу містить пневмолізін.

Даний винахід надалі забезпечує вакцину, що містить імуногенні композиції винаходу та фармацевтично прийнятний ексціпієнт.

Вакцина даного винаходу може бути активізована, особливо коли малоса на увазі для використання серед населення похилого віку, але також для використання серед населення дитячого віку. Прийнятні ад'юванти включають солі алюмінію, такі як гель гідроксиду алюмінію, чи алюміній фосфат, чи квасці, але також можуть бути солі інших металів, таких як кальцію, магнію, заліза та цинку, або можуть бути нерозчинна суспензія ацильованого тирозину, чи ацильованих цукрів, катіонно чи аніонно модифікованих сахаридів, чи поліфосфатів.

Виділено, що ад'ювант відділений є прийнятним індусером типу Th1 відгуку. Такі високі рівні цитокінів типу Th1 мають тенденцію до дозволу індукції проміжних імунних відгуків клітин до надавання антигену, доки високі рівні цитокінів типу Th2 мають тенденцію до дозволу індукції гуморальних імунних відгуків до антигену.

Відмінність Th1 та Th2 імунного відгуку не є абсолютною. Фактично індивід буде підтримувати імунний відгук, який описаний як той, що є пре-домінантно Th1 чи пре-домінантно Th2. Однак, часто зручні для розгляду сімейства цитокінів в термінах, що описані на CD4 +ve T клонах клітин мишей Mosmann та Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman,

R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties). (Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Традиційно, відгуки типу Th1 асоціюються з виробленням INF- $\gamma$  та IL-2 цитокін Т-лімфоцитами. Інші цитокіни часто напряду асоційовані з виробленням імунних відгуків типу Th1, не є виробленими Т-клітинами, такими як IL-12. На відміну, відгуки типу Th2 асоціюються з секрецією IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Прийнятні ад'ювантні системи, які сприяють предродінантно Th1 відгуку, включають: Монофосфорил ліпід А чи його похідні (або детоксикований ліпід А в основному - дивись наприклад WO2005107798), особливо 3-де-О-ацильований монофосфорил ліпід А (3D-MPL) (для його приготування дивись GB 2220211 А); та комбінація монофосфорил ліпід А, краще 3-де-О-ацильований монофосфорил ліпід А, разом чи з солюю алюмінію (наприклад, фосфат алюмінію чи гідроксид алюмінію) чи з емульсією олія-в-воді. В таких комбінаціях антиген та 3D-MPL містяться в однакових макрочастинкових структурах, дозволяючи більш ефективне постачання антигенних та імуностимуляторних сигналів. Дослідження показали, що 3D-MPL може надалі підвищувати імуногенність квасці-адсорбованого антигену [Thoele et al. Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

Розширена система включає комбінацію монофосфорил ліпід А та сапонін похідну, особливо комбінацію QS21 та 3D-MPL як розкрито в WO 94/00153, або меншу реактогенну композицію, де QS21 подавляється холестерином як розкрито в WO 96/33739. Особливо сильне ад'ювантне формулювання, що включає QS21, 3D-MPL та токоферол в емульсії олія-в-воді, описані в WO 25 95/17210. В одному втіленні винаходу, імуногенна композиція додатково містить сапонін, який може бути QS21. Формулювання може також містити емульсією олія-в-воді та токоферол (WO 95/17210). Неметильований CpG, що містить олігонуклеотиди (WO 96/02555) та інші імунотуляторні олігонуклеотиди (WO0226757 та WO03507822) є також переважними індукторами відгуку TH1 та є прийнятними для використання в даному винаході.

Особливі ад'юванти відібрані з групи солей металів, емульсій олії в воді, Toll-подібних агоністів рецепторів, (зокрема Toll-подібний агоніст рецептору 2, Toll-подібний агоніст рецептору 3, Toll-подібний агоніст рецептору 4, Toll-подібний агоніст рецептору 7, Toll-подібний агоніст рецептору 8 та Toll-подібний агоніст рецептору 9), сапонінів чи їх комбінацій.

Ад'ювант, що може бути використаним в композиціях вакцин винаходу, є приготування пухирця чи зовнішньої мембрани везикули з Грам негативних бактеріальних штамів, таких як ті, що вивчені в WO02/09746 особливо N. meningitidis пухирців. Властивості ад'юванту пухирців можуть бути покращеними утриманням LOS (ліпоолігосахарид) на своїй поверхні (наприклад, шляхом екстракції з низькими концентраціями детергенту [наприклад 0-0.1% деоксиколату]). LOS може бути детоксикованим шляхом msbB(-) чи htrB(-) мутацій, обговорених в WO 02/09746. Властивості ад'юванту можуть також бути покращеними утриманням PorB

(та необов'язково заміщенням PorA) з менінгококових пухирців. Властивості ад'юванту можуть також бути покращеними укороченням структури зовнішнього основного сахариду LOS на менінгококовому пухирці - наприклад, через lgtB(-) мутацію, обговорену в WO 2004/014417. Альтернативно, вищезгаданий LOS (наприклад, виділений з msbB(-) та/або lgtB(-) штаму) може бути очищеним та використаним як ад'ювант в композиціях винаходу.

Наступний ад'ювант, який може використовуватися з композиціями винаходу можуть бути відібраними з групи: сапонін, ліпід А чи його похідні, олігонуклеотид імуностимулятору, алкил глюкозамінід фосфат, емульсія олії в воді чи їх комбінації. Наступний виділений ад'ювант - це сіль металу в комбінації з іншим ад'ювантом. Перевагою є те, що ад'ювант - це Toll подібний агоніст рецептору, зокрема агоніст Toll подібного рецептору 2, 3, 4, 7, 8 чи 9, чи сапоніну, зокрема Qs21. Наступною перевагою є те, що ад'ювантна система містить два чи більше ад'ювантів зі списку, наведеного вище. Зокрема комбінації переважно містять сапонін (зокрема Qs21) ад'ювант та/або агоніст Toll подібного рецептору 9, такий як CpG, що містить олігонуклеотид імуностимулятору. Інші прийнятні комбінації містять сапонін (зокрема Qs21) та агоніст Toll подібного рецептору 4, такий як монофосфорил ліпід А чи його 3 деацильовані похідні, 3D-MPL, або містять сапонін (зокрема Qs21) та ліганд Toll подібного рецептору 4, такий як, алкил глюкозамінід фосфат.

Особливо прийнятними ад'ювантами є комбінації 3D-MPL та QS21 (EP 0671948 B1), емульсії олія в воді, що містить 3D-MPL та QS21 (WO 95/17210, WO 98/56414), чи 3D-MPL, формульований з іншими носіями (EP 0689454 B1). Інші прийнятні ад'ювантні системи містять комбінацію 3D-MPL, QS21 та CpG олігонуклеотид як описано в US6558670, US6544518.

У втіленні ад'ювант є (або містить) лігандом Toll подібного рецептору (TLR) 4, переважно агоністом, таким як ліпід А похідна зокрема монофосфорил ліпід А чи особливо 3 Деацильований монофосфорил ліпід А (3D-MPL).

3D-MPL є доступним від GlaxoSmithKline Biologicals North America та спочатку сприяє відгукам CD4+ Т клітини з IFN- $\gamma$  (Th1) фенотипу. Він може бути виготовленим згідно до методів розкритих в GB 2220211 А. Хімічно це є суміш 3-деацельованого монофосфорил ліпід А з 3, 4, 5 чи 6 ацильованими ланцюгами. Переважно в композиціях даного винаходу використовують малу частинку 3D-MPL. Мала частинка 3D-MPL має розмір частинки, такий що вона може бути стерильно фільтрована через фільтр з розміром пор 0,22 мкм. Такі процедури приготування описані в Міжнародній Патентній Заявці No. WO 94/21292. Синтетичні похідні ліпід А відомі та мається на увазі, що існують агоністи TLR 4, що включають, але не обмежуються цим:

ОМ 174 (2-деокси-6-о-[2-деокси-2-[(R)-3-додеканоїл окситетра-деканоїл аміно]-4-о-фосфоно-п-D-глюкопіранозил]-2-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]- $\alpha$ -D-

глюкопиранозилдигідрофосфат), (WO 95/14026)

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-5-аза-9(R)-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол,1,10-біс(дигідрофосфат) (WO99 /64301 та WO 00/0462 )

OM 197 MP-Ас DP (3S-,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-оксо-5-аза-9-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол,1-дигідрофосфат 10-(6-аміногексаноат) (WO 01/46127)

Інші TLR4 ліганди, які можуть використовуватись, - це алкіл Глюкозамінід фосфати (AGPs), такі як ті, що розкриті в WO9850399 чи US6303347 (процеси для приготування AGPs також розкриті), чи фармацевтично прийнятні солі AGPs як розкрито в US6764840. Деякі AGPs є TLR4 агоністами, а деякі є TLR4 антагоністами. Вважається, що обидва є корисними як ад'юванти.

Іншим прийнятним для використання імуностимулятором в даному винаході є Quil A та його похідні. Quil A - це приготування сапоніну виділенням з Південно Американського дерева Quillaja Saponaria Molina та вперше був описаним як маючий ад'ювантну активність Dalsgaard та інш. в 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p. 243-254). Очищені фрагменти Quil A виділені методом ВЕРХ, який зберігає активність ад'юванту без токсичності, асоційованої з Quil A (EP 0362278), наприклад QS7 та QS21 (також відомими як QA7 та QA21). QS-21 - це природний сапонін, виділений з кори Quillaja saponaria Molina, що виробляє CD8+ цитотоксичні Т клітини (CTLs), Th1 клітини та домінуючий IgG2a відгук антитіл та є прийнятним сапоніном в контексті даного винаходу.

Особливі формулювання QS21 описані, які зокрема прийнятніші формулювання надалі містять стерин (WO 96/33739). Сапоніни, що формують частину даного винаходу можуть бути виділені в формі міцел, суміші міцел (переважно, але не виключно з солей жовчі) чи можуть бути в формі ISCOM матриць (EP 0109942 B1), ліпосом або колоїдних структур, таких як хробокоподібні чи кільцеподібні multimeric комплекси або ліпідні/шарові структури та пластинки, які утворені холестерином та ліпідом, чи в формі емульсії олія в воді (наприклад, як в WO 95/17210). Сапоніни переважно можуть бути асоційованими з сіллю металу, такою як гідроксид алюмінію чи фосфат алюмінію (WO 98/15287).

Переважаю сапонін присутній в формі ліпосом, ISCOM або емульсії олії у воді.

Розширена система включає комбінацію монофосфорил ліпиду А (або детоксикований ліпід А) та похідну сапоніну, зазвичай комбінація QS21 та 3D-MPL як розкрито в WO 94/00153, чи менш реакційногенна композиція, де QS21 пригнічують холестерином як розкрито в WO 96/33739. Зазвичай композиція ефективного ад'юванту, включаючи токоферол з або без QS21 та/або 3D-MPL в емульсії олії у воді описані в WO 95/17210. В одному

втіленні імуногенна композиція додатково містить сапонін, який може бути QS21.

Також використовують олігонуклеотиди імуностимулятору чи будь-якого іншого агоністу Toll-подібного рецептору (TLR) 9. Прийнятними для використання олігонуклеотидами в ад'ювантах чи вакцинах даного винаходу є CpG, що містить олігонуклеотиди, переважно ті, що включають два або більше фрагменти динуклеотиду CpG, виділені щонайменш трьома, більш переважно щонайменш шістьма чи більше нуклеотидами. Фрагментом CpG є Цитозин нуклеотид наступного Гуанін нуклеотидом. CpG олігонуклеотиди даного винаходу тиново є деоксинуклеотидами. В представленому втіленні винаходу інтернуклеотид в олігонуклеотиді є фосфородііоатом, чи більш переважно зв'язаним фосфоротіоатом, хоча фосфородіестер та інші зв'язки інтернуклеотиду знаходяться в межах винаходу. Також в межі винаходу включені олігонуклеотиди зі змішаними інтернуклеотидними зв'язками. Методи для вироблення фосфоротіоатних олігонуклеотидів чи фосфородііоатів описані в US5,666,153, US5,278,302 та WO 95/26204.

Приклади прийнятих олігонуклеотидів мають наступні послідовності. Послідовності переважно містять інтернуклеотидні зв'язки модифікованого фосфоротіоату.

OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

Альтернативні CpG олігонуклеотиди можуть містити прийнятні послідовності наведені вище, в яких вони мають непослідовні делеції або їх додавання.

CpG олігонуклеотиди використані в даному винаході можуть бути синтезовані будь-яким відомим фахівцям методом (наприклад діїсь EP 468520). Просто такі нуклеотиди можуть бути синтезовані використовуючи автоматичний синтезатор.

Ад'ювант може бути емульсією олії в воді чи може містити емульсією олії в воді в комбінації з іншими ад'ювантами. Олійна фаза емульсійної системи переважно містить метаболізовану олію. Мається на увазі, що термін метаболізована олія добре відома фахівцям. Метаболізована може визначатися як "здатна до трансформування метаболізмом" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25<sup>th</sup> edition (1974)). Олія може бути будь-якою рослинною олією, риб'ячим жиром, тваринним чи синтетичним жиром, який не є токсичним до рецепієнту та здатний до трансформування метаболізмом. Горіхи, насіння та зерно є

загальними джерелами рослинних олій. Синтетичні олії є також частиною цього винаходу та можуть включати комерційно прийнятні олії, такі як NEOBEE® та інші. Сквален (2,6,10,15,19,23-Гесаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаен) - це ненасичена олія, яка знайдена у великій кількості в жирі печінки акули, та в меншій кількості в олії оливи, олії зародишів пшениці, олії висівок рису та дріжджах, та є зазвичай прийнятною олією для використання в цьому винаході. Сквален є метаболізованою олією гарної якості по факту, що вона є інтермедіатом в біосинтезі холестерину (Merck index, 10<sup>th</sup> Edition, entry no.8619).

Токоли (наприклад, вітамін Е) також часто використовують в олійних емульсіях ад'ювантів (EP 0382271 B1; US5667784; WO 95/17210). Токоли використані в олійних емульсіях (переважно емульсіях олій у воді) винаходу можуть бути зформовані як описано в EP 0382271 B1, в якому токоли можуть бути дисперсіями краплинок токолу, що необов'язково містять емульгатор, переважно менше за 1 мікрон в діаметрі. Альтернативно, токоли можуть використовувати в комбінації з іншими оліями, для формування олійної фази олійних емульсій. Приклади олійних емульсій, які можуть використовуватися в комбінації з токолом описані тут, такі як метаболізовані олії описані вище.

Вважається, що ад'юванти емульсії олій у воді використовують як ад'ювантні композиції (EP 0399843 B), композиції емульсій олій у воді та інші активні агенти, що описані як ад'юванти для вакцин (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Також описані інші олійні емульсії, такі як емульсії води в олії (US 5,422,109; EP 0480982 B2) емульсії води в олії у воді (US 5,424,067; EP 0480981 B). Всі, з яких утворюють прийнятні системи олійних емульсій (зокрема, коли включають токоли) для формування ад'ювантів та композицій даного винаходу.

Найбільш прийнятні олійні емульсії (наприклад емульсії олій у воді) надалі міститимуть емульгатор такий як TWEEN 80 та/або стерин такий як холестерин. Прийнятні олійні емульсії (переважно емульсія олій у воді) містить метаболізовану, нетоксичну олію, такі як сквален, скваєн чи токоферол, такий як альфа токоферол (та переважно обидва скваєн та альфа токоферол) та необов'язково емульгатор (сурфактант ПАР), такий як TWEEN 80. Також може входити до складу стерин (переважно холестерин).

