



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA (11) 96583 (13) C2
(51) МПК
A61K 39/09 (2006.01)

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ВАКЦИНА, ЩО МІСТИТЬ КОН'ЮГАТИ КАПСУЛЯРНОГО ПОЛІСАХАРИДУ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

1

2

(21) а200807750

(22) 20.12.2006

(24) 25.11.2011

(86) РСТ/ЕР2006/069977, 20.12.2006

(31) 0526232.4

0607088.2

0609902.2

0620337.6

0620336.8

0620815.1

0620816.9

РСТ/GB2006/004634

0607087.4

(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

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

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

(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.,
ВЕ

(56) WO03051392 A, 26.06.2003.

US2003147922 A1, 07.08.2003.

WO2006110381 A, 19.10.2006.

WO9006951 A, 28.06.1990.

(57) 1. Імуногенна композиція, що включає кон'югати капсулярного сахариду *S. pneumoniae* із серотипів 19A та 19F, де 19A є кон'югованим з першим бактеріальним токсойдом, а 19F є кон'югованим з другим бактеріальним токсойдом, та додатково

включає кон'югати капсулярних сахаридів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 22F та 23F *S. pneumoniae*.

2. Імуногенна композиція згідно з пунктом 1, де перший бактеріальний токсойд відрізняється від білка другого бактеріального токсину.

3. Імуногенна композиція згідно з пунктами 1-2, що додатково включає кон'югати капсулярних сахаридів 1, 5 та 7F *S. pneumoniae*.

4. Імуногенна композиція згідно з пунктами 1-3, що додатково включає кон'югат капсулярного сахариду 3 *S. pneumoniae*.

5. Імуногенна композиція згідно з пунктами 1-4, що додатково включає кон'югат капсулярного сахариду 6A *S. pneumoniae*.

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

7. Імуногенна композиція згідно з пунктом 6, де вказані один або більше білків *S. pneumoniae* є вибраними з родини полігистидинової тріади (PhtX), родини холінзв'язувального білка (CbpX), вкорочених варіантів CbpX, родини LytX, вкорочених варіантів LytX, химерних білків вкорочений варіант CbpX - вкорочений варіант LytX, знешкодженого пневмолізину (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp 125 та Sp133.

8. Імуногенна композиція згідно з будь-яким з пунктів 6 або 7, яка включає PhtX білок.

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

10. Вакцина, що включає імуногенну композицію згідно з будь-яким з пунктів 1-9 та фармацевтично прийнятний наповнювач.

11. Спосіб виготовлення вакцини згідно з пунктом 10, який включає етап змішування імуногенної композиції згідно з будь-яким з пунктів 1-9 з фармацевтично прийнятним наповнювачем.

12. Застосування імуногенної композиції або вакцини згідно з пунктами 1-9 або вакцини згідно з пунктом 10 у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання захворювань, спричинених інфекцією *Streptococcus pneumoniae*.

13. Імуногенна композиція згідно з пунктами 1-9 або вакцина згідно з пунктом 10, яка включає сахаридні кон'югати, одержані принаймні з усіх наступних серотипів: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1,

(13) C2

(11) 96583

(19) UA

5, 7F, де титр GMC антитіла, індукований проти одного або більше вакцинних компонентів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F, не є суттєво нижчим за

такий, що індукований вакциною Prevnar® у вакцинованих людей.

Галузь винаходу

Даний винахід відноситься до поліпшеної вакцини на основі *Streptococcus pneumoniae*.

Передумови створення винаходу

Діти у віці двох років не дають імунної відповіді на більшість полісахаридних вакцин, таким чином, є необхідним надати полісахаридам імуногенності за допомогою хімічної кон'югації з білком носія. Злиття полісахариду, Т-незалежного антигену, з білком, Т-залежним антигеном, надає полісахаридам властивостей Т-залежності, включаючи зміни ізотипів, афінне дозрівання та індукцію пам'яті.

Проте, можуть існувати підходи, що базуються на повторюваному введенні полісахарид-білкових кон'югатів, або на комбінації полісахарид-білкових кон'югатів з утворенням мультивалентних вакцин. Наприклад, було повідомлено, що вакцина на основі полісахариду типу b *Haemophilus influenzae* (PRP), що використовує токсод правця (ТТ) як білок носія, була проаналізована в інтервалі доз при одночасній імунізації за допомогою (вільного) ТТ та кон'югатної вакцини, що містить пневмококовий полісахарид та ТТ згідно зі стандартною процедурою для вакцинації немовлят. Оскільки доза пневмокової вакцини була підвищена, то імунна відповідь на PRP полісахаридну частину Hib кон'югатної вакцини була зменшена, що свідчить про імунну інтерференцію полісахариду, можливо, за рахунок застосування того самого білка носія (Dagan та ін., *Infect. Immunol* (1998); 66 2093-2098).

Ефект дозування білка носія на гуморальну відповідь на білок сам по собі також був продемонстрований як багатofакторний у немовлят. Було повідомлено, що підвищення дозування тетравалентного кон'югату токсоду правця приводить до зниження відповіді на носій правця (Dagan та ін., вище). Класичний аналіз цих ефектів комбінації вакцин був описаний як індукована носієм епітопна супресія, яка не є зрозумілою до кінця, але, як передбачається, походить від надлишкової кількості білка носія (Fattom, *Vaccine* XV 126 (1999)). Як виявляється, це приводить до конкуренції за Тh-клітини між В-клітинами до білка носія та В-клітинами до полісахариду. Якщо В-клітини з білком носія переважають, то не вистачає доступних Тh-клітин для забезпечення необхідної допомоги для В-клітин, специфічних до полісахариду. Проте ці імунологічні ефекти, які спостерігають, були суперечливими, із загальною кількістю білка носія у деяких випадках, що підвищувала імунну відповідь, та іншими випадками зниження імунної відповіді. Згідно з цим залишаються технічні складності у поєднанні багаточисельних полісахаридних кон'югатів у єдину, ефективну вакцинну композицію.

Streptococcus pneumoniae являє собою Грампозитивну бактерію, що є відповідальною за знач-

ний рівень захворюваності та смертності (зокрема, у молодих людей та людей похилого віку), спричинюючи інвазивні захворювання, такі, як пневмонія, бактеріємія та менінгіт, та захворювання, асоційовані з колонізацією, такі, як середній отит. Процент пневмокової пневмонії у США для осіб, старших 60 років оцінюється у межах 3-8 % на 100000. У 20 % випадків це приводить до бактеріємії та інших проявів, таких, як менінгіт, з процентом смертності, що наближається до 30 % навіть при лікуванні антибіотиками.

Pneumococcus має капсулу, що складається хімічно зв'язаного полісахариду, який забезпечує сероспецифічність. Існує 90 відомих серотипів пневмококу, капсула являє собою основну детермінанту вірулентності для пневмококу, оскільки капсула не тільки захищає внутрішню поверхню бактерії від комплементу, але й сама по собі є імуногенною. Полісахариди являють собою Т-незалежні антигени, та можуть не піддаватися процесингу або не представлятися на молекулах МНС для взаємодії з Т-клітинами. Проте вони можуть стимулювати імунну систему за допомогою альтернативного механізму, який втягує перехресне зв'язування поверхневих рецепторів на В-клітинах.

Було показано у деяких експериментах, що захист проти інвазивного пневмокового захворювання корелює найбільш сильно зі специфічністю антитіла до капсули, а захист є специфічним для серотипу.

Streptococcus pneumoniae є найбільш загальною причиною інвазивного бактеріального захворювання та середнього отиту у немовлят та дітей молодшого віку. Крім того, особи похилого віку мають слабкі відповіді на пневмокові вакцини (Roghmann та ін., (1987), *J. Gerontol.* 42, 265-270), тому існує підвищена частота виникнення бактеріальної пневмонії у цій популяції.

Таким чином, задачею даного винаходу є розробка поліпшеної композиції полісахаридної кон'югатної вакцини *Streptococcus pneumoniae* різноманітних серотипів.

Короткий опис фігур

Фігура 1. Стовпчикова діаграма, що показує імуногенність 11-валентного кон'югату у старих мавп резус. Світліші стовпчики представляють GMC після двох інокуляцій 11-валентним кон'югатом в ад'юванті. Більш темні стовпчики представляють GMC після двох інокуляцій 11-валентного кон'югату в ад'юванті С.

Фігура 2. Стовпчикова діаграма, що показує В-клітини пам'яті для PS3 після інокуляції 11-валентного кон'югату в ад'юванті С або ад'юванті на основі фосфату алюмінію.

Фігура 3. Стовпчикова діаграма, що показує імуногенність антитіла до полісахариду 19F у

Balb/C мишей для 4-валентних чистих полісахаридів та 4-валентного dPly кон'югатів.

Фігура 4. Стовпчикова діаграма, що показує імуногенність антитіла до полісахариду 22F у Balb/C мишей для 4-валентних чистих полісахаридів та 4-валентного PhtD кон'югатів.

Фігура 5. Стовпчикова діаграма, що показує анти-22P IgG відповідь у Balb/C мишей.

Фігура 6. Стовпчикова діаграма, що показує анти-22P опсонофагоцитарні титри у Balb/C мишей.

Фігура 7. Стовпчикова діаграма, яка порівнює відповіді IgG, індуковані у молодих C57B1 мишей після імунізації 13-валентною кон'югатною вакциною, що рецептована з різними ад'ювантами.

Фігура 8. Стовпчикова діаграма, що показує протективну ефективність різних вакцинних комбінацій у моделі пневмонії мавп.

Фігура 9. Стовпчикова діаграма, що показує анти-PhtD IgG відповідь у Balb/C мишей після імунізації за допомогою 22F-PhtD або 22F-FY-PMD кон'югатами.