Метод приготування емульсій олій у воді добре відомий фахівцям даної галузі. Взагалом метод включає змішування олійних фаз, що містять токоли, з сурфактантом (ПАР), таким як розчин PBS/TWEEN80™, наступну гомогенізацію з використанням гомогенізатору, фахівцям даної галузі було б зрозуміло, що метод, який включає проходження подвійної суміші через голку шприця, був би прийнятним для гомогенізації малих об'ємів рідини. В рівній мірі, процес емульсифікації в мікрофлюїдизері (M110S Microfluidics machine, максимум 50 переходів, для періоду 2 хвилини при максимальному тиску на вході 6 бар (тиск на виході близько 850 бар)) міг би бути адаптованим фахівцями даної галузі для приготування менших чи

більших об'ємів емульсії. Адаптація може бути досягнена шляхом експериментування, включаючи виміри емульсії, що утворюється в результаті, доки приготування буде досягнуте краплинами олії необхідного діаметру.

В емульсії олія у воді, олія та емульгатор повинні бути у водному носіїві. Водним носієм може бути, наприклад, фосфатний буфер саліну. Розмір краплин олії, виявлений в стабільній емульсії олій у воді переважно менше за 1 мікрон, може знаходитись в діапазоні в основному 30-600 нм, переважно близько 30-500 нм в діаметрі, та зокрема близько 150 нм в діаметрі, як виміряно методом фотонної кореляційної спектроскопії. В такому сенсі, 80% крапель олії за кількістю були б з прийнятними межами, більш прийнятно більше за 90% та найбільш прийнятно більше за 95% крапель олій за кількістю є з визначеними критеріями розміру. Кількості компонентів присутніх в олійних емульсіях даного винаходу умовні в межах від 0,5-20% чи 2 до 10% олій (від загальної дози об'єму), такої як сквален; та коли присутні від 2 до 10% альфа токоферолу; від 0,3 до 3% сурфактанту (ПАР), такого як поліоксиетилен сорбітан моноолеат. Переважно співвідношення олія (переважно сквален):токол (переважно  $\alpha$ -токоферол) дорівнює або менше за 1, так як це забезпечує більшу стабільність емульсії. Емульгатор, такий як TWEEN 80 чи Span 85 може також бути присутнім на рівні близько 1%. В деяких випадках можливо вигідно, щоб вакцини даного винаходу надалі містили стабілізатор.

Приклади прийнятних емульсійних систем описані в WO 95/17210, WO 99/11241 та WO 99/12565, які розкривають ад'юванти емульсії, що ґрунтуються на сквалені,  $\alpha$ -токоферолі та TWEEN 80, необов'язково сформульованими з імуностимуляторами QS21 та/або 3D-MPL. Таким чином, зокрема в прийнятних втіленнях даного винаходу, ад'ювант винаходу може додатково містити наступні імуностимулятори, такі як LPS чи його похідні, та/або сапоніни. Приклади наступних імуностимуляторів описані тут та в "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X.

У втіленні, якому надається перевага, ад'ювант та імуногенні композиції згідно з винаходом містять сапонін (переважно QS21) та/або LPS похідні (переважно 3D-MPL) в олійній емульсії, описаній вище, необов'язково зі стерином (переважно холестерин). До того ж олійна емульсія (переважно емульсія олій у воді) може включати спан 85 та/або лецитин та/або трикаприлін. Ад'юванти, що містять емульсію олія у воді, стерин та сапонін описані в WO 99/12565.

Типово для введення людині сапонін (переважно QS21) та/або LPS похідні (переважно 3D-MPL) будуть присутні в дозі для людини імуногенної композиції в межах 1мкг-200 мкг, такий як 10 мкг-100 мкг, переважно 10 мкг-50 мкг на дозу. Типово олійна емульсія (переважно емульсія олій у воді) міститиме від 2 до 10% метаболізованої олії. Переважно вона міститиме від 2 до 10% сквалену,

від 2 до 10% сс-токоферолу та від 0,3 до 3% (переважно 0,4-2%) емульгатору (переважно TWEEN 80 [поліоксиетилен сорбітан моноолеат]). У випадку, коли присутні як сквален так і альфа токоферол, прийнятне співвідношення сквален:альфа токоферол дорівнює або менше за 1, так як це забезпечує більшу стабільність емульсії. Спан 85 (Сорбітан триолеат) також може бути присутнім в емульсії, що використовується у винаході, на рівні від 0.5 до 1%. В деяких випадках, можливо корисно, щоб імуногенні композиції та вакцини даного винаходу надалі містили стабілізатор, наприклад, інші емульгатори/сурфактанти (ПАР), включаючи каприлову кислоту (merck index 10<sup>th</sup> Edition, entry no. 1739), з яких особливо прийнятний Трикаприлін.

У випадку, коли сквален та сапонін (переважно QS21) входять до складу, корисно, щоб і стерин (переважно холестерин) також включався у композицію, це сприяє зниженню загального рівня олії в емульсії. Це призводить до зниження вартості виробництва, покращення загальної зручності вакцини, а також якісного та кількісного покращення результуючого імунного відгуку, такого як вдосконаленого IFN- $\gamma$  вироблення. Відповідно ад'ювантна система даного винаходу зазвичай містить співвідношення метаболізована олія:сапонін (м/м) в межах від 200:1 до 300:1, також даний винахід може бути використаним в «низько олійній» формі прийнятний діапазон якої становить від 1:1 до 200:1, переважно від 20:1 до 100:1, найбільш переважно по суті 48:1, ця вакцина зберігає корисні ад'ювантні властивості всіх компонентів, з набагато зниженим реакційногенним профілем. Згідно втілень, які мають особливі переваги, співвідношення сквален:QS21 (м/м) знаходиться в межах від 1:1 до 250:1, також прийнятні межі становлять від 20:1 до 200:1, переважно від 20:1 до 100:1, найбільш переважно по суті 48:1. Переважно стерин (найбільш прийнятно холестерин), також включений до складу, присутній у співвідношенні сапонін:стерин, як описано тут.

Емульсійні системи даного винаходу переважно мають невеликий об'єм олійних крапель в суб-мікронному діапазоні. Найбільш прийнятними розмірами олійних крапель будуть в межах від 120 до 750 нм, а найбільш прийнятний 120-600 нм в діаметрі.

Особливо ефективна ад'ювантна композиція (для первинної комбінації AIPO4 в імуногенній композиції винаходу) включає сапонін (переважно QS21), LPS похідні (переважно 3D-MPL) та олійна емульсія (переважно сквален та альфа токоферол в емульсії олія у воді) як описано в WO 95/17210 та в WO 99/12565 (зокрема ад'ювантна композиція 11 в Прикладі 2, Таблиця 1).

Приклади TLR 2 агоністу включають пептидоглікан чи ліпопротеїн. Імідазохіноліни, такі як Іміквімод та Резіквімод відомі TLR 7 агоністи. Одиначний ланцюг РНК також відомий TLR агоніст (TLR 8 у людини та TLR 7 у мишей), тоді як подвійний ланцюг РНК та полі ІС (поліінозинополіцитидилова кислота - комерційний синтетичний міметик вірусної РНК) є типовими TLR 3 агоні-

стами. 3D-MPL є прикладом TLR 4 агоністу доки CPG є прикладом TLR 9 агоністу.

Імуногенна композиція може містити антиген та імуностимулятор адсорбований на солі металу. Композиції вакцини, що ґрунтуються на алюмінію, де антиген та імуностимулятор 3-де-О-ацильований монофосфорил ліпід А (3D-MPL), адсорбовані на однакових частках описаних в EP 0576478 B1, EP 0689454 B1, та EP 0633784 B1. В цих випадках надалі антиген адсорбується першим на сіль алюмінію, з наступною адсорбцією імуностимулятору 3D-MPL на ту ж сіль алюмінію. Такі процеси, по-перше, включають суспензування 3D-MPL під дією ультра звуку в водяній бані до утворення часток розміром від 80 до 500 нм. Зазвичай антиген адсорбується на солі алюмінію протягом однієї години при кімнатній температурі та перемішуванні. Після чого 3D-MPL суспензія додається до адсорбованого антигену, та композиція інкубується протягом 1 години, а потім зберігається до використання при 4°C.

В іншому процесі, імуностимулятор та антиген знаходяться на окремих частинках металу як описано в EP 1126876. Вдосконалений процес містить адсорбцію імуностимулятору на частину солі металу, наступну адсорбцію антигену на іншу частину солі металу, з наступним змішуванням окремих частин металу до утворення вакцини. Ад'ювант для використання в даному винаході може бути ад'ювантом композиції, що містить імуностимулятор, адсорбованим на частині солі металу, що характеризується тим, що частина солі металу є в значній мірі вільною від іншого антигену. До того ж, вакцина забезпечується даним винаходом та характеризується тим, що імуностимулятор адсорбується на частинках солі металу, які в основному вільні від інших антигенів, та тим, що частинки солі металу, яка адсорбована антигеном в значній мірі вільна від іншого імуностимулятора.

Відповідно, даний винахід забезпечує ад'ювантну композицію, що містить імуностимулятор, який адсорбований на частині солі металу, що характеризується в композиції в основному відсутністю іншого антигену. Більш того, ад'ювантна композиція може бути інтермедіатом, якщо такий ад'ювант використовується, який є необхідним для виробництва вакцини. Відповідно, забезпечується процес виробництва вакцини, який включає змішування ад'ювантної композиції, що являє собою один або більше імуностимуляторів, адсорбованих на частині металу з антигеном. Переважно, антиген пре-адсорбується на солі металу. Згадана сіль металу може бути ідентичною або подібною до солі металу, яка адсорбується на імуностимуляторі. Переважно соллю металу є сіль алімінію, наприклад, Алюміній фосфат чи Алюміній гідроксид.

Даний винахід надалі забезпечує для вакцини композицію, що містить імуностимулятор адсорбований на першій частині солі металу, та антиген адсорбований на солі металу, що характеризується тим, що перша та друга частини солі металу є окремими частинами.

LPS або LOS похідні, чи мутації, чи похідні ліпиду А описані тут розроблені, щоб проявляти меншу токсичність (наприклад, 3D-MPL) ніж природні



ліпополісахариди та є взаємо замінними еквівалентами, що стосується будь-якого використання цих компонентів, описаних тут. Вони можуть бути TLR4 лігандами як описано вище. Інші такі похідні описані в WO020786737, WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO03065806.

В одному втіленні ад'ювант, використаний для композицій винаходу, містить носій ліпосом (виготовлений за відомими методиками з фосфоліпідів (таких як діолеоїлфосфатидил холін [DOPC]) та необов'язково стерин [такий як холестерин]). Такі носії ліпосом можуть транспортувати похідні ліпиду A[такий як 3D-MPL - дивись вище) та/або сапоніни (такі як QS21 - дивись вище). В одному втіленні ад'ювант містить (0.5 мл на дозу) 0.1-10 мг, 0.2-7, 0.3-5, 0.4-2, чи 0.5-1 мг (наприклад, 0.4-0.6, 0.9-1.1, 0.5 або 1 мг) фосфоліпиду (наприклад, DOPC), 0.025-2.5, 0.05-1.5, 0.075-0.75, 0.1-0.3, чи 0.125-0.25 мг (наприклад, 0.2-0.3, 0.1-0.15, 0.25 чи 0.125 мг) стерину (наприклад, холестерин), 5-60, 10-50, чи 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 чи 50 мкг) ліпиду A похідного (наприклад, 3D-MPL), та 5-60, 10-50, чи 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 чи 50 мкг) сапоніну (наприклад, QS21).

Цей ад'ювант є особливо прийнятним для композицій вакцин для людей похилого віку. В одному втіленні винаходу, вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант, містить сахаридні кон'югати, похідні щонайменш зі всіх наступних серотипів: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (а також можуть містити один або більше з серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титр GMC антитіла викликаний проти одного чи більше (або всіх) компонентів вакцини 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно нижчим за той, що викликаний Prevnar<sup>®</sup> вакциною в вакцинах для людей.

В одному втіленні, ад'ювант, використаний для композицій винаходу містить емульсію олії у воді, виготовлену з метаболізованої олії (такої як сквален), емульгатору (такого як TWEEN 80) та необов'язково токолу (такого як альфа токоферол). В одному втіленні винаходу, ад'ювант містить (на 0,5 мл дози) 0.5-15, 1-13, 2-11, 4-8, чи 5-6 мг (наприклад, 2-3, 5-6, чи 10-11 мг) метаболізованої олії (такої як сквален), 0.1-10, 0.3-8, 0.6-6, 0.9-5, 1-4, чи 2-3 мг (наприклад, 0.9-1.1, 2-3 чи 4-5 мг) емульгатору (такого як TWEEN 80) та необов'язково 0.5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 мг (наприклад, 11-13, 5-6, чи 2-3 мг) токолу (такого як альфа токоферол).

Цей ад'ювант надалі необов'язково може містити 5-60, 10-50, чи 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 чи 50 мкг) похідної ліпиду A (наприклад, 3D-MPL).

Ці ад'юванти особливо прийнятні для композицій вакцини для дітей (до 7 років) та людей похилого віку. В одному втіленні, вакцинна композиція, що містить цей ад'ювант, включає сахаридні кон'югати, похідні від щонайменш всіх наступних серотипів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (та можуть також містити один чи більше з серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титр GMC антитіла викликаний проти одного чи більше (або всіх) компонентів вакцини 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно

нижчим за той, що викликаний Prevnar<sup>®</sup> вакциною в вакцинах для людей.

Цей ад'ювант може необов'язково містити 0.025-2.5, 0.05-1.5, 0.075-0.75, 0.1-0.3, чи 0.125-0.25 мг (наприклад, 0.2-0.3, 0.1-0.15, 0.25 чи 0.125 мг) стерину (наприклад, холестерину), 5-60, 30 10-50, чи 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 чи 50 мкг) похідної ліпиду A (наприклад, 3D-MPL), та 5-60, 10-50, чи 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 чи 50 мкг) сапоніну (наприклад, QS21).

Цей ад'ювант є особливо прийнятним для композицій вакцин для людей похилого віку. В одному втіленні винаходу, вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант, містить сахаридні кон'югати, похідні з щонайменш всіх наступних серотипів: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (а також можуть містити один або більше з серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титр GMC антитіла викликаний проти одного чи більше (або всіх) компонентів вакцини 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно нижчим за той, що викликаний вакциною Prevnar<sup>®</sup> в вакцинах для людей.

В одному втіленні, ад'ювант, використаний для композицій винаходу, містить фосфат алюмінію та похідну ліпиду A (таку як 3D-MPL). Цей ад'ювант може містити (на дозу 0,5 мл) 100-750, 200-500, чи 300-400 мкг Al як фосфату алюмінію, та 5-60, 10-50, чи 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 чи 50 мкг) похідну ліпиду A (наприклад, 3D-MPL).

Цей ад'ювант є особливо прийнятним для композицій вакцин для людей похилого віку та дітей (до 7 років). В одному втіленні винаходу, вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант, містить сахаридні кон'югати, похідні з щонайменш всіх наступних серотипів: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (а також можуть містити один або більше з серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титр GMC антитіла викликаний проти одного чи більше (або всіх) компонентів вакцини 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно нижчим за той, що викликаний вакциною Prevnar<sup>®</sup> в вакцинах для людей.