Фігура 10. Захист проти контрольного зараження пневмококом типу 4 у мишей після імунізації за допомогою 22F-PhtD або 22F-FY-PMD.

Опис винаходу

Даний винахід забезпечує імуногенну композицію, що включає кон'югати капсулярного сахариду *Streptococcus pneumoniae* із серотипів 19A та 19F, де 19A є кон'югованим з першим бактеріальним токсодом, а 19F є кон'югованим з другим бактеріальним токсодом.

Термін капсулярний сахарид включає капсулярні полісахариди та олігосахариди, що походять від капсулярних полісахаридів. Олігосахарид містить принаймні 4 цукрові залишки. Терміни "кон'югат" та "кон'югований" відносяться до капсулярного сахариду, що ковалентно зв'язаний з білком носія.

Для цілей даного винаходу "імунізація хазяїні проти загострення COPD" або "лікування або запобігання загострення COPD" або "зниження тяжкості загострень COPD" відноситься до зниження частоти виникнення або проценту загострень COPD (наприклад, процентне зниження 0, 1, 0, 5, 1, 2, 5, 10, 20 % або більше) наприклад, у межах групи пацієнтів, імунізованих композицією або вакцинами згідно з винаходом.

Термін бактеріальний токсод включає бактеріальні токсини, які є інактивованими або за допомогою генетичної мутації, хімічною обробкою, або шляхом кон'югації. Прийнятні бактеріальні токсоди включають токсод правця, дифтерійний токсод, токсод коклюшу, бактеріальний цитолізін або пневмолізін. Були описані мутації пневмолізіну (Ply), які знижують токсичність пневмолізіну (WO 90/06951, WO 99/03884). Подібно до цього, генетичні мутації дифтерійного токсину, які знижують його токсичність, є відомим (див. нижче). Генетично знешкоджені аналоги дифтерійного токсину включають CRM197 та інші мутанти, описані у US 4,709,017, US 5,843,711, US 5,601,827 та US 5,917,017. CRM197 являє собою нетоксичну форму дифтерійного токсину, але таку, що імунологічно не відрізняється від дифтерійного токсину. CRM197 виробляється *C. diphtheriae* інфікованим

нетоксикогенною фазою β 197tox-, створеною за допомогою нітрозоганідинового мутагенезу токсикогенного каріофагу b (Uchida та ін. *Nature New Biology* (1971) 233; 8-11). CRM197 білок має ту саму молекулярну вагу, що й дифтерійний токсин, але відрізняється від нього зміною однієї основи у структурному гені. Це приводить заміни амінокислоти гліцину на глутамін у положенні 52, що робить фрагмент A нездатним зв'язувати NAD та, таким чином, він стає нетоксичним (Pappenheimer 1977, *Ann Rev, Biochem.* 46; 69-94, Rappuoli *Applied and Environmental Microbiology* Sept 1983 стор. 560-564).

Перший та другий бактеріальні токсоди можуть бути однаковими або різними. Коли перший та другий бактеріальні токсоди є різними, то це означає, що вони мають різні амінокислотні послідовності.

Наприклад, 19A та 19F можуть бути кон'юговані з токсодом правця та токсодом правця; дифтерійним токсодом та дифтерійним токсодом; CRM197 та CRM197, пневмолізином та пневмолізином, токсодом правця та дифтерійним токсодом; токсодом правця та CRM197; токсодом правця та пневмолізином; дифтерійним токсодом та токсодом правця; дифтерійним токсодом та CRM197, дифтерійним токсодом та пневмолізином; CRM197 та токсодом правця, CRM197 та дифтерійним токсодом; CRM197 та пневмолізином; пневмолізином та токсодом правця; пневмолізином та дифтерійним токсодом; або пневмолізином та CRM197 відповідно.

В одному втіленні на доповнення до сахаридних кон'югатів 19A та 19F *S. pneumoniae* імуногенна композиція додатково включає кон'югати капсулярних сахаридів 4, 6B, 9V, 14, 18C та 23F *S. pneumoniae*.

В одному втіленні на доповнення до сахаридних кон'югатів 19A та 19F *S. pneumoniae* імуногенна композиція додатково включає кон'югати капсулярних сахаридів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C та 23F *S. pneumoniae*.

В одному втіленні на доповнення до сахаридних кон'югатів 19A та 19F *S. pneumoniae* імуногенна композиція додатково включає кон'югати капсулярних сахаридів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F та 23F *S. pneumoniae*.

В одному втіленні на доповнення до сахаридних кон'югатів 19A та 19F *S. pneumoniae* імуногенна композиція додатково включає кон'югати капсулярних сахаридів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F та 23F *S. pneumoniae*.

В одному втіленні на доповнення до сахаридних кон'югатів 19A та 19F *S. pneumoniae* імуногенна композиція додатково включає кон'югати капсулярних сахаридів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 22F та 23F *S. pneumoniae*.

Типово, вакцина *Streptococcus pneumoniae* згідно з даним винаходом буде включати антигени капсулярних сахаридів (бажано кон'югованих), де сахариди походять принаймні з 10 серотипів *S. pneumoniae*. Кількість капсулярних сахаридів *S. pneumoniae* може коливатися від 10 різних серотипів (або "V", валентностей) до 23 різних серотипів (23V). В одному втіленні існує 10, 11, 12, 13, 14

або 15 різних серотипів. В іншому втіленні згідно з винаходом вакцина може включати кон'юговані сахариди *S. pneumoniae* та некон'юговані сахариди *S. pneumoniae*. Бажано, загальна кількість сахаридних серотипів є меншою або рівною 23. Наприклад, винахід може включати 10 кон'югованих серотипів та 13 некон'югованих сахаридів. Подібним чином, вакцина може включати 11, 12, 13, 14, 15 або 16 кон'югованих сахаридів та 12, 11, 10, 9, 8 або 7, відповідно, некон'югованих сахаридів.

В одному втіленні мультивалентна пневмокова вакцина згідно з винаходом буде вибиратися з наступних серотипів: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F та 33F, хоча є очевидним, що один або два інші серотипи можуть замінюватися в залежності від віку реципієнта, що одержує вакцину та географічного розміщення місця, де буде використовуватися вакцина, наприклад, серотип 6A може бути включений в один список. Наприклад, 10-валентна вакцина може включати полісахариди із серотипів: 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F. 11-валентна вакцина може також включати сахариди із серотипів: 3. А 12 або 13-валентна педіатрична (для немовлят) вакцина може також включати 10- або 11-валентну композицію, доповнену серотипами 6A та 19A або 6A та 22F або 19A та 22F або 6A та 15B або 19A та 15B або 22F та 15B, у той час, як 13-валентна вакцина для людей похилого віку може включати 11-валентну композицію, доповнену серотипами 19A та 22F, 8 та 12F або 8 та 15B або 8 та 19A, або 8 та 22F або 12F та 15B або 12F та 19A або 12F та 22F, або 15B та 19A або 15B та 22F. 14-валентна педіатрична вакцина може включати 10-валентну композицію, описану вище, доповнену 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; або серотипами 3, 6A, 15B та 22F.

Композиція в одному втіленні включає капсулярні сахариди, що походять від серотипів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F (бажано кон'юговані). У додатковому втіленні згідно з винаходом включаються принаймні 11 сахаридних антигенів (бажано кон'юговані), наприклад капсулярні сахариди, що походять від серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F. У додатковому втіленні згідно з винаходом включаються принаймні 12 або 13 сахаридних антигенів, наприклад вакцина може включати капсулярні сахариди, що походять від серотипів 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F та 23F, або капсулярні сахариди, що походять від серотипів 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F та 23F, хоча винаходом також передбачаються додаткові сахаридні антигени, наприклад, 23-валентна композиція (що містить такі серотипи 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 передбачається винаходом.

Вакцина згідно з даним винаходом може включати білок D (PD) з *Haemophilus influenzae* (див наприклад, EP 0594610) *Haemophilus*

influenzae є ключовим організмом, що спричинює середній отит, та автори згідно з даним винаходом показали, що включаючи цей білок у вакцину *Streptococcus pneumoniae*, буде забезпечуватися рівень захисту проти *Haemophilus influenzae*, пов'язаний з середнім отитом (посилання на РОЕТ публікацію) В одному втіленні вакцинна композиція включає білок D. В одному аспекті PD є присутнім як білок носія для одного або більше сахаридів. В іншому аспекті білок D буде присутнім у вакцинній композиції як вільний білок. У додатковому аспекті білок D є присутнім як білок носія, так і як вільний білок. Білок D може використовуватися як білок повної довжини або як фрагмент (WO 0056360). У додатковому аспекті білок D є присутнім як білок носія для більшості сахаридів, наприклад 6, 7, 8, 9 або більше сахаридів можуть бути кон'югованими з білком D. У цьому аспекті білок D може також бути присутнім як вільний білок.

Вакцина згідно з даним винаходом включає два або більше різних типів білка носія. Кожний тип білка носія може діяти як носій для більше одного сахариду, де сахариди можуть бути однаковими або різними. Наприклад, серотипи 3 та 4 можуть бути кон'югованими з тим самим білком носія, або з тією самою молекулою білка носія або з різними молекулами того самого білка носія. В одному втіленні два або більше різні сахариди можуть бути кон'югованими з тим самим білком носія, або з тією самою молекулою білка носія або з різними молекулами того самого білка носія.