Приготування вакцини, що включає імуногенні композиції даного винаходу, можуть бути використані для захисту або лікування ссавців чутливих до інфекції способом введення згаданої вакцини соматичним шляхом чи крізь слизову оболонку. Ці введення можуть включати ін'єкції внутрішньом'язові, інтраперітонеальні, інтрадермальні чи підшкірні; або введення крізь слизову оболонку до орально-травного, дихального, сечостатевої тракти. Для лікування пневмонії чи середнього отиту надається перевага інтраназальному введенню вакцини (так як може більш ефективно запобігати назофаренгальному проникненню пневмококів, таким чином послаблення інфекції на ранніх стадіях). Хоча вакцина винаходу може вводитися як одноразова доза, її компоненти також можуть співавводитися в один і той же час або в різні періоди часу (наприклад, пневмококові сахаридні кон'югати могли б вводитися окремо, в один і той же час або через 1-2 тижні після введення будь-якої компоненти бактеріального протеїну вакцини для оптимальної координації імунного відгуку по відношенню

до кожного іншого). Для співведення необов'язковий Th1 ад'ювант може бути присутнім в будь-якій або всіх різних введеннях. На додаток до одноразового шляху введення, 2 різні шляхи введення можуть використовуватись. Наприклад, сахариди чи сахаридні кон'югати можуть бути введенні IM (або ID) та бактеріальні протеїни можуть бути введенні IN (або ID). До того ж вакцини винаходу можуть вводитися IM для первинних доз та IN для ревакцинуючих доз.

Вміст протеїнових антигенів у вакцині, як правило, знаходитиметься в межах 1-100 мкг, переважно 5-50 мкг, найбільш типово в межах 5-25 мкг. Після первинного вакцинування, люди можуть отримувати одну або декілька імунізацій в задовільний проміжок часу.

Приготування вакцини в основному описане в Vaccine Design ("The subunit and adjuvant 10 approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Інкапсуляція з ліпосомами описана Fullerton в US Patent 4,235,877.

Вакцини даного винаходу можуть зберігатися в розчинах або ліофілізованими. Переважно розчин ліофілізують в присутності цукру, такого як цукроза або лактоза. Надалі все ще надається перевага, коли вони ліофілізуються та відновлюються безпосередньо перед використанням. Ліофілізат може бути результатом в більш стабільній композиції (вакцині) та можливо може призводити до більш високих титрів антитіл в присутності 3D-MPL та відсутності алюмінію основного ад'юванту.

В одному втіленні винаходу забезпечується кіт вакцини, що містить флакон, який містить імунногенну композицію за винаходом, необов'язково в ліофілізованій формі, та додатково включає флакон, який містить ад'ювант як описано тут. Передбачено, що в цьому втіленні винаходу, ад'ювант буде використаним для відновлення ліофілізованої імунногенної композиції.

Хоча вакцини даного винаходу можуть вводитись будь-яким способом, введення описаних вакцин в шкіру (ID) формує окреме втілення даного винаходу. Шкіра в людини містить зовнішню "глубу" кутикулу, названу ороговілим шаром, яка вкриває епідерміс. Внизу цього епідермісу є шар, названий дермісом, який по черзі вкриває підшкірові тканини. Дослідники показали, що ін'єкція вакцини в шкіру, зокрема в дерміс, стимулює імунний відгук, який може також бути асоційованим з рядом додаткових переваг. Інтрадермальна вакцинація з вакцинами, описаними тут, формує характерну ознаку даного патенту.

Традиційно методика інтрадермальної ін'єкції, "реакція Манту", містить стадії очищення шкіри, а потім витягнення однієї руки, та зі скосом вузького калібру голки (26-31 калібр) стоячи лицем до пацієнта вводиться голка знизу вверх під кутом близько 10-15°. Скос голки вводиться, розширена частина опускається та надалі під невеликим тиском вакцина вводиться під шкіру. Рідина потім введена дуже повільно утворює пухирець чи бульбашку на поверхні шкіри, з наступним повільним витягуванням голки.

Недавно описані винаходи, що розроблені особливо для введення рідини в або перехресно

шкіру, наприклад, винаходи описані в WO 99/34850 та EP 1092444, також описані винаходи вприскування ін'єкції, наприклад в WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 та WO 97/13537. Альтернативні методи інтрадермального введення препаратів вакцини можуть включати традиційні шприці та голки, чи винаходи, розроблені для балістичної доставки твердих вакцин (WO 99/27961), чи трансдермальні "петчі" (WO 97/48440; WO 98/28037); чи використаний до поверхні шкіри (трансдермальна або підшкірна доставка WO 98/20734 ; WO 98/28037).

Коли вакцини даного винаходу вводиться через шкіру, чи більш точніше в дерміс, то вакцина є в невеликому об'ємі рідини, зокрема об'єм близько від 0,05 мл до 0,2 мл.

Вміст антигенів в шкірних чи інтрадермальних вакцинах даного винаходу може бути подібним до традиційних доз як визначено у внутрішньомішечних вакцинах (дивись вище). Однак є характерна особливість шкірних чи інтрадермальних вакцин, що композиції можуть бути "низькою дозою". Відповідно протеїнові антигени в „низьких дозах” вакцин переважно присутні в таких малих кількостях як від 0,1 до 10мкг, переважно від 0,1 до 5 мкг на дозу; та сахаридні (переважно кон'юговані) антитіла можуть бути присутніми в межах 0,01-1 мкг, та переважно від 0,01 до 0,5 мкг сахариду на дозу.

Як використано тут, термін "інтрадермальна доставка" означає доставку вакцини в область дермісу в шкірі. Однак, вакцина необов'язково знаходиться виключно в дермісі. Дерміс - це шар шкіри, розташований між близько 1.0 та близько 2.0 мм від поверхні шкіри людини, але існують варіації точної кількості між індивідуумами та в різних частинах тіла. Дерміс розташований між ороговілим шаром та епідермісом при поверхні та підшкірним шаром нижче. В залежності від способу доставки, вакцина може в кінці кінців розташовуватися виключно чи першочергово в дермісі, або вона може в кінці кінців розподілятися в епідермісі та дермісі.

Даний винахід надалі забезпечує вдосконалену вакцину для попередження чи покращення стану у випадках середнього Отиту Haemophilus influenzae додаванням протеїнів Haemophilus influenzae, наприклад, протеїн D у вільній чи кон'югованій формі. Крім того, даний винахід надалі забезпечує вдосконалену вакцину для попередження чи покращення стану при пневмококовій інфекції у дітей (наприклад, середній Отит), сподіваючись на додавання одного чи двох пневмококових протеїнів як вільного чи кон'югованого протеїну до S. pneumoniae кон'югатної композиції винаходу. Згадані пневмококові вільні протеїни можуть бути подібними або відмінними до будь-яких S. pneumoniae протеїнів, використаних як носії-протеїнів. Один чи більше Moraxella catarrhalis протеїнові антигени можуть також бути

включеними в комбінацію вакцини у вільній чи кон'югованій формі. Таким чином, даний винахід є покращеним методом викликання (захисного) імунного відгуку проти середнього Отиту у дітей.

В іншому втіленні, даний винахід є покращеним методом викликання (захисного) імунного відгуку проти середнього Отиту у дітей (визначеним як віком 0-2 роки в контексті даного винаходу) введенням безпечної та ефективної кількості вакцини винаходу [педіатрична вакцина]. Наступні втілення даного винаходу включають забезпечення композицій антигенного *S. pneumoniae* кон'югату винаходу для використання в медицині та використання *S. pneumoniae* кон'югатів винаходу у виробництві медикаментів для запобігання (чи лікування) пневмококових захворювань.

В ще іншому втіленні, даний винахід є покращеним методом викликання (захисного) імунного відгуку середнаселення похилого віку (в контексті даного винаходу, пацієнти вважаються похилого віку, якщо їх вік становить 50 років чи старше, як правило понад 55 років, а більш точно понад 60 років) введенням безпечної та ефективної кількості вакцини винаходу, переважно в кон'югації з одним або двома *S. pneumoniae* протеїнами, присутніми як вільний чи кон'югований протеїн, де вільні *S. pneumoniae* протеїни можуть бути подібними чи відмінними як будь-які *S. pneumoniae* протеїни, використані як носії-протеїни.

Наступним аспектом винаходу є спосіб імунізації людини господаря проти захворювання викликаного *S. pneumoniae* та необов'язково *Haemophilus influenzae* інфекціями, що містять введення до господаря імунозахисної дози імуногенної композиції чи вакцини чи кіта винаходу.

Наступним аспектом винаходу є імуногенна композиція винаходу для використання в лікуванні чи попередженні захворювання, викликаного *S. pneumoniae* та необов'язково *Haemophilus influenzae* інфекцією.

Наступним аспектом винаходу є використання імуногенної композиції чи вакцини чи кіта винаходу в виробництві медикаментів для лікування чи попередження захворювань, викликаних *S. pneumoniae* та необов'язково *Haemophilus influenzae* інфекцією.

Терміни "що містить", "містить" та "містять", тут мають на увазі заявниками, що необов'язково можуть бути заміненими на терміни "що складається з", "складається з" та "складаються з" відповідно в кожному випадку.

Втілення тут, що відносяться до "вакцинних композицій" винаходу є також придатними до застосування втіленнями, що відносяться до "імуногенних композицій" винаходу, та навпаки.

Всі посилання чи патентні заявки цитовані в описі винаходу цього патенту включаються посиланнями тут.

З метою кращого розуміння цього винаходу, наступні приклади наведені далі. Ці приклади наводяться з метою ілюстрації тільки, а не конструктивного обмеження об'єму винаходу будь-яким чином.

#### Приклади

##### Приклад 1: Експресія протеїну D

*Haemophilus influenzae* protein D 35  
Генетична будова для експресії протеїну D  
Вихідні матеріали

Протеїн D кодується ДНК

Протеїн D добре зберігається серед *H. influenzae* зі всіх серотипів та нетипових штамів. Вектор pHIC348, що містить ДНК послідовність, яка кодує цілий ген протеїну D, був отриманий Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Sweden. The DNA sequence of protein D has been published by Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

Вектор експресії pMG1

Вектор експресії pMG1 - це похідна від pBR322 (Gross et al., 1985), в яку був введений виведений бактеріофаг  $\lambda$ , що контролює елементи для транскрипції та трансляції чужерідних внесених генів (Shatzman et al., 1983). Крім того, стійкий до Ампіциліну ген був замінений на ген стійкий до Канаміцину.

*E. coli* штам AR58

*E. coli* штам AR58 був згенерований трансдукцією N99 з P1 фагом лінії попередньо вирощеної на SA500 похідній (galE::TN10, lambdaKil<sup>-</sup> cl857  $\Delta$ H1). N99 та SA500 - це *E. coli* K12 штамми, виведені в лабораторії Dr. Martin Rosenberg при National Institute of Health.

Вектор експресії pMG 1

Для виробництва протеїну D, ДНК, що кодує протеїн, був клонований, вектором експресії pMG 1. Цей плазмід використовує сигнали від лямбда-фагу ДНК, щоб керувати транскрипцією та трансляцією внесених чужерідних генів. Вектор включає промотор PL, оператор OL та два сайти використання (NutL та NutR), щоб допомогти ефектам транскрипційної полярності, коли забезпечується N протеїн (Gross et al., 1985). Вектори, що включають PL промотор, вводяться до *E. coli* лізогенного господаря для стабілізації плазмідну ДНК. Штами лізогенного господаря містять реплікаційно-дефектний лямбдафаг ДНК інтегрований в геном (Shatzman et al., 1983). Хромосомний лямбдафаг ДНК керує синтезом cl протеїну репресора, який зв'язується з OL репресором вектору та запобігає зв'язуванню РНК полімерази до PL промотору та таким чином здійснюється транскрипція введеного гену. Ген cl штаму експресії AR58 містить чутливі до температури мутанти, такі що PL направлена транскрипція може регулюватись зміною температури, тобто підвищення температури в культурі дезактивує репресор та ініціюється синтез чужерідного протеїну. Ця система експресії дозволяє контролювати синтези чужерідних протеїнів особливо тих, що можуть бути токсичними до клітини (Shimatata & Rosenberg, 1981).

*E. coli* штам AR58

AR58 лізогенний штам *E. coli*, використаний для виробництва протеїну D носію, - це похідна стандартного NIH *E. coli* K12 штаму N99 (F<sup>+</sup> su<sup>-</sup> galK2, lacZ<sup>-</sup> thr<sup>-</sup>). Він включає дефектний лізогенний лямбдафаг (galE::TN10, lambdaKil<sup>-</sup> cl857  $\Delta$ H1). Kil<sup>-</sup> фенотип запобігає ізолюванню синтезу макромолекули господаря. Мутація cl857 надає температурно чутливе пошкодження cl репресору.  $\Delta$ H1

делеція видаляє правий оперон лямбафагу та господаря bio, uvr3, та chlA loci. AR58 штам згенерований трансдукцією N99 з P1 фаговою лінією попередньо вирощеної на SA500 похідній (galE::TN10, lambdaKil<sup>-</sup> cl857 ΔH1). Введення дефектного лізогену в N99 було відібрано з тетрацикліну завдяки присутності TN10 транспозону, що кодує стійкість до тетрацикліну в сусідньому gale гені.

#### Будова вектору рMGMDPPrD

Вектор рMG1, який включає ген, що кодує неструктурний S1 протеїн вірусу грипу (рMGNSI), був використаний для будови рMGMDPPrD. Ген D протеїну був розширений PCR з рHC348 вектору (Janson et al. 1991 Infect. Immun. 59:119-125) з PCR праймерами, що містять NcoI та XbaI сайти рестрикції на 5' та 3' кінцях, відповідно. Фрагменти NcoI/XbaI потім вводилися в рMGNSI між NcoI та XbaI, таким чином утворюючи злитий протеїн, що включає N-термінальні 81 амінокислоти NS1 протеїну з наступним PD протеїном. Цей вектор vector маркується рMGNSI PrD.

Грунтуючись на будові описаній вище, генерується кінцева будова для експресії протеїну D. BamHI/BamHI фрагменти видаляються з рMGNSI PrD. Цей гідроліз ДНК видаляє NS1 кодуючу область, за виключенням перших трьох N-термінальних залишків. На регуляції вектору був згенерований ген, що кодує злитий протеїн з наступною N-термінальною амінокислотою послідовністю:

-----MDP SSHSSNMANT-----

NS1

Protein D

Протеїн D не містить лідерного пептиду або N-термінального цистеїну до яких нормально приєднані ліпідні ланцюги. Тому протеїн не є ні виділеним в періплазм ні ліпідованим та залишається в цитоплазмі в розчинній формі. Завершена будова рMG-MDPPrD вводиться в AR58 штам господаря різким нагріванням до 37°C. Плазмід, що містить бактерії, був відібраним в присутності канаміцину. Присутність протеїну D, що кодується введенням ДНК, було продемонстровано розщепленням ізольованого плазмиду ДНК з відібраних ендонуклеаз. Реконбінант E. coli штаму відомий як ECD4.

Експресія протеїну D знаходиться під контролем лямбда P<sub>L</sub> промотора/O<sub>L</sub> 10 оператора. Господар штаму AR58 включає температурно чутливий cl ген в геномі, який блокує експресію від лямбда P<sub>L</sub> при низькій температурі зв'язуванням з O<sub>L</sub>. Одноразово температура підвищується, cl виділяється з O<sub>L</sub> та протеїн Рекспресується.

#### Маломасштабне приготування

В кінці ферментації клітини концентруються і заморожуються.

Екстракція з зібраних клітин та очищення протеїну D була виконана наступним чином. Таблетка замороженої культури клітин відтаюється та перемішується в клітинно розривному розчині (цитратний буфер рН 6.0) до кінцевого OD<sub>600</sub>=60. Суспензія двічі пропускається через гомогенізатор високого тиску при P=1000 бар. Гомогенізована клітинна культура очищається центрифугуванням

та залишки клітин видаляються фільтрацією. На першій стадії очищення фільтрований лізат застоується до катіонно обмінної хроматографічної колонки (SP Sepharose Fast Flow). PD зв'язується з гелевою матрицею іонною взаємодією та ілююється на стадії зростання іонної сили ілююючого буферу, яким ілюють.

На другій стадії очищення домішки залишаються на аніон обмінній матриці (Q Sepharose Fast Flow). PD не зв'язується з гелем, та може збиратися в тоці через неї.