Будь-який капсулярний сахарид *Streptococcus pneumoniae* що є присутнім в імуногенній композиції згідно з винаходом, окремо від 19A та 19F, може бути кон'югованим з білком носія, незалежно вибраним з групи яка складається з TT DT, CRM197, фрагменту C TT, PhtD, PhtDE злитими білками (зокрема з тими, що є описаними у WO 01/98334 та WO 03/54007), знешкодженим пневмолізином та білком D, сахаридами, відмінними від таких із серотипу 19F, який завжди є кон'югованим з DT або CRM197, бажано DT. Більш повний список білків носіїв, що можуть використовуватися у кон'югатах згідно з винаходом, представлений нижче.

Білок носія, кон'югований з одним або більше капсулярними сахаридами *S. pneumoniae* у кон'югатах, що є присутніми в імуногенних композиціях згідно з винаходом, є необов'язково членом білків родини поліглістидинових триад (Pht), їх фрагментів або злитих білків PhtA, PhtB, PhtD або PhtE білки можуть мати амінокислотну послідовність, що є на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичною послідовності, розкритій в WO 00/37105 або WO 00/39299 (наприклад, з амінокислотною послідовністю 1-838 або 21-838 SEQ ID NO:4 згідно з WO 00/37105 для PhtD). Наприклад, злиті білки складаються з послідовностей повної довжини або фрагментів 2, 3 або 4 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE. Приклади злитих білків являють собою 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 ці білки є зв'язаними з першим згаданим на N-термінальному кінці (див. наприклад, WO 01/98334).

Коли використовуються фрагменти Pht білків (окремо або як частина злитого білка), кожний фрагмент необов'язково містить один або більше фрагментів гістидинових триад та/або ділянки подвійної спіралі таких поліпептидів, фрагмент гістидинових триад являє собою частину поліпептиду, що має послідовність NxxHxH де H являє собою гістидин, та x є амінокислотою, відмінною від гістидину. Ділянка подвійної спіралі є ділянкою, яка передбачається як "Coils" алгоритм Lupus, A та ін. (1991) Science 252; 1162-1164. В одному втіленні цей або кожний фрагмент включає один або більше мотивів гістидинових триад, а також принаймні одну ділянку з подвійною спіраллю. В одному втіленні цей або кожний фрагмент містить точно або принаймні 2, 3, 4 або 5 мотиви гістидинових триад (необов'язково, з нативною послідовністю Pht між 2 або більше триадами або інтратріадну послідовність, що є більше, ніж на 50, 60, 70, 80, 90 або 100 % ідентичною нативній пневмококовій інтратріадній Pht послідовності - наприклад, інтратріадній послідовності, показаній у SEQ ID NO: 4 WO 00/37105 для PhtD). В одному втіленні цей або кожний фрагмент містить точно або принаймні 2, 3 або 4 ділянки з подвійною спіраллю. В одному втіленні Pht білок, розкритий в даній заявці, включає білок повної довжини з приєднаною сигнальною послідовністю, зрілий білок повної довжини з видаленим сигнальним пептидом (наприклад, 20 амінокислот на N-термінальному кінці), існуючі в природі варіанти Pht білка та імуногенні фрагменти Pht білка (наприклад, фрагменти, як описано вище, або поліпептиди, що включають принаймні 15 або 20 суміжних амінокислот з амінокислотної послідовності у WO 00/37105 або WO 00/39299, де вказаний поліпептид є здатним викликати імунну відповідь, специфічну для даної амінокислотної послідовності у WO 00/37105 або WO 00/39299).

Зокрема, термін "PhtD", як використовується в даній заявці, включає білок повної довжини з приєднаною сигнальною послідовністю, зрілий білок повної довжини з видаленим сигнальним пептидом (наприклад, 20 амінокислот на N-термінальному кінці), існуючі в природі варіанти PhtD білка та імуногенні фрагменти PhtD білка (наприклад, фрагменти, як описано вище, або поліпептиди, що включають принаймні 15 або 20 суміжних амінокислот з амінокислотної послідовності PhtD у WO 00/37105 або WO 00/39299, де вказаний поліпептид є здатним викликати імунну відповідь, специфічну для даної амінокислотної послідовності у WO 00/37105 або WO 00/39299 (наприклад, SEQ ID NO:4 WO 00/37105 для PhtD)).

Якщо білок носія є таким самим для 2 або більше сахаридів у композиції, сахариди можуть бути кон'югованими з тією самою молекулою білка носія (молекули носія, що мають більше 2 різних сахаридів, кон'югованих з нею) [див. наприклад, WO 04/083251]. Альтернативно, сахариди можуть кожний бути окремо кон'югованим з різними молекулами білка носія (кожна молекула білка носія, що має тільки один тип сахариду кон'югованого з нею).

Приклади білків носія, які можуть використовуватися в даному винаході, являють собою DT (ди-

фтерійний токсод), TT (токсод правця) або фрагмент C TT, DT CRM197 (DT мутант) інші точкові мутанти DT, такі як CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida та ін. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 та CRM107 та інші мутації, описані Nicholls та Youle у Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992; делеції та мутації Glu-148 на Asp, Gln або Ser та/або Ala158 на Gly та інші мутації, розкриті в US 4709017 або US 4950740; мутацію принаймні одного або більше залишків Lys 516, Lys 526, Phe 530 та/або Lys 534 та інші мутації, розкриті в US 5917017 або US 6455673; або фрагмент розкритий в US 5843711, пневмококовий пневмолізін (Kuo та ін. (1995) Infect Immun 63; 2706-13) включаючи ply, знешкоджений певним чином, наприклад dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) або dPLY-формол, PhtX, включаючи PhtA, PhtB, PhtD, PhtE та злиті Pht білки, наприклад PhtDE злиті білки, PhtBE злиті білки (WO 01/98334 та WO 03/54007), (Pht A-E є описаними більш детально нижче) ОМРС (менінгококовий зовнішній білок, що звичайно екстрагується з N. meningitidis серогрупи B - EP0372501), PorB (з N. meningitidis), PD (білок D Haemophilus influenzae - див., наприклад, EP 0594610 B) або їх імунологічно функціональні еквіваленти, синтетичні пептиди (EP0378881, EP0427347), білки теплового шоку (WO 93/17712, WO 94/03208), білки коклюшу (WO 98/58668, EP0471177), цитокіни, лімфокіни, ростові фактори або гормони (WO 91/01146), штучні білки, що включають численні CD4+ T-клітинні епітопи, що походять від антигенів різноманітних патогенів (Falugi та ін. (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), такі, як N19 білок (Baraldo та ін. (2004) Infect Immun 72; 4884-7), пневмококові поверхневі білки PspA (WO 02/091998), білки поглинання заліза (WO 01/72337), токсин A або B C. difficile (WO 00/61761).

Nurkka та ін. Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11): 1008-14, 2004 Nov. описали 11-валентну пневмококову вакцину з усіма серотипами, кон'югованими з PD. Проте автори даного винаходу показали, що опсоно фагоцитарна активність може бути поліпшена для антитіл, індукованих при використанні кон'югатів, що містять 19F, кон'югований з DT, у порівнянні з 19F, кон'югованим з PD. Крім того, автори даного винаходу показали, що більша реактивність до 19A спостерігається з 19F, кон'югованим з DT. Таким чином ознакою композиції згідно з даним винаходом є те, що серотип 19F є кон'югованим з DT або CRM197. В одному аспекті серотип 19F є кон'югованим з DT. Інші сахаридні серотипи імуногенної композиції можуть усі бути кон'югованими з один або більше білками носія, які не являють собою DT (тобто тільки 19F є кон'югованим з DT) або можуть бути розділені одним або більше білками носія, які не є DT та DT самі по собі. В одному втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, а усі інші серотипи є кон'югованими з PD. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, та інші серотипи є розділеними між PD та TT або DT, або CRM197. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197 та не більше, ніж

один сахарид є кон'югованим з ТТ. В одному аспекті цього втілення, вказаний один сахарид являє собою 18С або 12F. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197 та не більше ніж два сахариди є кон'югованими з ТТ. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, та інші серотипи є розділеними між PD, ТТ та DT або CRM197. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, а інші серотипи є розділеними між PD, ТТ та пневмолізином. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, а інші серотипи є розділеними між PD, ТТ та CRM197. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, та інші серотипи є розділеними між PD, ТТ, пневмолізином та необов'язково PhtD або PhtD/E злитим білком. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, 19A є кон'югованим з пневмолізином або ТТ, один (два або три) додатковий(і) сахарид(и) є кон'югованим(и) з ТТ, один додатковий сахарид є кон'югованим з PhtD або PhtD/E, та усі додаткові сахариди є кон'югованими з PD. У додатковому втіленні 19F є кон'югованим з DT або CRM197, 19A є кон'югованим з пневмолізином, один (два або три) додатковий(і) сахарид(и) є кон'югованим(и) з ТТ, один додатковий сахарид є кон'югованим з пневмолізином, 2 додаткові сахариди є кон'югованими з PhtD або PhtD/E, та усі додаткові сахариди є кон'югованими з PD.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає білок D з *Haemophilus influenzae*. У цьому втіленні, якщо PD не є одним з білків носія, що використовуються для кон'югації будь-якого сахариду, відмінного від 19F, наприклад 19F, є кон'югованим з DT, у той час інші серотипи є кон'югованими з один або більше різними білками носія, які не є PD, то PD буде присутнім у вакцинній композиції як вільний білок. Якщо PD є одним з білків носія, що використовуються для кон'югації будь-якого сахариду, відмінного від 19F, то PD може необов'язково бути присутнім у вакцинній композиції як вільний білок.