На обох стадіях колоночної хроматографії зібрані фракції контролюються методом OD. Поток, пропущений крізь аніон обмінну хроматографічну колонку, що містить, очищений протеїн D концентрується методом ультрафільтрації.

Протеїн D, що має обмежену здатність до утримання ультрафільтрацією, назавершення пропускається через мембрану з розміром пор 0,2 мкм.

#### Крупномасштабне приготування

Екстракція із зібраних клітин та очистка протеїну D виконували наступним чином. Зібраний бульон охолоджується й прямо двічі пропускається через гомогенізатор високого тиску при тиску близько 800 бар.

На першій стадії очищення гомогенізована клітинна культура розбавляється та застосовується до катіонно обмінної хроматографічної колонки (SP Sepharose Big beads). PD зв'язується з гелевою матрицею іонною взаємодією та ілююється на стадії зростання іонної сили ілююючого буферу, яким ілюють та фільтрують.

На другій стадії очищення домішки залишаються на аніон обмінній матриці (Q Sepharose Fast Flow). PD не зв'язується з гелем, та може збиратися з потоку, що проходить через неї.

На обох стадіях колоночної хроматографії зібрані фракції контролюються методом OD. Поток, пропущений крізь аніон обмінну хроматографічну колонку, що містить, очищений протеїн D концентрується та діафільтрується методом ультрафільтрації.

Протеїн D, що має обмежену здатність до утримання ультрафільтрацією, назавершення пропускається через мембрану з розміром пор 0,2 мкм.

#### Приклад 1b: Експресія PhtD

PhtD протеїн - це мембрана сімейства протеїнів гістидин-тріади, що характеризується присутністю гістидин-тріад (HXXHXXH фрагменту). PhtD є 838 аа-молекулою та несе 5 гістидинових тріад (дивись MedImmune WO00/37105 SEQ ID NO: 4 для амінокислотної послідовності та SEQ ED NO: 5 для ДНК послідовності). PhtD також включає апролін збагачену область в середині (позиції амінокислот 348-380). PhtD містить 20 аа-N-термінальну сигнальну послідовність з LXXC фрагментом.

#### Генетична будова

Генна послідовність зрілого MedImmune PhtD протеїну (від аа 21 до аа 838) була реконбінантно трансплантована до E. coli, використовуючи власний рTCMP14 вектор, що несе рLпромотор. E. coli штам господар - це AR58, який несе cl857 термо-

чутливий репресор, що дозволяє термо-індукцію промотора.

Ланцюгова реакція полімерази виконувалась для збільшення phtD гену з MedImmune плазмиду (що несе phtD ген з *Streptococcus pneumoniae* штаму Norway 4 (серотип 4) - SEQ ID NO: 5 як описано в WO 00/37105). Праймери, специфічні тільки для phtD гену, використовують для збільшення phtD гена на два фрагменти. Праймери несуть або NdeI та KpnI або KpnI та XbaI сайти рескрипції. Ці праймери не гібридизують з будь-яким нуклеотидом з вектору, але тільки з phtD специфічними генними послідовностями. Штучний ATG ініціюючий кодон вводили використовуючи перший праймер, що несе NdeI сайт рескрипції. Згенеровані PCR продукти потім вводили до pGEM-T клонуючого вектору (Promega), та підтверджували ДНК послідовність. Субклонування фрагментів в TCMР14 векторі експресії потім проводили використовуючи стандартні методики та вектор трансформували в AR58 *E. coli*.

#### Очищення PhtD

Очищення PhtD здійснювали наступним чином:

- Ріст *E. coli* клітин в присутності канаміцину: ріст 30 годин при 30°C потім індукція протягом 18 годин при 39.5°C

- Розрив *E. coli* клітин з цілої культури при OD +115 в присутності EDTA 5 mM та PMSF 2 mM як інгібіторів протеази: Rappie, 2 пассирування, 1000 бар.

- Захват антигену та відщеплення осколків клітин, що витрачався, настипали методом Ламінарної Q XL хроматографії при кімнатній температурі (20°C); колонку промивали 150 mM розчином NaCl+Empigen 0.25% pH 6.5 та елюювали 400 mM NaCl+Empigen 0.25% в 25 mM буфері фосфату калію pH 7.4.

- Фільтрували на Sartobran 150 картриджі (0.45+0.2мкм)

- Антиген зв'язуючий на Zn<sup>++</sup> хелатуючий Сефарозі методом FF IMAC хроматографії при pH 7.4 в присутності 5 mM розчину імідазолу при 4°C; колонку промивали 5 mM розчином імідазолу та Empigen 1% та елюювали 50 mM розчином імідазолу, обидва в 25 mM буфері фосфату калію pH 8.0.

- Слабка аніонно обмінна хроматографія в позитивному методі на Фрактогелі EMD DEAE при pH 8.0 (25 mM буфер фосфату калію) при 4°C; колонку промивали 140 mM розчином NaCl та елюювали 200 mM NaCl, в той час як забруднюючі речовини (протеїни та ДНК) залишилися адсорбованими на обміннику.

- Концентрація та ультрафільтрація з 2mM Na/K фосфату pH 7.15 на мембрані 50 кДа.

- Стерилізуюча фільтрація очищеного основного об'єму проводили на картриджі фільтру Millipak-20 0.2 µm.

#### Приклад 1с: Експресія пневмолізіну

Пневмококовий пневмолізін готували та детоксикували як описано в WO2004/081515 та WO2006/032499.

#### Приклад 2:

#### Приготування кон'югатів

Фахівцям добре відомо як виробляти очищені пневмококові полісахариди. Метою цих прикладів полісахаридів, головним чином, було зробити так, як описано в EP072513 чи близькими методами. Перед кон'югацією полісахариди можуть сортуватися за методом мікрофлюїдизації як описано нижче.

Активация та поєднання умов є специфічними для кожного полісахариду. Це наведено в Таблиці 1. Сортвані полісахариди (за виключенням PS5, 6B та 23F) розчиняли в 2M NaCl, 0.2M NaCl або у воді для ін'єкцій (WFI). Оптимальну концентрацію полісахариду визначали для кожного серотипу. Всі серотипи за виключенням серотипу 18C були кон'юговані безпосередньо до носію-протеїну як детально описано нижче. Два альтернативних кон'югата серотипу 22F були зроблені; один кон'югований безпосередньо, один через ADH лінкер. Зі стокового розчину концентрацією 100 мг/мл в ацетонітрилі чи розчині ацетонітрил/вода 50%/50%, CDAP (CDAP/PS відношення 0.5-1.5 мг/мг PS) додавали до розчину полісахариду. 1.5 хвилини пізніше, добавили 0.2M-0.3M NaOH для отримання специфічної активації pH. Активация полісахариду виконували при цій pH протягом 3 хвилин при 25°C. Очищений протеїн (протеїн D, PhtD, пневмолізін чи DT) (кількість залежить від початкового PS/носій-протеїн співвідношення) додавали до активованого полісахариду та проводили реакцію сполучення при специфічних pH протягом аж до 2 годин (в залежності від серотипу) при регулюванні pH. З метою блокування цианатних естерних груп, що не прореагували, додавали до суміші 2M розчин гліцину. pH регулювали стримуючи pH (pH 9.0). Розчин струшували протягом 30 хвилин при 25°C та потім всю ніч при 2-8°C продовжуючи слабе струшування.

#### Приготування 18C:

18C приєднаний до носію-протеїну через лінкер - гідразид адипінової кислоти (ADH). Полісахаридний серотип 18C мікрофлюїдизують перед кон'югацією.

#### Модифікування токсоду правцю EDAC

Для модифікування токсоду правцю, очищений ТТ розбавляли 25 мг/мл в 0.2M NaCl та додавали ADH спейсер з метою досягти кінцеву концентрацію 0.2M. Коли розчинення спейсеру завершилось, pH регулювали до 6.2. Потім додавали EDAC (1-етил-3-(3-діметил-амінопропіл)карбодіімід) для доведення кінцевої концентрації до 0.02M та струшували суміш протягом 1 години регулюючи pH. Реакцію конденсації зупиняли підвищенням pH аж до 9.0 протягом щонайменш 30 хвилин при 25°C.

Модифікований ТТ потім діалізували (10 кДа CO мембрана) з метою видалення залишкових ADH та EDAC реагенту.

ТТ<sub>АН</sub> об'єм в кінці стерильно фільтрували до стадії сполучення та зберігали при -70°C.

#### Хімічне сполучення ТТ<sub>АН</sub> до PS 18C

Деталі параметрів кон'югації наведені в Таблиці 1.

2 грами мікрофлюїдизованого PS розбавляли до певної концентрації у воді та доводили до 2M NaCl додаванням порошку NaCl.

CDAP розчин (100 мг/мл свіже приготовлений в 50/50 о/о ацетонітрил/WFI) додавали до досягнення прийнятного співвідношення CDAP/PS.

pH підвищували аж до активації pH 9,0 додаванням 0.3M NaOH та стабілізували при цьому pH до додавання TT<sub>АН</sub>.

Після 3 хвилин, модифікований TT<sub>АН</sub> (20 мг/мл в 0.2 M NaCl) додавали для досягнення співвідношення TT<sub>АН</sub>/PS 2; pH регулювали до pH 9.0. Розчин залишали на одну годину при регульованому pH.

Для блокування, 2M розчин гліцину додавали до суміші PS/TT<sub>АН</sub>/CDAP. pH регулювали стримуванням pH (pH 9.0).

Розчин струшували протягом 30 хвилин при 25°C, та потім залишали на всю ніч при 2-8°C продовжуючи слабе струшування.

PS22FАН-PhtD кон'югат

В другому методі кон'югації для цього сахариду (перший безпосередній метод кон'югації PS22-PhtD представлений в Таблиці 1), 22F приєднували до носію-протеїну через лінкер - гідразид адипінової кислоти (ADH). Полісахаридний серотип 22F мікрофлюїдували перед кон'югацією.

PS 22F модифікування

Активацію та сполучення виконували при 25°C при постійному струшуванні в температурно контрольованій водянній бані. Мікрофлюїдизований PS22F розбавляли до отримання кінцевої PS концентрації 6 мг/мл в 0.2M NaCl та розчин вивіряли до pH 6.05 ±0.2 розчином 0.1N HCl.

CDAP розчин (100 мг/мл свіже приготовлений в суміші ацетонітрил/WFI, 50/50) додавали до досягнення прийнятного співвідношення CDAP/PS (1.5/1мм).

pH підвищували аж до активації pH 9.00±0.05 додаванням 0.5M NaOH та стабілізували при цьому pH до додавання ADH.

Через 3 хвилини, ADH додавали до досягнення прийнятного співвідношення ADH/PS (8.9/1 м/м); pH регулювали до сполучення pH 9.0. Розчин залишали на 1 годину при регулюванні pH. PSaH похідна була концентрована та діалізована.

Сполучення.

PhtD 10 мг/мл в 0.2M NaCl додавали до PS22F<sub>АН</sub> похідної з метою досягнення співвідношення PhtD/PS22F<sub>АН</sub> 4/1 (м/м). pH доводили до 5.0±0.05 використовуючи HCl. Розчин EDAC (20 мг/мл в 0.1 M Tris-HCl pH 7.5) додавали вручну через 10 хвилин (250 мкл/хв) для досягнення 1 мг EDAC/мг PS22F<sub>АН</sub>. Кінцевий розчин інкубують протягом 150 хвилин (хоча 60 хвилин також використовують) при 25°C при струшуванні та регулюванні pH. Розчин нейтралізують додаванням 1M Tris-HCl pH 7.5 (1/10 від кінцевого об'єму) та залишили на 30 хвилин при 25°C.

Перед еліюванням на Сефакрилі S400HR, кон'югат освітлюють використовуючи 5 мкм Minisart фільтр.

Кон'югат, отриманий в результаті, має кінцеве співвідношення PhtD/PS 4.1 (м/м), вміст вільного PS нижче 1% та антигенність (а-PS/ст-PS) 36.3% та анти-PhtD антигенність 7.4%.

Очищення кон'югатів:

Кон'югати очищували гель фільтрацією використовуючи Сефакрил S400HR гель фільтраційну колонку урівноважену 0.15M NaCl (S500HR для 18C) для видалення малих молекул (включаючи DMAP) та некон'югованого PS та протеїну. Грунтуючись на різних розмірах молекул реакційних компонентів, PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-пневмолізіну чи PS-DT кон'югатів першими еліюють наступні вільний PS, потім вільний PD чи вільний DT та в кінці DMAP та інші солі (NaCl, гліцин).

Фракції, що містять кон'югати детектують UV<sub>280nm</sub>. Фракції об'єднують відповідно до їх Kd, стерильно фільтрують (0.22 мкм) та зберігають при +2-8°C. Визначають співвідношення PS/Протеїн в приготуваннях кон'югатів.

Специфічні активація/сполучення/блокування умов PS S. Pneumoniae-Протеїну D/TT/DT/PhtD/Plu кон'югатів

Де "мікрофлюїд" виникає в ряду головної частини, він виявляє, що сахариди сортували методом мікрофлюїдизації перед кон'югацією. Розміри сахаридів після мікрофлюїдизації наведені в Таблиці 2.

Таблиця 1

Специфічні умови активації/сполучення/блокування PS S. Pneumoniae-Протеїну D/TT/DT/PhtD/Plu кон'югатів

Серотип	1 мікрофлюїд	4 мікрофлюїд	5	6A	6B	7F мікрофлюїд
Ps конц., (мг/мл)	2.5	2.5	7.1	5.0	5.0	5.0
PS розчин	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц., (мг/мл)	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	10.0
Почат. Співвід. PD/PS (м/м)	1.5/1	1.5/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.50	0.50	0.79	0.83	0.83	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

Продовження таблиці 1

Серотип	9V мікрофлюїд	14 мікрофлюїд	18C мікрофлюїд	19A мікрофлюїд	19F мікрофлюїд	22F мікрофлюїд	23F
PS конц., (мг/мл)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	6.0	2.38
PS розчин	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0.2M	NaCl 2M
Носій-протеїн конц., (мг/мл)	10.0	10.0	20.0 (TT)	10.0 (Ply)	20.0 (DT)	10.0 (PhtD)	5.0
Початкове Носій- протеїн/PS Співвід. (м/м)	1.2/1	1.2/1	2/1	2.5/1	1.5/1	3/1	1/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	1.5	0.79
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0

Примітка: pH<sub>a</sub>, c, q відповідає pH активації, сполучення та блокування, відповідно.

#### Характеристика:

Кожен кон'югат був охарактеризованим та задовільняв вимогам, описаним в Таблиці 2. Вміст полісахариду (мг/мл) вимірювали резорциновим тестом, вміст протеїну вимірювали тестом Лоурі. Кінцеве PS/PD співвідношення (м/м) визначали співвідношенням концентрацій.

Вміст вільного полісахариду (%):

Вміст вільного полісахариду кон'югату, що зберігався при 4°C чи хранився 7 днів при 37°C, визначали на супернатанті, отриманого після інкубації з антитілами α-носію-протеїну та насичення сульфатом амонію, з наступним центрифугуванням.

α-PS/α-PS ELISA використовували для кількісного визначення вільного сахарину в супернатанті. Відсутність кон'югату також контролювали методом α-носію-протеїну/α-PS ELISA.

Антигенність:

Антигенність однакових кон'югатів аналізують в ELISA сендвіч-типу, де захват та детекція антитіл були α-PS та α-Протеїн, відповідно.