Термін "сахарид" у даному описі може позначати полісахарид або олігосахарид та включає обидва. Полісахариди ізолюють з бактерії, вони можуть до деякої міри бути зменшені за розмірами за допомогою відомих способів (див, наприклад, EP497524 та EP497525) та бажано шляхом мікропсевдозрідження. Полісахариди можуть бути зменшені за розмірами для того, щоб знизити в'язкість у полісахаридних зразках та/або для поліпшення здатності до фільтрації кон'югованих продуктів. Олігосахариди мають нижчу кількість повторюваних одиниць (типово 5-30 повторюваних одиниць) та представляють собою типово гідролізовані полісахариди.

Капсулярні полісахариди *Streptococcus pneumoniae* включають повторювані олігосахаридні одиниці, які можуть містити аж до 8 цукрових залишків. Для огляду олігосахаридних одиниць для ключових серотипів *Streptococcus pneumoniae* див JONES, Christopher. *Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria*. An. Acad. Bras. Cienc, June 2005, vol. 77, no. 2, p. 293-324. ISSN0001-3765. В одному втіленні капсуляр-

ний сахаридний антиген може бути полісахаридом повної довжини, проте в інших він може бути однією олігосахаридною одиницею або мати коротший за сахарид нативної довжини ланцюг повторюваних олігосахаридних одиниць. В одному втіленні усі сахариди, що є присутніми у вакцинні, являють собою полісахариди. Полісахариди повної довжини можуть бути "калібровані (зменшені за розмірами)", тобто їх розмір може бути зменшений за допомогою різних способів, таких як гідролізна обробка, обробка перексидом водню, калібрування за розмірами при використанні Emulsiflex®, після чого проводять обробку перексидом водню для одержання олігосахаридних фрагментів або мікропсевдозрідження.

Автори також помітили, що область техніки було сфокусовано на застосуванні олігосахаридів для полегшення одержання кон'югатів. Авторі також виявили що при використанні нативних або трохи зменшених за розмірами полісахаридних кон'югатів, може бути реалізована одна або більше наступних переваг: 1) кон'югат, що має високу імуногенність є здатним до фільтрації, 2) співвідношення полісахариду до білка in the conjugate може бути зміненим так, що полісахариду до білка (w/w) у кон'югаті може бути підвищене (що має вплив на ефект супресії носія), 3) імуногенні кон'югати, схильні до гідролізу, можуть бути стабілізовані при використанні більш великих сахаридів для кон'югації. Застосування більш великих полісахаридів може приводити до посиленого поперечного зв'язування з носієм кон'югату та може знижувати вивільнення вільного сахариду з кон'югату. Кон'югатні вакцини, описані в області техніки, як правило піддають деполімеризації полісахаридів перед кон'югацією для того, щоб поліпшити кон'югацію. Авторі даного винаходу виявили, що сахаридні кон'югатні вакцини, що зберігають більш великий розмір сахариду, можуть забезпечувати кращу імунову відповідь проти пневмококового захворювання.

Імуногенна композиція згідно з винаходом може, таким чином, включаючи один або більше сахаридних кон'югатів де середній розмір (наприклад, середня молекулярна вага; M_w) кожного сахариду до кон'югації складає більше 80 кДа, 100 кДа, 200 кДа, 300 кДа, 400 кДа, 500 кДа або 1000 кДа. В одному втіленні один або більше сахаридних кон'югатів згідно з винаходом будуть мати середній розмір сахариду до кон'югації 50-1600, 80-1400, 100-1000, 150-500 або 200-400 кДа (слід зазначити, що де середній розмір являє собою M_w , 'кДа' одиниці будуть замінюватися у даній заявці на $\times 10^3$). В одному втіленні кон'югат після кон'югації буде легко фільтруватися через фільтр 0, 2 мікрона, так, що після фільтрації одержують вихід 50, 60, 70, 80, 90 або 95 % у порівнянні із зразком до фільтрації.

Для цілей даного винаходу "нативний полісахарид" відноситься до сахариду, який не піддавався процесу (наприклад, подальшій очистці), метою якого є зменшити розмір сахариду. Полісахарид може бути трохи зменшеним за розмірами під час звичайних процедур очистки. Такий сахарид все ще залишається нативним. Тільки якщо полісахарид

рид піддавався процедурам зміни розміру, тоді полісахарид не буде вважатися нативним.

Для цілей даного винаходу "калібрований за розміром з коефіцієнтом аж до x_2 " означає, що сахарид піддається процесу, призначеному для зменшення розміру полісахариду, але зберігається розмір, більший, ніж половина розміру нативного полісахариду. x_3 , x_4 , тощо інтерпретуються таким самим чином, тобто сахарид піддається процесу, призначеному для зменшення розміру полісахариду, але зберігається розмір, більший, ніж третина, четверта частина розміру нативного полісахариду.

В аспекті згідно з винаходом імуногенна композиція включає сахариди *Streptococcus pneumoniae* з принаймні 10 серотипів, кон'югованих з білком носія, де принаймні 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або кожний сахарид *S. pneumoniae* є нативним полісахаридом.

В одному аспекті згідно з винаходом імуногенна композиція включає сахариди *Streptococcus pneumoniae* з принаймні 10 серотипів, кон'югованих з білком носія, де принаймні 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або кожний сахарид *S. pneumoniae* є каліброваним за розміром з коефіцієнтом x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 , x_8 , x_9 або x_{10} . В одному втіленні цього аспекту більшість сахаридів, наприклад, 6, 7, 8 або більше сахаридів є каліброваними за розміром з коефіцієнтом аж до x_2 , x_3 , x_4 , x_5 , x_6 , x_7 , x_8 , x_9 або x_{10} .

Молекулярна вага та середня молекулярна вага (або розмір) сахариду в даній заявці відносяться до середньомолекулярної маси (M_w) сахариду, що вимірюється до кон'югації та вимірюється за допомогою MALLS.

MALLS технологія є добре відомою в області техніки та її типово проводять так, як описано у Прикладі 2. Для MALLS аналізу пневмококових сахаридів можуть використовуватися дві колонки (TSKG6000 та 5000PWxl) у комбінації, а сахариди вимиваються у воді. Сахариди визначають при використанні детектора розсіювання світла (наприклад, Wyatt Dawn DSP, оснащеного 10mW аргонним лазером 488 nm) та інтерферометричного рефрактометра (наприклад, Wyatt Otilab DSP, оснащеного P100 камерою та червоним фільтром 498 nm).

В одному втіленні сахариди *S. pneumoniae* є нативними полісахаридами або нативними полісахаридами, які можуть бути зменшеними за розмірами під час нормального процесу екстракції.

В одному втіленні сахариди *S. pneumoniae* є каліброваними за розмірами при використанні механічного розщеплення, наприклад, за допомогою мікропсевдозрідження або обробки ультразвуком. Мікропсевдозрідження та обробка ультразвуком мають перевагу у зменшенні розміру більш великих нативних полісахаридів у достатній мірі для того, щоб забезпечити одержання здатного до фільтрації кон'югату. Калібрування за розміром є таким, що має коефіцієнт, не більший за x_{20} , x_{10} , x_8 , x_6 , x_5 , x_4 , x_3 або x_2 .

В одному втіленні імуногенна композиція включає кон'югати *S. pneumoniae*, які є приготівленими із суміші нативних полісахаридів та сахаридів, що є каліброваними за розмірами з коефіцієн-

том не більше x_{20} . В одному аспекті більшість сахаридів, наприклад, 6, 7, 8 або більше сахаридів є каліброваними за розміром з коефіцієнтом аж до x_2 , x_3 , x_4 , x_5 або x_6 .

В одному втіленні сахарид *Streptococcus pneumoniae* є кон'югованим з білком носія через лінкер, наприклад, біфункціональний лінкер. Лінкер є необов'язково гетерофункціональним або гомофункціональним, та має, наприклад, реактивну аміногрупу та реактивну групу карбонової кислоти, 2 реактивні аміногрупи або дві реактивні групи карбонової кислоти. Лінкер містить, наприклад, від 4 до 20, від 4 до 12, від 5 до 10 атомів вуглецю. Можливий лінкер являє собою ADH. Інші лінкери включають В-пропіонамід (WO 00/10599), нітрофенілетиламін (Gever та ін. (1979). *Med. Microbiol. Immunol.* 165;171-288), галоалкілгаліди (US4057685), глікозидні зв'язки (US4673574, US4808700), гександіамін та 6-амінокапронову кислоту (US4459286). В одному втіленні ADH використовується як лінкер для кон'югації сахариду серотипу 18C.

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

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

карбаматної проміжної сполуки та злиттям CDI карбаматної проміжної сполуки з аміногрупою на білку.

Кон'югати можуть також бути одержані при використанні методик безпосереднього відновного амінування, як описано в US4365170 (Jennings) та US4673574 (Anderson). Інші способи є описаними в EP-0-161-188, EP-208375 та EP-0-477508.

Додатковий спосіб втягує злиття активованого за допомогою ціаногенбромиду (або CDAP) сахариду, дериватизованого при використанні гідразиду адипінової кислоти (ADH), з білком носія шляхом карбодіімідної конденсації (Chu C. та ін Infect. Immunity, 1983245256), наприклад, при використанні EDAC.

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

Комбінація методик також може використовуватися, з деякими сахарид-білковими кон'югатами, що є одержані при використанні CDAP, та деякими, приготовленими шляхом відновного амінування.

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

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

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

С) Сульфгідрильна група (наприклад, через цистеїн). В одному втіленні ця група зв'язується з бром- або хлорацетилованими сахарадами або лінкером за допомогою малеїмідного зв'язку. В

одному втіленні цю групу активують/модифікують при використанні біс-діазобензидину.

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

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

Ф) Гуанідильна група (наприклад, через аргінін).

Г) Індолільна група (наприклад, через триптофан).

В загальному випадку, наступні групи на сахариді можуть використовуватися для злиття: OH, COOH або NH₂. Альдегідні групи можуть бути одержані після різноманітних способів обробки, відомих в області техніки, а саме: періодат, кислотний гідроліз, пероксид водню, тощо

Підходи прямого злиття:

Сахарид-OH + CNBr або CDAP ----> ціанатний естер + NH₂-білок ----> кон'югат;

Сахарид-альдегід + NH₂-білок ----> Основа Шиффа + NaCNBH₃ ----> кон'югат;

Сахарид-COOH + NH₂-білок + EDAC ----> кон'югат;

Сахарид-NH₂ + COOH-білок + EDAC ----> кон'югат.

Підходи опосередкованого злиття через спейсер (лінкер):

Сахарид-OH + CNBr або CDAP ----> ціанатний естер + NH₂----NH₂ ----> сахарид----NH₂ + COOH-білок + EDAC ----> кон'югат;

Сахарид-OH + CNBr або CDAP ----> ціанатний естер + NH₂----SH ----> сахарид----SH+SH-білок (нативний білок з незахищеним цистеїном або одержаний після модифікації аміногруп білка, наприклад, за допомогою SPDP) ----> сахарид-S-S-білок;

Сахарид-OH + CNBr або CDAP ----> ціанатний естер + NH₂----SH----> сахарид----SH + малеїмід-білок(модифікація аміногруп) ----> кон'югат;

Сахарид-COOH + EDAC+NH₂----NH₂ ----> сахарид----NH₂ + EDAC + COOH-білок ----> кон'югат;

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂----SH ----> сахарид----SH + SH-білок (нативний білок з незахищеним цистеїном або одержаний після модифікації аміногруп білка, наприклад, за допомогою SPDP)----> сахарид-S-S-білок;

Сахарид-COOH + EDAC + NH₂----SH ----> сахарид----SH + малеїмід-білок (модифікація аміногруп) ----> кон'югат;

Сахарид-Альдегід + NH₂----NH₂ ----> сахарид----NH₂ + EDAC + COOH-білок ----> кон'югат.

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

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

кислоти) та SH групи (якщо це доступно) (наприклад, на цистеїнових залишках).

Необов'язково, співвідношення білка носія до сахариду *S. pneumoniae* складає від 1:5 до 5:1; від 1:2 до 2,5:1; від 1:1 до 2:1 (ваг/ваг). В одному втіленні більшість кон'югатів, наприклад, 6, 7, 8, 9 або більше кон'югатів має співвідношення білка носія до сахариду, яке є більшим за 1:1, наприклад, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1 або 1,6:1.

В одному втіленні принаймні один сахарид *S. pneumoniae* є кон'югованим з білком носія через лінкер при використанні CDAP та EDAC. Наприклад, 18C або 22F можуть бути кон'югованих з білком через лінкер (наприклад, такого, що має дві групи гідразини на своїх кінцях, такого, як ADH) при використанні CDAP та EDAC, як описано вище. Коли використовується лінкер, то CDAP використовується для кон'югації сахариду до лінкера, а EDAC використовується для кон'югації лінкера до білка, або альтернативно EDAC може використовуватися спочатку для кон'югації лінкера до білка, після чого CDAP може використовуватися для кон'югації лінкера до сахариду.

В загальному випадку імуногенна композиція згідно з винаходом може включати 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.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом містить кожний капсулярний сахарид *S. pneumoniae* при дозі в межах 0, 1-20 мкг; 0, 5-10 мкг; 0, 5-5 мкг або 1-3 мкг сахариду. В одному втіленні капсулярні сахариди можуть бути присутніми при різних дозуваннях, наприклад, деякі капсулярні сахариди можуть бути присутніми при дозі точно 1 мкг або деякі капсулярні сахариди можуть бути присутніми при дозі точно 3 мкг. В одному втіленні сахариди із серотипів 3, 18C та 19F (або 4, 18C та 19F) є присутніми при більш високих дозах, ніж інші сахариди. В одному аспекті цього втілення серотипи 3, 18C та 19F (або 4, 18C та 19F) є присутніми при дозах приблизно або точно 3 мкг, у той час як інші сахариди в імуногенній композиції є присутніми при дозах приблизно або точно 1 мкг.

"Близько" або "приблизно" визначаються у межах 10 % більше або менше даної цифри для цілей даного винаходу.

В одному втіленні принаймні один з капсулярних сахаридів *S. pneumoniae* є безпосередньо кон'югованим з білком носія (наприклад, при використанні одного зі зв'язків, описаних вище). Бажано, коли принаймні один з капсулярних сахаридів *S. pneumoniae* є безпосередньо кон'югованим за допомогою CDAP. В одному втіленні більшість капсулярних сахаридів, наприклад 5, 6, 7, 8, 9 або більше є безпосередньо зв'язаними з білком носія шляхом CDAP (див. WO 95/08348 та WO 96/29094).

Імуногенна композиція може включати білки *Streptococcus pneumoniae*, які в даній заявці називаються як білки *Streptococcus pneumoniae* згідно з винаходом. Такі білки може використовуватися як білки носія або можуть бути присутніми як вільні білки, або можуть бути присутніми і як білки носія, і як вільні білки. Білки *Streptococcus pneumoniae* згідно з винаходом є або поверхневими білками, принаймні протягом частини життєвого циклу пневмококу, або є білками, які секретуються або виділяються пневмококом. Бажано, коли білки згідно з винаходом є вибраними з наступних категорій, таких, як білки, що мають мотив LXXC сигнальної послідовності типу II (де X є будь-якою амінокислотою, наприклад з родини полігістидинових тріад (PhtX)), холінзв'язувальні білки (CbpX), білки, що мають мотив сигнальної послідовності типу I (наприклад, Sp101), білки, що мають LPXTG мотив (де X є будь-якою амінокислотою, наприклад, Sp128, Sp130) та токсини (наприклад, Ply). Бажані приклади цих категорій (або мотивів) являють собою наступні білки або їх імунологічно функціональні еквіваленти.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає принаймні 1 білок, вибраний з групи, яка складається з родини полігістидинових тріад (PhtX), родини холінзв'язувального білка (CbpX), вкорочених варіантів CbpX, родини LytX, вкорочених варіантів LytX, химерних білків вкорочений варіант CbpX - вкорочений варіант LytX (або злиті білки), пневмолізину (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 та Sp133. У додатковому втіленні імуногенна композиція включає 2 або більше білки, вибрані з групи, яка складається з родини полігістидинових тріад (PhtX), родини холінзв'язувального білка (CbpX), вкорочених варіантів CbpX, родини LytX, вкорочених варіантів LytX, химерних білків вкорочений варіант CbpX - вкорочений варіант LytX (або злиті білки), пневмолізину (Ply), Sp128.

Pht (полігістидинові тріади) родина включає білки PhtA, PhtB, PhtD та PhtE. Родина характеризується ліпідизацією послідовності, двома доменами, відокремленими ділянкою, багатою на пролін та декількома гістидиновими тріадами, що можливо є втягненими у зв'язування металів та нуклеозидів або ферментативну активність, (3-5) ділянками подвійної спіралі, консервативним N-термінальним кінцем та гетерологічним C-термінальним кінцем. Вона є присутньою в усіх штаммах досліджених пневмококів. Гомологічні білки також були виявлені в інших *Streptococci* та *Neisseria*. В одному втіленні згідно з винаходом Pht білок згідно з винаходом являє собою PhtD. Проте при цьому є зрозумілим, що терміни Pht A, B, D та E відносяться до білків, що мають послідовності, розкриті у посилання, наведених нижче, а також в існуючих у природі (або виготовлених людиною) їх варіантах, які мають гомологію послідовності, так, що вона є принаймні на 90 % ідентичною згаданим білкам. Бажано, коли вона є принаймні на 95 % ідентичною та найбільш бажано, коли вона є на 97 % ідентичною.

Стосовно PhtX білків, то PhtA є розкритим в WO 98/18930, та також згадується як Sp36. Як зазначено вище, цей білок з родини полігістидинових тріад, що має мотив сигнальної послідовності типу II LXXC. PhtD є розкритим в WO 00/37105, та також згадується як SpO36D. Як зазначено вище, цей білок з родини полігістидинових тріад, що має мотив сигнальної послідовності типу II LXXC. PhtB є розкритим в WO 00/37105, а також згадується як SpO36B. Інший член родини PhtB являє собою C3-розкладаючий поліпептид, як розкрито в

WO 00/17370. Цей білок також належить до родини поліглістидинових триад та має мотив сигнальної послідовності типу II LXXC. Переважний імунологічно функціональний еквівалент являє собою білок Sp42, розкритий в WO 98/18930. Вкорочений варіант PhtB (approximately 79 кДа) є розкритим в WO 99/15675, та також вважається членом родини PhtX. PhtE є розкритим в WO 00/30299 та згадується, як BVH-3. Якщо в даній заявці згадується будь-який білок Pht, то це означає, що можуть використовуватися усі імуногенні фрагменти або злиті білки Pht білка. Наприклад, посилання на PhtX включає його імуногенні фрагменти або злиті білки з будь-якого Pht білка. Посилання на PhtD або PhtB є також посиланням на PhtDE або PhtBE злитих білків, як описано, наприклад, у WO 0198334.