Вміст вільного протеїну (%):

Некон'югований носій-протеїн може бути відділеним з кон'югату під час стадії очистки. Вміст вільного залишкового протеїну визначали використовуючи розмір виключаючу хроматографію

(TSK 5000-PWXL) з наступним UV детектуванням (214nm). Умови елюювання дозволили відділити вільний носій-протеїн від кон'югату. Вміст вільного протеїну в об'ємах кон'югату потім визначали в порівнянні з калібровочною кривою (від 0 до 50 мкг/мл носію-протеїну). Вільний носій-протеїн у % був отриманий наступним чином: % вільний носій=(вільний носій (мкг/мл)/(загальна концентрація відповідного носію-протеїну вимірюного за методом Лоурі (мкг/мл)\*100%).

Стабільність:

Розподілення молекулярних мас (K<sub>av</sub>) та стабільність вимірювали HPLC-SEC гель фільтрацією (TSK 5000-PWXL) для кон'югатів, що зберігалися при 4°C та складувалися протягом 7 днів при 37°C.

10/11/13/14-валентна характеристика надана в Таблиці 2 (дивись коментарі нижче).

Протеїнові кон'югати можуть бути адсорбованими на фосфаті алюмінію та об'єднаними для утворення кінцевої вакцини.

Висновок:

Виготовлені імуногенні кон'югати, як показано, можуть входити до складу перспективних вакцин.

Таблиця 2

#### Характеристики кон'югатів

Кон'югати	Розмір PS (Да x10 <sup>3</sup> )	Співвід. носій/PS	Вільний PS (Elisa)	Вільний Носій	PS антигенність	Розмір Кон. (кДа)
PS1-PD	349-382*	1.5-1.6	1.0%-1.2%	3.9%-4.8%	87%-95%	1499-1715
PS4-PD	93-100*	1.5-1.6	4.7-6.5%	3.2%-4.0%	90%-96%	1303-1606
PS5-PD***	367-443	0.80	8.7-11.2%	2.2%-3.8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0.61	4.5%	Не робилось	45.9%	Не робилось
PS6B- PD***	1069-1391	0.7-0.8	1.3-1.6%	<2.0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1.1-1.2	<1%	<1.4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1.3-1.5	<1%	<1.3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1.4	<1%	<1.5%	70%	3430-3779
PS18C-TF	89-97*	2.2-2.4	1.5-2.2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-PIV*	151	3.2	<1%		29%	

Продовження таблиці 2

PS19F-DT	133-143*	1.4-1.5	4.1%-5.9%	<12%-<1.3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2.17	5.8	Не робилось	37%	Не робилось
PS22F-AHPhtD*	159-167	3.66-4.34	<1%	Не робилось	28-31%	Не робилось
PS23F-PD***	914-980	0.5	14-1.9%	3.7%-4.9%	137%-154%	2933-3152

Розмір PS після флюїдизації нативного PS

10 валентну вакцину виготовляли змішуванням серотипу 1, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F та 23F кон'югатів (наприклад, при дозі 1, 3, 1, 1, 1, '1, 1, 3, 3, 1 мкг сахариду, відповідно на дозу людини). 11 валентну вакцину виготовляли надалі додаванням серотипу 3 кон'югату з Таблиці 5 (наприклад, 1 мкг сахариду на дозу людини). 13 валентну вакцину виготовляли надалі додаванням серотипів 19А та 22F кон'югатів (22F або безпосередньо приєднаний до PhtD, або альтернативно через АДНлінкер) [наприклад, при дозі 3 мкг кожного сахариду на дозу людини]. 14 валентну вакцину виготовляли надалі додаванням серотипу 6А кон'югату вище [наприклад, при дозі 1 мкг сахариду на дозу людини].

Приклад 3: Очевидно, що приєднання *Haemophilus influenzae* протеїну D в імуогенній композиції винаходу можуть забезпечити покращений захист проти гострого середнього отиту (АОМ).

Вивчення проекту.

Дослідження використаної 11Pn-PD вакцини - що містить серотипи 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F та 23F кожен кон'югований до протеїну D з *H. influenzae* (посилання до Таблиці 5 в Прикладі 4). Об'єкти були рандомизовані на дві групи, щоб отримати чотири дози або 11Pn-PD вакцини або Navrix для віку близько 3, 4, 5 та 12-15 місяців. Всі об'єкти отримані GSK Біологічна Infanrix-hexa (DTPa-HBV-IPV/Hib) вакцина, що супроводжується в віці 3, 4 та 5 місяців. Infanrix-hexa - це комбінація Pediarix та Hib змішані перед введенням. Ефективність контролю "Відповідно-до-Протоколу" аналізів розпочинають 2 тижня після введення третьої дози вакцини та продовжують до 24-27 місячного віку. Назофаренгальне носійство *S. pneumoniae* та *H. influenzae* визначають у відібраних підмножинах об'єктів.

Батькам радять консультуватися у дослідників у разі, якщо діти захворіли, мають біль у вухах, спонтанну перфорацію барабанної мембрани чи спонтанні виділення з вух. Якщо дослідник підозрює випадок АОМ, спеціаліст отоларинголог (ЛОР) повинен негайно оглянути дитину для підтвердження діагнозу.

Клінічний діагноз АОМ ґрунтується на або візуальному зовнішньому вигляді барабанної мембрани (наприклад, почервоніння, розбухання, втрата світлових рефлексів) або присутністю рідини, що виділилася в середньому вусі (як показано простим або пневматичним отоскопом або мікроскопом). Крім того, щонайменш дві з наступних ознак чи симптомів повинні бути присутніми: вушний біль, виділення з вуха, втрата слуху, лихоманка, апатичність, дратівливість, анорексія, блювання, чи діарея. Якщо ЛОР спеціаліст підт-

вердив клінічний діагноз, тимпаноцераально збирають зразок рідини з середнього вуха для бактеріологічних тестів.

Для об'єктів з повторенням захворювання, новим АОМ випадком вважається початок, якщо більше ніж за 30 днів до початку мав місце попередній випадок. Крім того, вважається, що АОМ випадок є новим бактеріальним випадком, якщо виділяється бактерія/серотип відмінний від попередньо виділеного будь-якого проміжку між двома послідовними випадками.

Результати випробувань

Всього зареєстрували 4968 дітей, 2489 в групі 11Pn-PD та 2479 в контрольній групі. Основних відмінностей в демографічних характеристиках чи факторах ризику між двома групами не існувало.

Клінічні випадки та дефініція АОМ випадків

Протягом періоду виконання протоколу, всього було записано 333 випадки клінічного АОМ в 11Pn-PD групі та 499 в контрольній групі.

Таблиця 3 показує захисну ефективність 11Pn-PD вакцини та обох 7-валентних вакцин попередньо тестованих у Фінляндії (Eskola et al. N Engl J Med 2001; 344: 403-409 та Kilpi et al. Clin Infect Dis 2003 37:1155-64) проти будь-якого випадку АОМ та АОМ, викликаних різними пневмококовими серотипами, *H. influenzae*, NTHi та *M. catarrhalis*.

Статистично значуще та клінічно релевантне зниження до 33.6% від загальної АОМ важкості захворювань досягали з 11Pn-PD, незалежно від етіології (Таблиця 3).

Загальна ефективність проти АОМ випадків завдяки будь-якому з 11 пневмококових серотипів, включених до 11Pn-PD вакцини, складала 57.6% (Таблиця 3).

Іншим важливим рішенням в поточному дослідженні є 35.6% захист, забезпечений 11Pn-PD вакциною проти АОМ, викликаного *H. Influenzae* (та особливо 35.3% захист забезпечений NTHi). Це рішення є основним клінічним значенням, наданим зростанням важливості *H. influenzae* як основної причини АОМ у вакцині пневмококового кон'югату періоду. В лінії з захистом забезпеченим проти АОМ, 11Pn-PD вакцина також знижувала назофаренгальне носійство *H. influenzae* після дози активатора, на другому році життя. Ці рішення є, в протилежність до попередніх спостережень у Фінляндії, де обидві 7-валентні пневмококові кон'юговані вакцини, спостерігалось зростання АОМ випадків завдяки *H. influenzae*, (Eskola et al. and Kilpi et al.) як очевидність етіологічного заміщення.

Чітка кореляція між захистом проти АОМ випадків завдяки Hi та рівнями антитіл проти носію



протеїну D не могла бути встановлена, як пост-первинна анти-PD IgG концентрації антитіл в 11Pn-PD вакцинах, що залишкові Ні без AOM випадків, були по суті однаковими як пост-первинні рівні анти-PD IgG антитіл, визначені в 11Pn-PD вакцині, що виявлені щонайменш одним Ні AOM випадком протягом періоду ефективного контролю. Однак, хоча кореляція не могла бути встановлена між біологічним впливом вакцини та пост-первинною IgG анти-PD імуногенністю, відповідно допускається, що PD носій-протеїн, який добре зберігається серед *H. Influenzae* штамів, сприяв великим межах у введенні захисту Ні.

Вплив на AOM захворювання супроводжувався впливом назофарингеального носійства, що було подібним величині для вакцинного пневмококового серотипу та *H. influenzae* (Fig. 1). Це зниження назофарингеального носійства *H. influenzae* в PD-кон'югованих вакцинах підтримує

гіпотезу прямого захисного ефекту PD-кон'югованої вакцини проти *H. influenzae*, навіть, якщо захисна ефективність не могла корелювати з імунним відгуком анти-PD IgG, як визначено методом ELISA.

В наступному експерименті модель шиншолового середнього отиту була використана з пулами сироватки з імунізованих дітей з 11 валентною композицією цього прикладу чи з 10 валентною вакциною Прикладу 2 (дивись також Таблиці 1 та 2 та коментарі нижче). Обидві пули індують значне зниження відсотків тварин з середнім отитом порівняно з пулом до-імунної сироватки. Не існує значної різниці між 10 та 11 валентними імунними пулами. Це показує, що обидві вакцини мають подібну здатність до індукції захисту проти середнього отиту викликаного не типовими *H. influenzae* в цій моделі.

Таблиця 3

Тип випадку AOM	11Pn-PD					Prevnar в Fin OM <sup>(Eskola et al.)</sup>					7v-OMP в FinOM <sup>(Kilip et al.)</sup>				
	n		VE			n		VE			n		VE		
	11Pn-PD	Контроль	%	95%CI		7v-CRM	Контроль	%	95%CI		7v-OMP	Контроль	%	95%CI	
				LL	UL				LL	UL				LL	UL
N	2455	2452				786	794				805	794			
Будь-який AOM	333	499	33.6	20.8	44.3	1251	1345	6	-4	16	1364	1345	-1	-12	10
Будь-який AOM з MEF	322	474	32.4	19.0	43.6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10
Культура підтверджена пневмококами	92	189	51.5	36.8	62.9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37
Вакцинні пневмококові серотипи <sup>(*)</sup>	60	141	57.6	41.4	69.3	107	250	57	44	67	110	250	56	44	66
Інші бактеріальні патогени															
<i>H. influenzae</i>	44	68	35.6	3.8	57.0	315	287	-11	-34	8	315	287	-9	-32	10
Не типовий <i>H. influenzae</i> (NTHi)	41	63	35.3	1.8	57.4	НП	НП	НП	НП	НП	НП	НП	НП	НП	НП
<i>M. catarrhalis</i>	31	34	9.4	-52.5	46.1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2

НП = Не опубліковано; N = число об'єктів в ATP ефективності групи; n = число випадків

\* Вакцинні пневмококові серотипи: для 11Pn-PD = 11 серотипів, для Prevnar та 7v-OMP = 7 серотипів

MEF = Рідина середнього вуха

#### Приклад 4:

Відбір носій-протеїну для серотипу 19F

Використаний ELISA аналіз

22F інгібований ELISA метод по суті ґрунтується на аналізі, запропонованому в 2001 році Селсерсіон та Frasc, та була представлена Henckaerts et al., 2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360. Коротко, очищені пневмококові полісахариди змішували з метильованим сироваточним альбуміном людини та адсорбували на Nunc Maxisorp<sup>TM</sup> (Roskilde, DK) високо зв'язуючих мікротитрованих тарілках протягом всієї ночі при 4°C. Тарілки блокували 10% ембріональною бичачою сироваткою (FBS) в PBS протягом 1 години при кімнатній температурі з перемішуванням. Зразки сироватки розбавляли в PBS, що містить 10% FBS, 10 мкг/мл полісахариду оболонки клітини (SSI) та 2 мкг/мл пневмококового полісахариду серотипу 22F (ATCC), та надалі розбавляли на мікротитрованих тарілках тим самим буфером. Внутрішній калібрований еталон проти стандартної сироватки 89-SF, вико-

ристовуючи серотип-специфічні IgG концентрації в 89-SF, обробляли за тим самим методом та включали на кожну тарілку. Після промивання, зв'язані антитіла детектували, використовуючи пероксидаз-кон'юговане анти-людське IgG Моноклональне антитіло (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK), розбавлене в 10% FBS (в PBS), та інкубоване протягом 1 години при кімнатній температурі з перемішуванням. Колір проявляли використовуючи готовий до використання однокомпонентний кіт субстрату тетраметилбензидину пероксидаза ензимного імуноаналізу (BioRad, Hercules, CA, US) в темноті при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли використовуючи 0.18 M розчин H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, та оптичну густину зчитували при 450nm. Серотип-специфічні IgG концентрації (в мкг/мл) в зразках розраховували за точками еталонної оптичної густини з визначеними обмеженнями до внутрішньої еталонної сироваточної кривої, яка змодельована 4-параметровими логарифмічними рівняннями, розрахованими використовуючи програмне забезпечення SoftMax

Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Відрізок для ELISA складав 0.05 мкг/мл IgG для всіх серотипів беручи в розрахунок обмеження детекції та обмеження кількісного визначення.

#### Опософагоцитозний аналіз

На консультативній зустрічі ВОЗ в липні 2003, було рекомендовано використовувати OPA аналіз як викладено в Romero-Steiner et. al., Clin Diagn Lab Immunol 2003 10 (6): pp. 1019-1024. Цей протокол використовували для тестування OPA активності серотипів в наступних тестах.

#### Приготування кон'югатів

В дослідження 11Pn-PD&Di-001 та 11Pn-PD&Di-007 були включені три 11-валентні вакцинні композиції (Таблиця 4), в яких 3 мкг 19F полісахариду були кон'юговані до токсиду дифтерії (19F-DT) замість 1 мкг полісахариду кон'югованого до протеїну D (19F-PD). Параметри кон'югації для вивчення 11Pn-PD, 11Pn-PD&Di-001 та 11 Pn-PD&Di-007 представлені в Таблицях 5, 6 та 7, відповідно.

Відгуки анти-пневмококкового антитіла та OPA активність проти серотипу 19F протягом одного місяця після первинної вакцинації цими 19F-DT композиціями показані в Таблиці 8 та 9, відповідно.

Таблиця 10 показує 22F-ELISA концентрації антитіл та відсоток об'єктів, що досягають 0.2

мкг/мл поріг чутливості перед та після вакцинації 23-валентним чисто полісахаридним бустером.

Опософагоцитозна активність, як показано, є явно покращеною для антитіл, індукованих цими 19F-DT композиціями, як продемонстровано на вищих серопозитивних кривих (опософагоцитозні титри  $\geq 1:8$ ) та OPA GMT протягом одного місяця після первинної вакцинації (Таблиця 9). Один місяць після 23-валентної простої полісахаридної повторної вакцинації, опософагоцитозна активність 19F антитіл залишалася значно кращою для дітей, що піддавалися первинній дії антигену 19F-DT композицій (Таблиця 11).

Таблиця 12 представляє дані імуногенності після бустерної дози 11Pn-PD у дітей раннього віку, що попередньо піддавалися первинній дії 19F-DT чи 19F-PD кон'югатів, порівняно до 4-ої послідовної дози Pevnat®. Надані досягнення доповідалися після введення Pevnat® в США, що покращена опософагоцитозна активність проти серотипу 19F, який кон'югований до DT носію-протеїну, може мати перевагу для вакцини кандидата.