Пневмолізін являє собою мультифункціональний токсин з чіткою цитолітично (хемолітичною) активністю та активністю активації комплементу (Rubins та ін., *Am. Respir. Crit Care Med*, 153: 1339-1346 (1996)). Цей токсин не секретується пневмококом, але він вивільняється при лізисі пневмококу під впливом цитолізину. Його ефекти включають, наприклад, стимуляцію продукції запальних цитокінів людськими моноцитами, інгібування руху вічок на респіраторному епітелії людини та зниження бактеріальної активності та міграції нейтрофілів. Найбільш очевидний ефект пневмолізіну полягає у лізисі клітин крові, що втягує зв'язування холестерину. Оскільки він представляє собою токсин, він потребує знешкодження (тобто нетоксичний для людини, коли забезпечується у дозуванні, прийнятному для захисту) перед введенням *in vivo*. Експресія та клонування пневмолізіну дикого типу або нативного є відомим в області техніки. Див., наприклад, Walker та ін. (*Infect Immun*, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell та ін. (*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989) та Mitchell та ін. (*NAR*, 18:4010 (1990)). Знешкодження *ply* може бути проведена хімічними методами, наприклад, шляхом піддання обробці формаліном або глутаральдегідом або шляхом комбінації обох (WO 04081515, РСТ/EP2005/010258). Такі методи є добре відомими в області техніки для різних токсинів. Альтернативно, *ply* може бути знешкоджений генетично. Таким чином, винахід охоплює похідні пневмококового білка, які можуть бути, наприклад, мутованими білками. Термін "мутований" використовується в даній заявці для позначення молекули, яка піддається делеції, доданню або заміні однієї або більше амінокислот при використанні добре відомих методик для сайт-направленого мутагенезу або будь-якого іншого традиційного способу. Наприклад, як описано вище, мутантний *ply* білок може бути змінений так, що він є біологічно неактивний, у той час, як він все ще підтримує свої імуногенні епітопи, див., наприклад, WO 90/06951, Berry та ін. (*Infect Immun*, 67:981-985 (1999)) та WO 99/03884.

Як використовується в даній заявці, зрозуміло, що термін "*Ply*" відноситься до мутованого або знешкодженого пневмолізіну, прийнятного для медичного застосування (тобто нетоксичного).

Стосовно родини холінзв'язувального білка (CbpX) можна сказати, що члени цієї родини були спочатку ідентифіковані як пневмококові білки, що можуть бути очищені за допомогою холінафінної хроматографії. Усі холінзв'язувальні білки є нековалентно зв'язаними з фосфорилхоліновими залишками тейхоевої кислоти та асоційованої з мембраною ліпотейхоевої кислоти клітинної стінки. Структурно вони містять декілька ділянок, що є спільними для всієї родини, незважаючи на те, що точна природа цих білків (амінокислотна послідовність, довжина, тощо) може варіювати. В загальному випадку холінзв'язувальні білки включають N-термінальну ділянку (N), ділянки консервативних повторів (R1 та/або R2), багату на пролін ділянку (P) та а консервативну ділянку зв'язування холіну (C), що складається з численних повторів та включає приблизно половину цього білка. Як використовується у заявці, термін "родина холінзв'язувального білка (CbpX)" є вибраним з групи, яка складається з холінзв'язувальних білків, як ідентифіковано у WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD та CbpG. CbpA є розкритим в WO 97/41151. CbpD та CbpG є розкритими в WO 00/29434. PspC є розкритим в WO 97/09994. PbcA є розкритим в WO 98/21337. SpsA являє собою холінзв'язувальний білок, розкритий в WO 98/39450. Необов'язково холінзв'язувальні білки є вибраними з групи, яка складається з CbpA, PbcA, SpsA та PspC.

Інше переважне втілення являє собою CbpX вкорочені варіанти, де "CbpX" визначається вище, а "вкорочений варіант" відноситься до CbpX білків, в яких відсутні 50 % або більше холінзв'язувальної ділянки (C). Бажано, коли у таких білках повністю відсутня холінзв'язувальна ділянка. Більш бажано, коли такий вкорочений білок не містить (i) холінзв'язувальної ділянки та (ii) частини N-термінальної половини білка, а також ще зберігає принаймні одну повторювану ділянку (R1 або R2). Більш бажано, коли вкорочений варіант містить 2 повторювані ділянки (R1 та R2). Приклади таких переважних втілень являють собою NR1xR2 та R1xR2, як проілюстровано в WO 99/51266 або WO 99/51188, проте інші холінзв'язувальні білки, в яких відсутня подібна холінзв'язувальна ділянка, також передбачаються об'ємом даного винаходу.

Родина LytX являє собою асоційовані з мембраною білки, що пов'язані з лізисом клітин. N-термінальний домен включає холінзв'язувальний домен(и), проте родина LytX усіх ознак, які виявлені у родині CbpA, зазначені вище, таким чином, для даного винаходу LytX родина вважається такою, що відрізняється від родини CbpX. На відміну від родини CbpX, C-термінальний домен містить каталітичний домен родини LytX білка. Родина включає LytA, B та C. Стосовно родини LytX слід сказати, що LytA є розкритим в Ronda та ін., *Eur J. Biochem*, 164:621-624 (1987). LytB є розкритим в WO 98/18930, що також згадується як Sp46. LytC є також розкритим в WO 98/18930, він також називається Sp91. Бажаний член цієї родини являє собою LytC.

Інше втілення являє собою LytX вкорочені варіанти, де "LytX" є визначений вище, а "вкорочений

варіант" відноситься до *LytX* білків, в яких відсутні 50 % або більше холінзв'язувальної ділянки. Бажано, коли у таких білках повністю відсутня холінзв'язувальна ділянка. Ще одне переважне втілення даного винаходу являє собою химерні білки вкорочений варіант *CbpX*-вкорочений варіант *LytX* (або злиті білки). Бажано такі включають *NR1xR2* (або *R1xR2*) *CbpX* та *C*-термінальну частину (*Cterm*, тобто таку, що не містить холінзв'язувальних доменів) *LytX* (наприклад, *LytCCterm* або *Sp91Cterm*) Більш бажано, коли *CbpX* є вибраним з групи, яка складається з *CbpA*, *PbcA*, *SpsA* та *PspC*. Більш бажано такий являє собою *CbpA* Бажано, коли *LytX* являє собою *LytC* (що також згадується як *Sp91*) Інше втілення згідно з даним винаходом являє собою *PspA* або *PsaA* вкорочені варіанти, що не містять холінзв'язувального домену (*C*) та експресуються як злитий білок з *LytX* Бажано, коли *LytX* являє собою *LytC*.

Стосовно *PsaA* та *PspA*, то слід зазначити, що вони обидва є відомими з рівня техніки Наприклад, *PsaA* та його трансмембранний варіант були описані Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec; 64(12):5255-62 *PspA* та його трансмембранні делеційні варіанти були розкриті, наприклад, в US5804193, WO 92/14488 та WO 99/53940.

Sp128 та *Sp130* є розкритими в WO 00/76540. *Sp125* являє собою приклад пневмококового поверхневого білка із закріпленням на клітинній стінці фрагментом LPXTG (де *X* є будь-якою амінокислотою). Будь-який білок у межах цього класу пневмококового поверхневого білка з цим фрагментом був виявленим корисним у межах контексту даного винаходу, та таким чином, вважається додатковим білком згідно з винаходом *Sp125* сам по собі є розкритим в WO 98/18930, та є також відомим як *ZmpB* - цинкова металопротеїназа. *Sp101* є розкритим в WO 98/06734 (де він мав позначення # у85993) Він характеризується сигнальною послідовністю типу I. *Sp133* є розкритим в WO 98/06734 (де він мав позначення # у85992) Він також характеризується сигнальною послідовністю типу I.

Приклади бажаних білкових антигенів *Moraxella catarrhalis*, які можуть включатися у комбінаційну вакцину (зокрема, для запобігання середнього отиту), являють собою OMP106 [WO 97/41731 (*Antex*) та WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 або його фрагменти (WO 0018910); *LbpA* та/або *LbpB* [WO 98/55606 (PMC)]; *TbpA* та/або *TbpB* [WO 97/13785 та WO 97/32980 (PMC)]; *CorB* [Helminen ME, та ін. (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); *lipo06* (GB 9917977,2); *lipo10* (GB 9918208,1); *lipo11* (GB 9918302,2); *lipo18* (GB 9918038,2); *P6* (PCT/EP99/03038); *D15* (PCT/EP99/03822) *OmplAI* (PCT/EP99/06781); *Hly3* (PCT/EP99/03257); та *OmpE*. Приклади нетипованих антигенів *Haemophilus influenzae* або їх фрагментів, які можуть включатися у комбінаційну вакцину (зокрема, для запобігання середнього отиту), включають: фімбриновий білок [(US5766608-Ohio State Research Foundation)] та злиті білки, що включає його пептиди [наприклад, злиті білки

LB1(f) пептиду; US5843464 (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*; *Hap*; *D15* (WO 94/12641); *P2* та *P5* (WO 94/26304).