Таблиця 13 надає ELISA та OPA дані для 19F-DT кон'югату, що стосується крос-реактивного серотипу 19A. Знайдено, що 19F-DT індукує низьку, але достовірну OPA активність проти 19A.

Таблиця 4

Вважати композиції пневмококових кон'югатів, використані в клінічних випробуваннях

Композиція	Пневмококовий серотип мкг/носій-протеїн											A 3 <sup>+</sup>
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	<0.8
19F-DT Form 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/D	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/D	5/D	<0.35
19F-DT Form 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/D	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/D	5/D	<0,35
19F-DT Form 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/D	3/PD	=0.5

Таблиця 5

Специфічні умови активації/сполучення/блокування  
PS S. Pneumoniae-Протеїну D/TT/DT/PhtD/Ply кон'югатів

Серотип	1 нативний	3 мікрофлюїд	4 нативний	5 нативний	6B нативний	7F нативний
PS конц., (мг/мл)	1.5	2	2.0	7.5	5.5	3.0
PS розчин	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц., (мг/мл)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Почат. Співвід. PD/PS (м/м)	1/0.7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>d</sub>	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0
Час сполучення	60 хв	60 хв	45 хв	40 хв	60 хв	60 хв

Продовження таблиці 5

Серотип	9V нативний	14 нативний	18C нативний	19F нативний	23F нативний
PS конц., (мг/мл)	1.75	2.5	1.75	4.0	2.5
PS розчин	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц., (мг/мл)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Почат. Співвід. PD/PS (м/м)	1/0.75	1/0.75	1/1.2	1/1	1/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0
Час сполучення	60 хв	60 хв	45 хв	30хв	60 хв

Таблиця 6

Специфічні умови активації/сполучення/блокування  
PS S. Pneumoniae-Протеїну D/TT/DT/PhtD/Ply кон'югатів для вивчення 11Pn-PD&Di-001

Серотип	1 мікрофлюїд	3 мікрофлюїд	4 мікрофлюїд	5 мікрофлюїд	6B мікрофлюїд	7F нативний
PS конц., (мг/мл)	4	2.0	2.5	7.5	10	3.0
PS розчин	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц., (мг/мл)	10.0	5.0	5.0	5.0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5.0
Почат. Співвід. PD/PS (м/м)	1.2/1	1/1	1/1	1/1	1.5/1	1/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	1.50	0.75	1.5	2	1.5	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9/9/9
Час сполучення	60 хв	60 хв	60 хв	60 хв	60 хв	60 хв

Серотип	9V нативний	14 нативний	18C мікрофлюїд	19F мікрофлюїд	23F мікрофлюїд
PS конц., (мг/мл)	1.75	2.5	5.0	9.0	10
PS розчин	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Носій-протеїн конц., (мг/мл)	5.0	5.0	5.0	20 (DT)	10 (DT)
Почат. Співвід. Носій- протеїн/PS (м/м)	0.75/1	0.75/1	1.2/1	1.5/1	1.5/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.75	0.75	1.5	1.5	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
Час сполучення	60 хв	60 хв	30хв	60 хв	60 хв

Таблиця 7

Специфічні умови активації/сполучення/блокування  
PS S. Pneumoniae-Протеїну D/TT/DT/PhtD/Ply кон'югатів для вивчення 11Pn-PD&Di-007

Серотип	1 нативний	3 мікрофлюїд	4 нативний	5 нативний	6B нативний	7F мікрофлюїд
PS конц., (мг/мл)	1.5	2.0	2	7.5	5.5	5.0
PS розчин	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц., (мг/мл)	5.0	5.0	5.0	5.0	5	10
Почат. Співвід. PD/PS (м/м)	0.7/1	1/1	1	1/1	1/1	1.2/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9
Час сполучення	60 хв	60 хв	45 хв	40 хв	60 хв	60 хв

Продовження таблиці 7

Серотип	9V мікрофлюїд	14 мікрофлюїд	18C нативний	19F мікрофлюїд	19F мікрофлюїд	23F мікрофлюїд
PS конц., (мг/мл)	5.0	5.0	1.75	9.0	10.0	9.5
PS розчин	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Носій-протеїн конц., (мг/мл)	10	10.0	5.0	20 (DT)	5.0 (PD)	10
Почат. Співвід. Носій- протеїн/PS (м/м)	1.2/1	1.2/1	1.2/1	1.5/1	1.2/1	1/1
CDAP конц., (мг/мл PS)	0.5	0.75	0.75	1.5	0.75	0.75
pH <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>d</sub>	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
Час сполучення	60 хв	60 хв	45 хв	120 хв	120 хв	60 хв

Таблиця 8

Відсоток об'єктів з концентрацією 19F антитіл  $\geq 0.20$  мкг/мл та 19F середнє геометричне концентрації анти-тіл (GMC з 95% CI; мкг/мл) один місяць після первинної вакцинації 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Pevnar (2 мкг 19F-CRM) (Загальна категорія)

Група	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% $\geq 0.2$ мкг/мл (95% CI)	GMC (мкг/мл) (95% CI)	N	% $\geq 0.2$ мкг/мл (95% CI)	GMC (мкг/мл) (95% CI)
11Pn-PD	152	98.7 (95.3-99.8)	1.93 (1.67-2.22)	50	100 (92.9-100)	2.78 (2.31-3.36)
19F-DT форма 1 <sup>Г</sup>	146	99.3 (96.2-100)	2.88 (2.45-3.38)	-	-	-
19F-DT форма 2 <sup>Г</sup>	150	96.0 (91.5-98.5)	2.43 (2.01-2.94)	-	-	-
19F-DT форма 3 <sup>Г</sup>	-	-	-	50	96.0 (86.3-99.5)	3.70 (2.58-5.30)
Pevnar	148	98.6 (95.2-99.8)	2.98 (2.60-3.41)	41	97.6 (87.1-99.9)	2.91 (2.15-3.94)

<sup>Г</sup> комбінація різних композицій представлених в Таблиці 4.

Таблиця 9

Відсоток об'єктів з 19F OPA титром  $\geq 1:8$  та 19F OPA GMT один місяць після первинної вакцинації 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Pevnar (2 мкг 19F-CRM) (Загальна категорія)

Група	11Pn-PD&Di-001			11Pn-PD&Di-007		
	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	136	84.6 (77.4-90.2)	77.8 (58.1-104.4)	46	95.7 (85.2-99.5)	167.8 (118.1-238.6)
19F-DT форма 1 <sup>Г</sup>	137	95.6 (90.7-98.4)	263.2 (209.4-330.7)	-	-	-
19F-DT форма 2 <sup>Г</sup>	139	92.1 (86.3-96.0)	218.9 (166.5-287.9)	-	-	-
19F-DT форма 3 <sup>Г</sup>	-	-	-	49	91.8 (80.4-97.7)	403.1 (225.7-719.9)
Pevnar	131	86.3 (79.2-91.6)	82.6 (61.1-111.6)	38	81.6 (65.7-92.3)	65.0 (37.7-112.2)

<sup>Г</sup> комбінація різних композицій представлених в Таблиці 4.

Таблиця 10

Відсоток об'єктів з концентрацією 19F антитіл  $\geq 0.20$  мкг/мл та 19F антитіл GMC (мкг/мл) до та через один місяць після введення дітям 23-валентного чисто полісахаридного бустера дозою 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT чи Pevnar (2мкг 19F-CRM) (Загальна категорія)

Первинна група	11Pn-PD&Di-002 (22FELISA)					
	До бустерної вакцинації			Один місяць після 23-валентного PS бустеру		
	N	% $\geq 0.2$ мкг/мл (95% CI)	GMC (мкг/мл) (95% CI)	N	% $\geq 0.2$ мкг/мл (95% CI)	GMC (мкг/мл) (95% CI)
11Pn-PD	70	77.1 (65.6-86.3)	0.67 (0.45-0.98)	67	94.0 (85.4-98.3)	11.50 (7.76-17.03)
19F-DT форма 1 <sup>Г</sup>	68	91.2 (81.8-96.7)	0.71 (0.54-0.94)	69	98.6 (92.2-100)	14.50 (10.47-20.07)
19F-DT форма 2 <sup>Г</sup>	74	81.1 (70.3-89.3)	0.59 (0.43-0.80)	72	95.8 (88.3-99.1)	9.90 (6.74-14.54)
Pevnar	65	64.6 (51.8-76.1)	0.40 (0.27-0.60)	67	100 (94.6-100)	9.40 (6.95-12.71)

<sup>Г</sup> комбінація різних композицій представлених в Таблиці 4.

Таблиця 11

Відсоток об'єктів з 19F OPA титром  $\geq 1:8$  та 19F OPA GMT до та через один місяць після введення дітям 23-валентного чисто полісахаридного бустера дозою 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT чи Prevnar (2мкг 19F-CRM) (Загальна категорія)

Первинна група	11Pn-PD&Di-002					
	До бустерної вакцинації			Один місяць після 23-валентного PS бустеру		
	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27.6 (12.7-47.2)	10.9 (5.0-23.7)	28	82.1 (63.1-93.9)	408.0 (157.3-1058.3)
19F-DT форма 1 <sup>Г</sup>	19	47.4 (24.4-71.1)	18.1 (7.2-45.7)	18	94.4 (72.7-99.9)	1063.8 (386.6-2927.5)
19F-DT форма 2 <sup>Г</sup>	27	33.3 (16.5-54.0)	8.5 (4.7-15.3)	28	100 (87.7-100)	957.6 (552.8-1659.0)
Prevnar	24	12.5 (2.7-32.4)	8.1 (3.4-19.6)	23	82.6 (61.2-95.0)	380.9 (133.2-1089.5)

<sup>Г</sup> комбінація різних композицій представлених в Таблиці 4.

Таблиця 12

Відсоток об'єктів з концентрацією антитіл  $\geq 0.2$  мкг/мл, OPA  $\geq 1:8$  та GMC/GMT проти 19F пневмококів через один місяць після введення дітям 11Pn-PD чи Prevnar бестеру дозою 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT чи Prevnar (2мкг 19F-CRM) (Загальна категорія)

Первинна група	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA аналіз			OPA аналіз		
	N	$\geq 0.2$ мкг/мл (95% CI)	GMC (мкг/мл) (95% CI)	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	100 (94.9-100)	4.52 (3.7-5.5)	21	100 (83.9-100)	255.6 (135.5-481.9)
19F-DT форма 1 <sup>Г</sup>	66	98.5 (91.8-100)	3.45 (2.8-4.3)	23	95.7 (78.1-99.9)	374.0 (192.6-726.2)
19F-DT форма 2 <sup>Г</sup>	70	98.6 (92.3-100)	3.80 (2.9-4.9)	29	96.6 (82.2-99.9)	249.1 (144.7-428.7)
Prevnar	69	97.1 (89.9-99.6)	2.56 (2.0-3.3)	31	96.8 (83.3-99.9)	528.7 (319.4-875.2)

<sup>Г</sup> комбінація різних композицій представлених в Таблиці 4.

Таблиця 13

Відсоток об'єктів з концентрацією антитіл  $\geq 0.2$  мкг/мл, OPA  $\geq 1:8$  та GMC/GMT проти 19F пневмококів через один місяць після первинної вакцинації дозою 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT чи Prevnar (2мкг 19F-CRM) (Загальна категорія)

Група	11Pn-PD&Di-001					
	22F-ELISA аналіз			OPA аналіз		
	N	$\geq 0.2$ мкг/мл (95% CI)	GMC (мкг/мл) (95% CI)	N	$\geq 1:8$ (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	28.9 (16.4-44.3)	0.09 (0.07-0.11)	52	7.7 (2.1-18.5)	5.2 (4.0-6.8)
19F-DT форма 2 <sup>Г</sup>	51	29.4 (17.5-43.8)	0.11 (0.08-0.16)	59	27.1 (16.4-40.3)	12.4 (7.6-20.3)
Prevnar	55	18.2 (9.1-30.9)	0.10 (0.08-0.12)	61	33 (0.4-11.3)	4.6 (3.8-5.6)

<sup>Г</sup> комбінація різних композицій представлених в Таблиці 4.

Приклад 5: Ад'ювантні експерименти в доклінічних моделях: вплив на імуногенність пневмококових 11-валентних полісахаридних кон'югатів у макак Резус похилого віку

Для оптимізації відгуку викликаного кон'югованими пневмококовими вакцинами в популяції похилого віку, GSK формульована 11-валентна полісахаридна (PS) кон'югована вакцина з новим ад'ювантом Ад'ювантом С - дивись нижче.

Групи з 5 макак Резус похилого віку (віком від 14 до 28 років) імунізували внутрішньом'язово (IM) на 0 та 28 день дозою 500 мкл або 11-валентними PS кон'югатами адсорбованими на

315 мкг  $AlPO_4$  або 11-валентними PS кон'югатами змішаними з Ад'ювантом С.

В обох вакцинних композиціях, кожен з 11-валентних PS кон'югатів складався з наступних кон'югатів PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, S19F-PD, PS23F-DT та PS6B-DT. Використана вакцина становила 1/5 дози від дози вакцини для людини (5 мкг кожного сахариду на дозу для людини за виключенням 6B [10мкг]) кон'югованої згідно до умов наведених в Таблиці 6 (Приклад 4), за виключенням 19F виробленого згідно наступним умовам процесу CDAP: сортований сахарид концентрацією 9 мг/мл, PD - 5 мг/мл, вихідне співвід-

ношення PD/PS 1.2/1, концентрація CDAP 0.75 мг/мл PS,  $pH_a=pH_c=pH_q$  9.0/9.0/9.0 та час сполучення - 60 хвилин.

Рівні анти-PS ELISA IgG та опсонофагоцитозні титри дозували в сироватці, зібрані на 42 день. Частоти анти-PS3 пам'яті В клітин вимірювали методом Elispot з периферійних кров'яних клітин, зібраних на 42 день.

Відповідно до результатів показаних нижче, Ад'ювант С значно покращив імуногенність 11-валентних PS кон'югатів порівняно з кон'югатами з  $AlPO_4$  у мавп похилого віку. Новий ад'ювант посилював IgG відгуки до PS (Фігура 1) та опсонофагоцитозні титри антитіл (Таблиця 14). Існували свідчення, які підтримувалися, що частота PS3-специфічної пам'яті В клітин зростає при використанні Ад'юванту С (Фігура 2).

Таблиця 14

Кон'югатна імуногенність у макак Резус похилого віку (пост-II опсонофагоцитозні титри)

		P51	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11-валент.	До імунізації	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
$AlPO_4$	14 днів пост-II	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11 валент.	До імунізації	S	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
Ад'юв.-С	14 днів пост-II	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

#### Elispot В Клітини

Принцип аналізу полягає на факті, що В клітини пам'яті визрівають в клітинах плазми *in vitro* після культивування з CpG протягом 5 днів. *In vitro* генеровані антиген-специфічні клітини плазми можуть легко детектуватися, а тому бути пронумерованими, використовуючи В-клітинний elispot аналіз. Число специфічних клітин плазми відображає частоту В клітин пам'яті появи культури.

Коротко, *in vitro* генеровані клітини плазми інкубували в платах з культурою покритих антигеном. Антиген-специфічні клітини плазми утворюють антитіло/антиген точки, які детектують традиційною імуно-ензиматичною процедурою та нумерують як В клітини пам'яті. В даному дослідженні, полісахариди використовували для покриття плат з метою пронумерувати відповідні В клітини пам'яті. Результати виражені як частота PS специфічних В клітин пам'яті до мільйону В клітин пам'яті.

Дослідження показало, що Ад'ювант С можливо міг пом'якшити відому проблему PS3 посилення (дивись 5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, April 2-6 2006, Alice Springs, Central Australia. Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p. 245, PO10.06).