Білки згідно з винаходом можуть також бути вигідним чином поєднані. Під поєднанням розуміють, що імуногенна композиція включає білки з наступних комбінацій, або як білки носія, або як вільні білки або суміш цих двох. Наприклад, у комбінації двох білків, як представлено в даній заявці нижче, обидва білки можуть використовуватися як білки носія або обидва білки можуть бути присутніми як вільні білки, або обидва можуть бути присутніми як носій та як вільний білок, або один може бути присутнім як білок носія та вільний білок, у той час, як інший є присутнім тільки як білок носія або тільки як вільний білок, або один може бути присутнім як білок носія, а інший - як вільний білок. Коли представлена комбінація трьох білків, то існують подібні можливості. Бажані комбінації включають, але не обмежені такими, як *PhtD*+*NR1xR2*, *PhtD*+*NR1xR2*-*Sp91Cterm* химерні або злиті білки, *PhtD*+*Ply*, *PhtD*+*Sp128*, *PhtD*+*PsaA*, *PhtD*+*PspA*, *PhtA*+*NR1xR2*, *PhtA*+*NR1xR2*-*Sp91Cterm* химерні або злиті білки, *PhtA*+*Ply*, *PhtA*+*Sp128*, *PhtA*+*PsaA*, *PhtA*+*PspA*, *NR1xR2*+*LytC*, *NR1xR2*+*PspA*, *NR1xR2*+*PsaA*, *NR1xR2*+*Sp128*, *R1xR2*+*LytC*, *R1xR2*+*PspA*, *R1xR2*+*PsaA*, *R1xR2*+*Sp128*, *R1xR2*+*PhtD*, *R1xR2*+*PhtA*. Бажано, коли *NR1xR2* (або *R1xR2*) є таким з *CbpA* або *PspC*. Більш бажано, коли такий являє собою *CbpA*. Інші комбінації включають 3 білки, такі, як *PhtD*+*NR1xR2*+*Ply* та *PhtA*+*NR1xR2*+*PhtD*. В одному втіленні вакцинна композиція включає знешкоджений пневмолізін та *PhtD* або *PhtDE* як білки носія. У додатковому втіленні вакцинна композиція включає знешкоджений пневмолізін та *PhtD* або *PhtDE* як вільні білки.

В одному незалежному аспекті даний винахід забезпечує імуногенну композицію, що включає принаймні чотири кон'югати капсулярних сахаридів *S. pneumoniae*, що містять сахариди з різних серотипів *S. pneumoniae* serotypes, де принаймні один сахарид є кон'югованим з *PhtD* його злитим білком, та імуногенна композиція є здатною викликати ефективну імунну відповідь проти *PhtD*.

Ефективна імунна відповідь проти *PhtD* або його злитого білка вимірюється, наприклад, при використанні протективного аналізу так, як описано у Прикладі 15. Ефективна імунна відповідь забезпечує принаймні 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 % виживання через 7 днів після контрольного зараження гетерологічним штамом. З урахування того, що штам для контрольного зараження є гетерологічним, захист, що надається є таким завдяки імунній відповіді проти *PhtD* або його злитого білка.

Альтернативно, ефективна імунна відповідь проти *PhtD* вимірюється шляхом ELISA, як описано у Прикладі 14. Ефективна імунна відповідь дає анти-*PhtD* IgG відповідь на рівні 250, 300, 350, 400, 500, 550 чи 600 мкг/мл GMC.

Наприклад, імуногенна композиція включає принаймні 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 капсулярних

сахаридів *S. pneumoniae* з різних серотипів, кон'югованих з PhtD або його злитим білком. Наприклад, серотипи 22F та 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7, а також додатково вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 23F та 33F кон'югують з PhtD. В одному втіленні два або три серотипи 3, 6A та 22F кон'югують з PhtD або його злитим білком.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає капсулярний сахарид *S. pneumoniae*, кон'югований з PhtD або його злитим білком за допомогою лінкера, наприклад, ADH. В одному втіленні використовується одна із хімії, приведених нижче.

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає принаймні один капсулярний сахарид *S. pneumoniae*, кон'югований з PhtD або його злитим білком, де співвідношення PhtD до сахариду у кон'югаті складає від 6:1 до 1:5, від 6:1 до 2:1, від 6:1 до 2,5:1, від 6:1 до 3:1, від 6:1 до 3,5:1 (ваг/ваг) або більше, ніж (тобто містить більшу пропорцію PhtD) 2,0:1, 2,5:1, 3,0:1, 3,5:1 або 4,0:1 (ваг/ваг).

В одному втіленні імуногенна композиція згідно з винаходом включає пневмолізін.

Даний винахід додатково забезпечує вакцину, що містить імуногенні композиції згідно з винаходом та фармацевтично прийнятний наповнювач.

Вакцини згідно з даним винаходом можуть містити ад'ювант, зокрема, коли призначення для застосування у популяції людей похилого віку, але також і для застосування у популяції немовлят. Прийнятні ад'юванти включають солі алюмінію, такі, як гель гідроокису алюмінію або фосфат алюмінію або галуни, але можуть також бути представлені кальцієм, магнієм, залізом або цинком або можуть бути нерозчинною суспензією ацилизованого тирозину або ацилованих цукрів, катіонно або аніонно дериватизованими сахарами, або поліфосфазенами.

Ад'ювант необов'язково вибирають як такий, що є переважним індуктором відповіді TH1 типу. Такі високі рівні цитокінів TH1-типу мають тенденцію до сприятливої індукції опосередкованих клітинами відповідей на даний антиген, у той час, як високі рівні цитокінів TH2-типу мають тенденцію до сприятливої індукції гуморальних імунних відповідей на антиген.

Відмінність імунної відповіді Th1 та Th2-типу не є абсолютною. На практиці індивідуум буде підтримувати імунну відповідь, яка описується як така, що є переважно Th1 або переважно Th2. Проте часто є зручним розглядати родини цитокінів стосовно того, як вони описані у мишачих CD4+ve клонах Т-клітин Mosmann та Coffman (Mosmann, T. R. та Coffman, R. L. (1989) TH1 та TH2 клітини: різні моделі секреції цитокінів приводять до різних функціональних властивостей. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Традиційно відповіді Th1-типу є асоційованими з продукцією INF- γ та IL-2 цитокінів Т-лімфоцитами. Інші цитокіни, що часто безпосередньо асоціюються з імунними відповідями Th1-типу, не продукуються Т-клітинами, такими, як IL-12. На відміну від цього відповіді Th2-типу асоціюються із секрецією IL4, IL-

5, IL-6, IL-10. Прийнятні ад'ювантні системи, які сприяють переважній Th1 відповіді, включають: монофосфорил ліпід А або його похідні, зокрема, 3-де-О-ацилований монофосфорил ліпід А (3D-MPL) (для його приготування див. GB 2220211 A); та комбінацію монофосфорил ліпиду А, бажано 3-де-О-ацилований монофосфорил ліпід А, або разом із сіллю алюмінію (наприклад, фосфатом алюмінію або гідроокислом алюмінію) або з емульсією масло-у-воді. У таких комбінаціях антиген та 3D-MPL містяться у тих самих окремих структурах, що дозволяє проводити більш ефективну доставку антигенних та імуностимуляторних сигналів. Дослідження показали, що 3D-MPL є здатним до додаткового підвищення імуногенності адсорбованого на алюмінію антигену [Thoelen та ін. Vaccine (1998) 16:708-14; EP689454-B1].

Поліпшена система втягує комбінацію монофосфорил ліпиду А та похідної сапоніну, зокрема, комбінацію QS21 та 3D-MPL, як розкрито в WO 94/00153, або менш реактогенну композицію, де QS21 пригнічується холестеринном, як розкрито в WO 96/33739. Зокрема, потужна ад'ювантна композиція, яка включає QS21, 3D-MPL татокоферол в емульсії масло-у-воді, описується у WO 95/17210. В одному втіленні імуногенна композиція додатково включає сапонін, який може являти собою QS21. Композиція може також включати емульсію масло-у-воді та токоферол (WO 95/17210). Олігонуклеотиди, що містять неметилований CpG (WO 96/02555), та інші імуномодуляторні олігонуклеотиди (WO 0226757 та WO 03507822) є також бажаними індукторами TH1 відповіді та є прийнятними для застосування у даному винаході.

Особливими ад'ювантами є ті, що вибрані з групи солей металів, емульсій масло-у-воді, агоністів Toll-подібних рецепторів, (зокрема, агоніст Toll-подібного рецептора 2, агоніст Toll-подібного рецептора 3, агоніст Toll-подібного рецептора 4, агоніст Toll-подібного рецептора 7, агоніст Toll-подібного рецептора 8 та агоніст Toll-подібного рецептора 9), сапонінів та їх комбінацій.

Ад'ювант, що може використовуватися з вакцинними композиціями згідно з винаходом є блеб або препарати везикул зовнішньої мембрани з Грам-негативних бактеріальних штамів, такі, як описані у WO 02/09746, зокрема, блеби *N. meningitidis*. Ад'ювантні властивості блебів можуть бути поліпшені шляхом збереження LOS (ліпополісахаридів) на їх поверхні (наприклад, за допомогою екстракції при використанні низьких концентрацій детергенту [наприклад, 0-0,1 % дезоксихолат]). LOS можуть бути знешкоджені шляхом msbB(-) або htrB(-) мутацій, що обговорюються у WO 02/09746. Ад'ювантні властивості можуть бути також поліпшені шляхом збереження PorB (та необов'язково шляхом видалення PorA) з менингококових блебів. Ад'ювантні властивості можуть також бути поліпшені шляхом вкорочення структури зовнішнього каркасного сахариду LOS на менингококових блебах, наприклад за допомогою lgtB(-) мутації, що обговорюється у WO 2004/014417. Альтернативно, згадані вище LOS (наприклад, ізольовані з msbB(-) та/або lgtB(-)

штаму) можуть бути очищені та використані як ад'ювант у композиціях згідно з винаходом.

Додатковий ад'ювант, який може використовуватися з композиціями згідно з винаходом, може бути вибраним з групи: сапонін, ліпід А або його похідні, імуностимуляторний олігонуклеотид, алкілглюкозаміндифосфат, емульсія масло-у-воді або їх комбінації. Додатковий бажаний ад'ювант являє собою сіль металу у комбінації з іншим ад'ювантом. Є бажаним, коли ад'ювант є агоністом Toll-подібного рецептора, зокрема, агоністом Toll-подібного рецептора 2, 3, 4, 7, 8 або 9, або сапонін, зокрема, Qs21. Також є бажаним, коли ад'ювантна система включає два або більше ад'юванти з приведенного вище списку. Зокрема, комбінації бажано містять сапоніновий (зокрема, Qs21) ад'ювант та/або агоніст Toll-подібного рецептора 9, такий, як CrG, що містить імуностимуляторний олігонуклеотид. Інші переважні комбінації включають сапонін (зокрема, QS21) та агоніст Toll-подібного рецептора 4, такий, як монофосфорил ліпід А або його 3 деацильовану похідну, 3D-MPL або сапонін (зокрема, QS21) та ліганд Toll-подібного рецептора 4, такий, як алкілглюкозаміндифосфат.