Приклад 6. Ефективність детоксикованого Пневмолізіну (dPly) як протеїну-носія для посилення імуногенності PS 19F у молодих Balb/c мишей

Групи з 40 самок Balb/c мишей (4-тижневого віку) імунізували IM на 0, 14 та 28 день дозою 50 мкл або 4-валентної чистої PS або 4-валентної dPly-кон'югованої PS, обидві змішені з Ад'ювантом С

Обидві вакцинні композиції містили 0.1 мкг (кількість сахариду) кожного з наступних PS: PS8, PS12F, PS19F та PS22F.

Рівні анти-PS ELISA IgG дозували в сироватку зібрану на 42 день.

Ahtk-PS19F відгук, показаний як приклад в Фігурі 3, посилювався у мишей, яким ввели 4-

валентні dPly кон'югати порівняно з мишами, імунізованими чисто PS. Таке ж покращення спостерігалось для анти-PSe, 12F та 22F IgG відгуків (дані не наведені).

Приклад 7. Ефективність Пневмококової Гістидинової Тріади Протеїну D (PhtD) як протеїну-носія для посилення імуногенності PS 22F у молодих Balb/c мишей

Групи з 40 самок Balb/c мишей (4-тижневого віку) імунізували IM на 0, 14 та 28 день дозою 50 мкл або 4-валентної чистої PS або 4-валентної PhtD-кон'югованої PS, обидві змішені з Ад'ювантом С.

Обидві вакцинні композиції містили 0.1 мкг (кількість сахариду) кожного з наступних PS: PS8, PS12F, PS19F та PS22F.

Рівні анти-PS ELISA IgG дозували в сироватку зібрану на 42 день.

Анти-PS22F відгук, показаний як приклад в Фігурі 4, посилювався у мишей, яким ввели 4-валентні PhtD кон'югати порівняно з мишами, імунізованими чисто PS. Таке ж покращення спостерігалось для анти-PSS, 12F та 19F IgG відгуків (дані не наведені).

Приклад 8. Імуногенність у C57Bl мишей похилого віку від 13-валентних PS кон'югатів, що включали 19A-dPly та 22F-PhtD

Групи з 30 C57Bl мишей похилого віку (>69-тижневого віку) були імунізовані IM на 0, 14 та 28 день дозою 50 мкл або 11-валентних PS кон'югатів або 13-валентних PS кон'югатів, обидві змішені з Ад'ювантом С (дивись нижче).

11-валентна вакцинна композиція складалася з 0.1 мкг сахариду кожного з наступних кон'югатів: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT та PS23F-PD (дивись Таблицю 1 та коментар до 11-валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2). 13-валентна вакцинна композиція, що містила крім того 0.1 мкг PS19A-dPly та PS22F-PhtD кон'югатів (дивись Таблицю 1 та коментар до 13-валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2 [використовуючи безпосередньо кон'югований 22F]). В групі 2 та 4 пневмолізін носій детоксикований GMBSoбробкою, в групі 3

та 5 це зроблено формальдегідом. В групах 2 та 3 PhtD використовували для кон'югації PS 22F, в групах 4 та 5 PhtD\_E злиті (будова VP147 з WO 03/054007) використовували. В групі 6 19A був кон'югований до токсоїду дифтерії та 22F до протеїну D.

Анти-PS19A та рівні 22F ELISA IgG дозували в індивідуальну сироватку зібрану на 42 день.

ELISA IgG відгук, генерований до інших PS, вимірювали в об'єднаній сироватці.

19A-dPly та 22F-PhtD введені в 13-валентну кон'юговану вакцинну композицію показані, як імуногенні у C57Bl мишей похилого віку (Таблиця 15). Імунний відгук індукований проти інших PS не діяв негативно на мишей, яким ввели 13-валентну композицію порівняно з тими, яких імунізували 11-валентною композицією.

Таблиця 15

PS імуногенність у C57Bl мишей похилого віку (пост-III IgGpIBHi)

C57 чорні миші похилого віку						
ELISA	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5	Група 6
	11V 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-dPly формалін 22F-PhtD 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-dPly формалін 22F-PhtD-E 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-DT 22F-PD 0,1мкг/0,5мкл
1 середній пул	19.30	20.20	24.40	12.80	12.10	13.60
3 середній пул	6.32	4.84	5.21	6.74	2.38	2.54
4 середній пул	60.9	67.1	51.4	47.4	45.5	41.1
5 середній пул	1.34	3.81	3.06	2.75	1.26	1.23
6B середній пул	4.41	4.12	5.88	1.58	2.31	5.64
7F середній пул	0.83	0.81	1.65	1.98	0.89	0.99
9V середній пул	13.8	23.7	20.0	13.1	15.5	9.6
14 середній пул	25.73	42.96	34.12	32.53	23.97	15.60
18C середній пул	13.4	20.1	11.9	9.1	8.3	8.4
19F середній пул	57.5	90.0	63.8	36.5	47.0	69.1
23F середній пул	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC 1C %сиров	0.06	0.09	0.25	0.08	0.23
		0.04-0.1	0.05-0.14	0.15-0.41	0.06-0.12	0.14-0.38
		33%	47%	83%	53%	80%
22F	GMC 1C %сиров	NR	5.81	3.76	0.54	0.85
			3.2-10.6	1.8-7.9	0.3-1.1	0.4-1.7
		0%	97%	90%	77%	87%

#### Приклад 9

Імуногенність у молодих Balb/c мишей від 13-валентних PS кон'югатів, що містять 19A-dPly та 22F-PhtD

Групи 30 молодих Balb/c мишей (4-тижневого віку) імунізували IM на 0, 14 та 28 день дозою 50 мкл або 11-валентних PS кон'югатів або 13-валентних PS кон'югатів, обидва змішані з Ад'ювантом С (дивись нижче).

11-валентна вакцинна композиція складається з 0.1 мкг сахариду кожного з наступних кон'югатів: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT та PS23F-PD (дивись Таблицю 1 та коментар до 11-валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2). 13-валентна вакцинна композиція складається додатково з 0.1 мкг PS19A-dPly та PS22F-PhtD кон'югатів (дивись Таблицю 1 та коментар до 13-валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2 [використовуючи безпосередньо-

кон'югований 22F]). В групі 2 та 4 пневмолізін носій детоксикований GMBСобробкою, в групі 3 та 5 це зроблено формальдегідом. В групах 2 та 3 PhtD використовували для кон'югації PS 22F, в групах 4 та 5 використовували злиті PhtD E (будова VP147 з WO 03/054007). В групі 6 19A був кон'югований до токсоїду дифтерії та 22F до протеїну D.

Анти-PS19A та рівні 22F ELISA IgG дозували в індивідуальну сироватку зібрану на 42 день. ELISA IgG відгук, генерований до інших PS, вимірювали в об'єднаній сироватці.

19A-dPly та 22F-PhtD введені в 13-валентну кон'юговану вакцинну композицію показані, як імуногенні у молодих Balb/c мишей (Таблиця 16). Імунний відгук індукований проти інших PS не діяв негативно на мишей, яким ввели 13-валентну композицію порівняно з тими, яких імунізували 11-валентною композицією.

Таблиця 16

PS імуногенність у молодих Balb/c мишей (пост-III IgG рівні)

BalbC миші						
ELISA	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5	Група 6
	11V 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-dPly формалін 22F-PhtD 0,1мкг/0,5мкл	11V19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1мкг/0,5мкл	11V19A-dPly формалін 22F-PhtD-E 0,1мкг/0,5мкл	11V 19A-DT 22F-PD 0,1мкг/0,5мкл
1 середній пул	131.70	101.20	83.00	82.40	67.90	85.50
3 середній пул	21.85	10.38	12.53	8.83	8.73	14.98
4 середній пул	147.4	127.0	104.4	95.0	113.6	114.2
5 середній пул	21.38	20.29	18.26	18.95	18.02	23.04
6В середній пул	1.97	4.76	3.72	2.35	1.43	1.05
7F середній пул	7.69	4.58	4.77	4.24	3.92	3.94
9V середній пул	30.1	30.7	26.5	21.4	23.4	28.3
14 середній пул	28.78	27.67	26.23	21.54	24.34	13.73
18C середній пул	53.4	52.37	46.5	57.8	47.8	75.8
19F середній пул	186.6	157.7	169.3	178.9	181.9	223.2
23 F середній пул	4.98	3.9	5.11	0.57	3.13	4.57
19A GMC %сиров 1C	0.4 0.2-0.6 93%	32.8 26.4-40.7 100%	25.1 20.6-30.6 100%	21.6 17.5-26.7 100%	18.9 15.1-23.5 100%	23.5 19.5-28.5 100%
22F GMC %сиров 1C	NR 0%	3.99 1.9-8.42 93%	3.76 1.8-8 100%	6.27 3.8-10.4 100%	8.70 5.4-13.9 100%	18.76 15.2-23.1 100%

## Приклад 10

Імуногенність у гвінейських свиней від 13-валентних PS кон'югатів, що містять 19A-dPly та 22F-PhtD

Групи з 20 молодих гвінейських свиней (штам Hartley; 5 тижневий вік) були імунізовані IM на 0, 14 та 28 день дозою 125 мкл або 11-валентних PS кон'югатів або 13-валентних PS кон'югатів, обидва змішані з Ад'ювантом С (дивись нижче).

11-валентна вакцинна композиція складається з 0.25 мкг сахариду кожного з наступних кон'югатів: PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT та PS23F-PD (дивись Таблицю 1 та коментар до 11-валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2). 13-валентна вакцинна компози-

ція складається додатково з 0.1 мкг PS19A-dPly та PS22F-PhtD кон'югатів (дивись Таблицю 1 та коментар до 13-валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2 [використовуючи безпосередньо-кон'югований 22F]). В групі 2 та 4 пневмолізін носій детоксикований GMBS обробкою, в групі 3 та 5 це зроблено формальдегідом. В групах 2 та 3 PhtD використовували для кон'югації PS 22F, в групах 4 та 5 використовували злиті PhtD E (будова VP147 з WO 03/054007). В групі 6 19A був кон'югований до токсоїду дифтерії та 22F до протеїну D.

Анти-PS19A та рівні 22F ELISA IgG дозували в індивідуальну сироватку зібрану на 42 день. ELISA IgG відгук, генерований до інших PS, вимірювали в об'єднаній сироватці.

Таблиця 17

PS імуногенність у молодих Balb/c мишей (пост-III IgG рівні)

Гвінейські свині						
ELISA	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4	Група 5	Група 6
	11V 0,1мкг/0,5мкл Ад'юв. С	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0,1мкг/0,5мкл Ад'юв. С	11V 19A-dPly формалін 22F-PhtD 0,1мкг/0,5мкл Ад'юв. С	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0,1мкг/0,5мкл Ад'юв. С	11V 19A-dPly формалін 22F-PhtD-E 0,1мкг/0,5мкл Ад'юв. С	11V 19A-DT 22F-PD 0,1мкг/0,5мкл Ад'юв. С
1 середній пул	78.00	77.21	76.15	68.77	68.59	81.04
3 середній пул	7.75	9.31	12.73	7.94	4.75	9.59
4 середній пул	130.7	94.4	132.6	166.8	85.0	101.3
5 середній пул	109.10	117.10	110.70	158.40	74.10	100.40
6В середній пул	3.14	4.26	14.4	7.63	6.3	7.52
7F середній пул	154.2	216.0	240.0	181.0	142.0	179.1



Продовження таблиці 17

9V середній пул		90.69	105.45	98.20	93.45	54.12	73.05
14 середній пул		71.19	77.18	46.53	59.67	38.47	53.69
18C середній пул		109.4	122.3	137.1	79.9	73.7	83.1
19F середній пул		73.9	102.5	112.2	75.5	62.3	72.1
23 F середній пул		19.19	30.74	29.44	31.52	19.13	24.94
19A	GMC1C %сиров	0.40.	25.58	41.49	14.25	27.49	6.74
		24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
		75%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC 1C %сиров	0.12	2.51	3.67	45.74	30.68	96.38
		0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
		10%	95%	95%	100%	100%	100%

## Приклад 11

Композиції, що були зроблені та випробувані  
а) Наступні композиції зроблені (використовуючи 13 валентну вакцину з Таблиці 1 та серотип 3 з Таблиці 5 - дивись коментар до 14-

валентної вакцини, обговорений під Таблицею 2 [використовуючи безпосередньо-кон'югований 22F або через АОНлінкер]). Сахариди зформульовані з фосфатом алюмінію та 3D-MPL як показано нижче.

14V 25мкгMPL Сума BAC вмісту алюмінію-> FF На дозу:						14V 25мкг MPL Сума BAC вмісту алюмінію-> FF На дозу:					
PS	носій	мкг PS	мкг MPL	співвід. PS/Al 1/x	мкг Al	PS	носій	мкг PS	мкг MPL	співвід. PS/Al 1/x	мкг Al
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	i	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT <sub>АН</sub>	3		15	«	18C	TT <sub>АН</sub>	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30	22F	PhtD	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 501200			10	4	40
FF вмісту алюмінію				Сума =	355	FF вмісту алюмінію				Сума =	295

б) Та ж сахаридна композиція ад'ювантована з кожним з наступних ад'ювантів:

- В таблиці нижче наведена концентрація компонентів емульсії на 500 мкл дози.

	A'ювант A1	A'ювант A2	A'ювант A3
інгредієнти	250 мкл о/в	125 мкл о/в	50 мкл о/в
	емульсія	емульсія	емульсія
Альфа токоферол	11.88 мг	5.94 мг	2.38 мг
Сквален	10.7 мг	5.35 мг	2.14 мг
Tween 80	4.85 мг	2.43 мг	0.97 мг

	A'ювант A4	A'ювант A5	A'ювант A6	A'ювант A7
інгредієнти	250 мкл о/в	250 мкл о/в	125 мкл о/в	50 мкл о/в
	емульсія	емульсія	емульсія	емульсія
Альфа токоферол	11.88 мг	11.88 мг	5.94 мг	2.38 мг
Сквален	10.7 мг	10.7 мг	5.35 мг	2.14 мг
Tween 80	4.85 мг	4.85 мг	2.43 мг	0.97 мг
3D-MPL	50 мкг	25 мкг	25 мкг	10 мкг

с) Сахариди також зформульовані з двома ліпосомними основними ад'ювантами:

Композиція ад'юванту ВІ  
Якісний Кількісний (на 0.5 мл дози)

Ліпосоми

- DOPC 1 мг

- холестерин 0.25 мг

3DMPL 50 мкг

QS21 50 мкг

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 3.124 мг Буфер

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 0.290 мг Буфер

$\text{NaCl}$  2.922 мг

(100 mM)

WFI q.s. ad 0.5 мл Розчинник

pH 6.1

1. Загальна концентрація  $\text{PO}_4=50$  mM

Композиція ад'юванту B2

Якісний Кількісний (на 0.5 мл дози)

Ліпосоми:

- DOPC 0.5 мг

- холестерин 0.125 мг

3DMPL 25 мкг

QS21 25 мкг

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 3.124 мг Буфер

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 0.290 мг Буфер

$\text{NaCl}$  2.922 мг

(100 mM)

WFI q.s. ad 0.5 мл Розчинник

pH 6.1

d) Сахариди також зформульовані з ад'ювантом С (дивись вище для інших композицій, де використовували цей ад'ювант):

Якісний Кількісний (на 0.5 мл дози)

Емульсія олія у воді: 50 мкл

- сквален 2.136 мг

-  $\alpha$ -токоферол 2.372 мг

- Tween 80 0.97 мг

- холестерин 0.1 мг

3DMPL 50 мкг

QS21 50 мкг

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 0.470 мг Буфер

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 0.219 мг Буфер

$\text{NaCl}$  4.003 мг

(137 mM)

$\text{KCl}$  0.101 мг

(2.7 mM)

WFI q.s. ad 0.5 мл Розчинник

pH 6.8

Приклад 12. Вплив кон'югаційної хімії на імуногенність кон'югату 22F-PhtD у мишей Balb/c

Групи по 30 самок мишей Balb/c були імунізовані внутрішньом'язовим (IM) способом 0, 14 та 28 дні 13-валентними PS композиціями, що містили PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F та 23F (доза: по 0.3 мкг сахариду/кон'югат для PS 4, 18C, 19A, 19F та 22F, а також по 0.1 мкг/кон'югат для інших PS).

PS 18C був кон'югований до токсоїду правця, 19F до токсоїду дифтерії, 19A до формалін-детоксикованого Ply, 22F до PhtD та інші PS до PD.

Були порівняні дві композиції, що містили або 22F-PhtD, приготовлений безпосереднім методом CDAP або 22F-АН-PhtD (ADH-модифікований PS). Дивись Приклад 2, Таблицю 1 та пояснення під Таблицю 2 для характеристик 13-валентної вакцини, виробленої з 22F кон'югованого або безпосередньо або через ADH

спейсер. Вакцинні композиції були доповнені ад'ювантом С.

Рівні Анти-PS22F ELISA IgG та опсонофагоцитозні титри були виміряні в сироватці, відібраній на 42 день.

22F-АН-PhtD викликала значно сильнішу імуногенність, ніж 22F-PhtD в термінах як рівнів IgG (Фігура 5) так і опсонофагоцитозних титрів (Фігура 6).

Приклад 13. Вплив нових ад'ювантів на імуногенність PS кон'югатів капсул *Streptococcus pneumoniae*.

Групи з 40 самок мишей Balb/c були імунізовані способом IM на 0, 14 та 28 дні 13-валентними PS композиціями, що містили PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F та 23F (доза: по 0.3 мкг/кон'югат для PS 4, 18C, 19A, 19F та 22F, а також по 0.1 мкг/кон'югат для інших PS).

PS 18C був кон'югований до токсоїду правця, 19F до токсоїду дифтерії, 19A до формалін-детоксикованого Ply, 22F до PhtD та інші PS до PD. Дивись Приклад 2, Таблицю 1 та пояснення під Таблицю 2 для характеристик 13-валентної вакцини, виробленої з безпосередньо кон'югованого 22F.

Були порівняні чотири композиції, доповнені або  $\text{AlPO}_4$ , або ад'ювантом A1, або ад'ювантом A4, або ад'ювантом A5.

Рівні Анти-PS, Ply, PhtD та PD ELISA IgG були виміряні в сироватці, відібраній на 42 день та пульовані на групи. Було підраховано наступне співвідношення для кожного антигена: рівень IgG, індукований новим тестованим ад'ювантом tested/рівень IgG індукований  $\text{AlPO}_4$ .

Всі нові тестовані ад'юванти підвищували принаймні в 2 рази імунні відгуки на 13-валентні кон'югати порівняно з класичною  $\text{AlPO}_4$  композицією (Фігура 7).

Приклад 14. Захисна ефективність комбінації PhtD/детоксикований Ply в пневмококовій 25 мавпячій моделі пневмонії

Групи з 6 макак резус (від 3 до 8-річного віку), відібрані з таких, що мали найнижчий раніше існуючий рівень антитіл анти-19F, були імунізовані внутрішньом'язово у дні 0 та 28 або 11-валентними PS кон'югатами (тобто 1 мкг PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 та 23F, та 3 мкг PS 4, 18C та 19F [сахариду]) або PhtD (10 мкг) + формалін-детоксикованим Ply (10 мкг) або самим ад'ювантом.

PS 18C був кон'югований до токсоїду правця, 19F до токсоїду дифтерії та іншого PS до PD. Дивись Приклад 2, Таблицю 1 та пояснення під Таблицю 2 для характеристик 11-валентної вакцини. Всі композиції були доповнені ад'ювантом С.

Тип 19F пневмококків ( $5 \times 10^8$  cfu) був введений до правої легені на 42 день. Колонії підраховувались в бронхо-авеоларних промиваннях, відібраних на 1, 3 та 7 дні після зараження. Результати були виражені як кількість тварин на групу, що або померли, або з колонізованими чи з очищеними легенями на 7 день після зараження.

Як показано на Фігурі 8, добрий захист, близький до статистичної значимості (незважаючи на низьку кількість використаних тварин) був отриманий з 11-валентними кон'югатами та PhtD+dPly комбінаціями ( $p < 0.12$ , прецідійний тест Фішера) порівняно з виключно ад'ювантною групою.

Приклад 15. Вплив кон'югаційної хімії на анти-PhtD антитільний відгук та захисна ефективність проти зараження типом 4, індукований кон'югатами 22F-PhtD

Групи з 20 самок мишей OF1 були імунізовані внутрішньом'язовим способом на 0 та 14 дні по 3 мкг або 22F-PMO (приготовану прямим методом CDAP), або 22F-AH-PhtD (ADH-моіфікований PS), або виключно ад'ювантом.

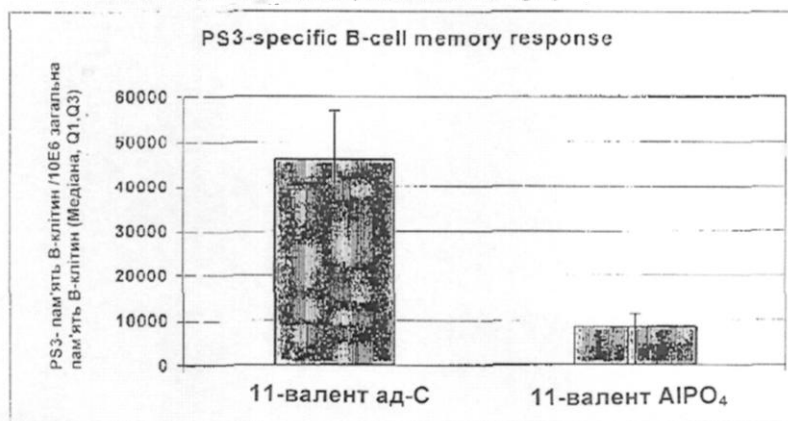
Обидва моновалентних 22F кон'югати були зроблені з використанням процесів Прикладу 2 (дивись також Таблицю 1 та Таблицю 2). Кожна композиція була доповнена ад'ювантом С.

Рівні Анти-PhtD ELISA IgG були виміряні в сироватці, зібраній на 27 день.

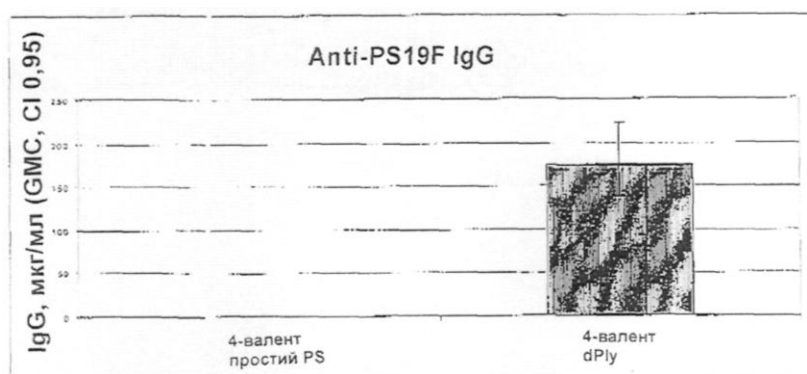
Миші були заражені інтраназально  $5 \times 10^6$  cfu пневмококків типу 4 на 28 день (тобто пневмококковий серотип 25 потенційно не покривається присутністю PS в тестованій вакцинній композиції). Індукована смертність контролювалась до 8 дня після зараження. 22F-AH-PhtD викликала значно сильніший анти-PhtD IgG відгук та кращий захист від зараження типом 4, ніж 22F-PhtD.



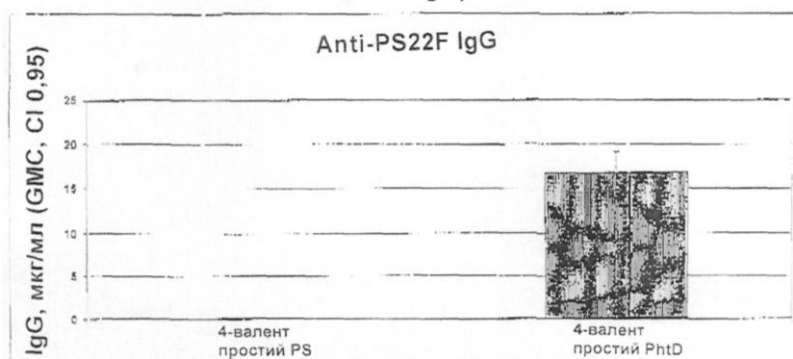
Фігура 1. Іммуногенність кон'югату у макак резус похилого віку (стовпчик-II рівні anti-PS IgG)



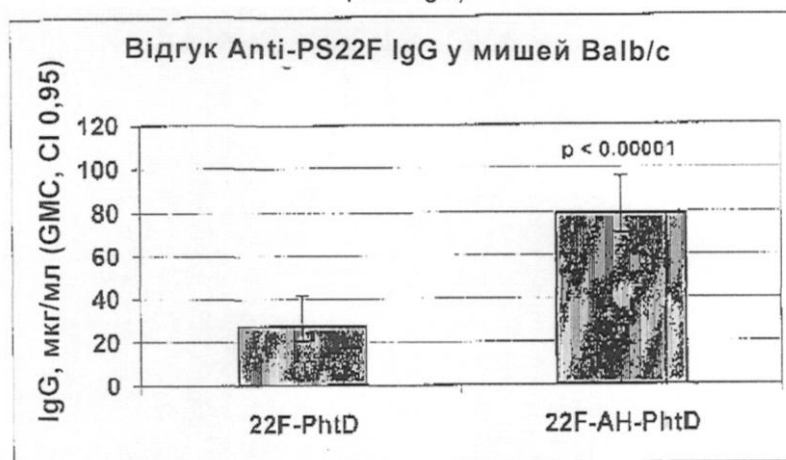
Фігура 2. Іммуногенність кон'югату у макак резус похилого віку (стовпчик-II рівні частот anti-PS3 пам'яті В-клітин)



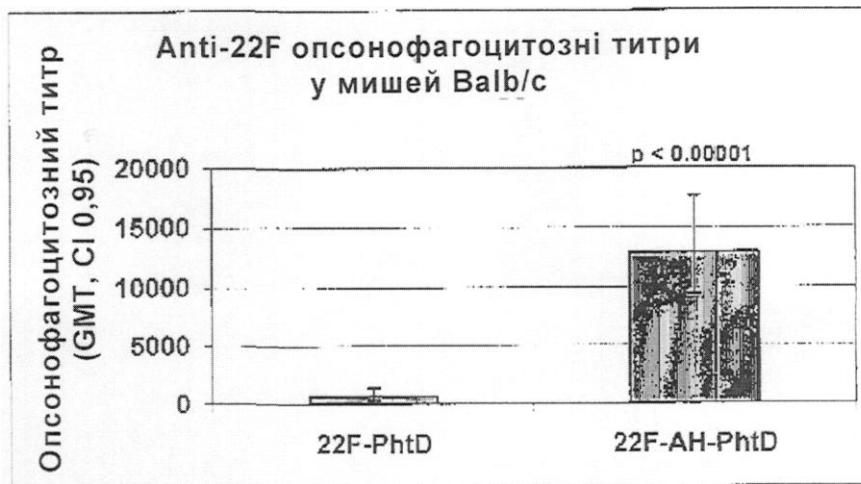
Фігура 3. Імуногенність PS19F у мишей Balb/c (стовпчик-III рівні IgG)



Фігура 4. Імуногенність PS22F у мишей Balb/c (стовпчик-III рівні IgG)



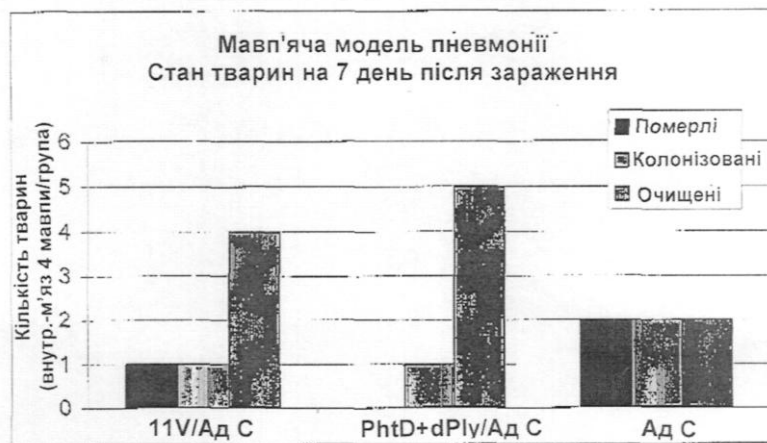
Фігура 5. Рівень сироваткових антитіл Anti-PS IgG



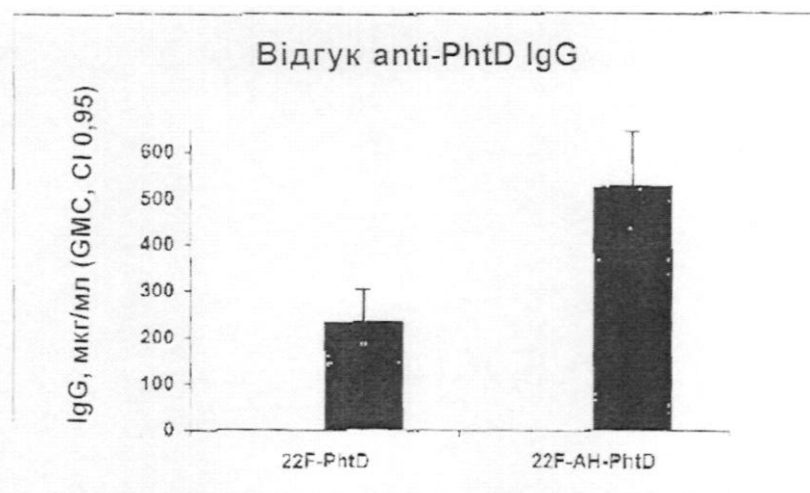
Фігура 6. Опсонофагоцитозні титри



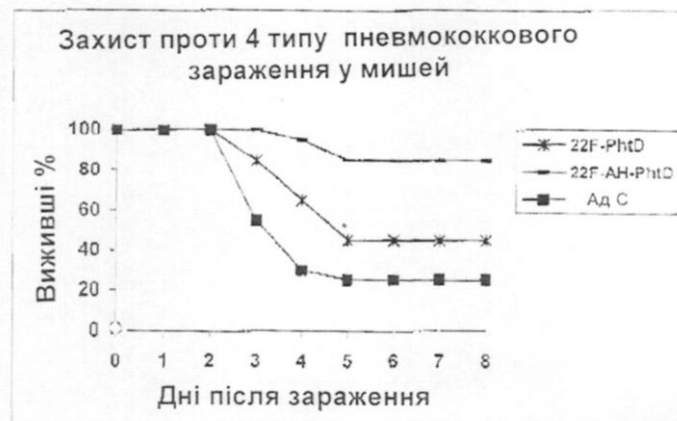
Фігура 7. Порівняння відгуків IgG, індукованих новими ад'ювантами з відгуком викликаним AlPO<sub>4</sub>



Фігура 8. Захисна ефективність комбінації протеїнів PhtD+dPly проти 19F легеневої колонізації у макак резус



Фігура 9. Сироватковий відгук anti-PhtD IgG



Фігура 10. Захист проти 4 типу пневмококкового зараження у мишей