В одному втіленні ад'юванти являють собою комбінації 3D-MPL та QS21 (EP 0671948 B1), емульсії масло-у-воді, що включають 3D-MPL та QS21 (WO 95/17210, WO 98/56414) або 3D-MPL, рецептований з іншими носіями (EP 0689454 B1). Інші бажані ад'ювантні системи включають комбінацію 3D-MPL, QS21 та CrG олігонуклеотиду, як описано в US6558670, US6544518.

В одному втіленні ад'ювант являє собою (або включає) ліганд Toll-подібного рецептора (TLR) 4, бажано агоніст, такий, як похідна ліпиду А, зокрема, монофосфорил ліпід А або більш бажано 3-деацильований монофосфорил ліпід А (3D-MPL).

3D-MPL є доступним від GlaxoSmithKline Biologicals North America та в першу чергу поліпшує CD4+ Т-клітинні відповіді з IFN- γ (Th1) фенотипом. Він може бути одержаний згідно зі способами, розкритими в GB 2220211 А. Хімічно це є сумішшю 3-деацильованого монофосфорил ліпиду А з 3, 4, 5 або 6 ацильованими ланцюгами. Бажано використовувати у композиціях згідно з даним винаходом маленькі частинки 3D-MPL. Маленькі частинки 3D-MPL мають такий розмір частинок, що вони можуть стерильно фільтруватися через фільтр 0,22 мкм. Такі препарати є описаними у міжнародній патентній заявці WO 94/21292. Синтетичні похідні ліпиду А є відомими та, як передбачається, є TLR 4 агоністами. Такі включають, але без обмеження:

ОМ 174 (2-дезоксигалакто-6-о-[2-дезоксигалакто-2-[(R)-3-додеканоїлокситетра-деканоїламіно]-4-о-фосфоно- β -D-глюкопіранозил]-2-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]- α -D-глюкопіранозилдигідрофосфат), (WO 95/14026)

ОМ 294DP (3S, 9R) -3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-5-аза-9(R)-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол,1,10-біс(дигідрофосфат) (WO 99/64301 та WO 00/0462)

ОМ 197 MP-As DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-5-аза-9-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол, 1-дигідрофосфат 10-(6-аміногексаноат) (WO 01/46127)

Інші TLR4 ліганди, які можуть використовуватися, являють собою алкілглюкозаміндифосфати (AGP), такі, як ті, що розкриті в WO 9850399 або US6303347 (способи для одержання AGP є також розкритими) або фармацевтично прийнятні солі AGP, як розкрито в US6764840. Деякі AGP є TLR4 агоністами, та деякі є TLR4 антагоністами. Обидва, як передбачається, є корисними як ад'юванти.

Інший бажаний імуностимулятор для застосування в даному винаході являє собою Quil A та його похідні. Quil A є препаратом сапоніну, ізольованим з південноамериканського дерева Quilaja Saponaria Molina, та був вперше описаний як такий, що володіє ад'ювантною активністю Dalsgaard та ін. у 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p.243-254). Очищені фрагменти Quil A були ізольовані шляхом ВЕРХ, що зберігає ад'ювантну активність без токсичності, асоційованої з Quil A (EP 0362278), наприклад, QS7 та QS21 (що є також відомими як QA7 та QA21). QS-21 є природним сапоніном, що одержаний з кори Quilaja saponaria Molina, він індукує CD8+ цитотоксичність Т клітин (CTL), Th1 клітин та переважну відповідь IgG2a антитіла, а також є переважним сапоніном у контексті даного винаходу.

Були описані окремі композиції QS21, які, зокрема, додатково включають стерин (WO 96/33739). Сапоніни, що утворюють частину згідно з даним винаходом, можуть бути відокремлені у формі міцел, змішаних міцел, (переважно, але не виключно з солями жовчних кислот) або можуть бути у формі ISCOM матриць (EP 0109942 B1), ліпосоми або споріднені колоїдні структури, такі, як червоподібні або кільцеподібні мультимерні комплекси або ліпідні/шаруваті структури та ламели, коли рецептуються з холестерином та ліпідом, або у формі емульсії масло-у-воді (наприклад, як у WO 95/17210) Сапоніни можуть бажано бути асоційовані із солями металів, такими, як гідроокис алюмінію або фосфат алюмінію (WO 98/15287).

Необов'язково, сапонін є представленим у формі ліпосоми, ISCOM або емульсії масло-у-воді

Поліпшена система втягує комбінацію монофосфорил ліпиду А (або знешкодженого ліпиду А) та похідної сапоніну, зокрема, комбінацію QS21 та 3D-MPL, як розкрито в WO 94/00153, або менш реактогенну композицію, в якій QS21 пригнічується холестерином, як розкрито в WO 96/33739. Зокрема, потужна ад'ювантна композиція, що включає токоферол з або без QS21 та/або 3D-MPL в емульсії масло-у-воді, є описаною в WO 95/17210 В одному втіленні імуногенна композиція додатково включає сапонін, який може являти собою QS21.

Імуностимуляторні олігонуклеотиди або будь-які інші агоністи Toll-подібного рецептора (TLR) 9 можуть також використовуватися. Бажані олігонуклеотиди для застосування в ад'ювантах або вакцинах згідно з даним винаходом являють собою

СрG вмісні олігонуклеотиди, бажано такі, що містять два або більше динуклеотид СрG фрагментів, відокремлених принаймні трьома, більш бажано принаймні шістьма або більше нуклеотидами. СрG фрагмент являє собою цитозиновий нуклеотид, після якого йде гуаніновий нуклеотид. СрG олігонуклеотиди згідно з даним винаходом являють собою типово дезоксинуклеотиди. У бажаному втіленні інтернуклеотид у олігонуклеотиді являє собою фосфородитіоат, або більше бажано фосфородитіоатний зв'язок, хоча фосфодіестер та інші інтернуклеотидні зв'язки bonds також передбачаються в об'ємі даного винаходу. Також в об'ємі даного винаходу включаються олігонуклеотиди зі змішаними інтернуклеотидними зв'язками. Способи одержання фосфородитіоатних олігонуклеотидів або фосфородитіоату є описаними у US5,666,153, US5,278,302 та WO 95/26204.

Приклади бажаних олігонуклеотидів мають наступні послідовності. Послідовності бажано містять фосфородитіоатний модифікований інтернуклеотидний зв'язок.

ОЛІГО 1 (SEQ ID NO:1) TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (СрG1826)

ОЛІГО 2 (SEQ ID NO:2) TCT CCC AGC GTG CGC CAT (СрG1758)

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

ОЛІГО 4 (SEQ ID NO:4) TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (СрG2006)

ОЛІГО 5 (SEQ ID NO:5) TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (СрG1668)

ОЛІГО 6 (SEQ ID NO:6) TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (СрG5456)

Альтернативні СрG олігонуклеотиди можуть включати бажані послідовності, приведені вище, в яких вони мають несуттєві делеції або доповнення.

СрG олігонуклеотиди, що використовуються в даному винаході, можуть бути синтезовані у відповідності з будь-якими способами, відомими в області техніки (наприклад, див. EP 468520). Так, ці олігонуклеотиди можуть бути синтезовані при використанні автоматичного синтезатора.

Ад'ювант може бути емульсією масло-у-воді або може включати емульсію в комбінації з іншими ад'ювантами. Масляна фаза емульсійної системи бажано включає здатне до метаболізації масло. Значення терміну "здатне до метаболізації масло" є добре відомим в області техніки. Здатне до метаболізації може бути визначене "здатне до трансформзації шляхом метаболізму" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (1974)). Масло може бути будь-якої рослинною олією, риб'ячою маслом, тваринним або синтетичним маслом, яке не є токсичним для реципієнта та є здатним трансформуватися шляхом метаболізму. Горіхи, насіння та зерно є загальновідомими джерелами рослинних олій. Синтетичні масла також є частиною даного винаходу та можуть включати комерційно доступні масла, такі, як NEOBEE® та інші. Сквален (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракозагексаєн) є ненасиченим маслом, яке знаходиться у великій кількості у маслі, одержаному з

печінки акули, та у більш низьких кількостях в оливковій олії, олії зародків пшениці, рисовій олії та дріжджах, та є, зокрема, бажаним маслом для застосування у даному винаході. Сквален являє собою здатну до метаболізації олію з урахуванням того факту, що він являє собою проміжну сполуку у біосинтезі холестерину (Merck index, 10th Edition, entry no. 8619).

Токоли (наприклад, вітамін E) також часто використовуються в ад'ювантах на основі масляних емульсій (EP 0382271 B1; US5667784; WO 95/17210). Токоли, що використовуються у масляних емульсіях (бажано в емульсіях масло-у-воді) згідно з винаходом, можуть бути рецептовані так, як описано в EP 0382271B1, з цієї причини токоли можуть бути дисперсіями токолових крапель, що необов'язково включають емульгатор, з розміром крапель менше 1 мікрона у діаметрі. Альтернативно, токоли можуть використовуватися у комбінації з іншими маслами, з утворенням масляної фази масляної емульсії. Приклади масляних емульсій, що можуть використовуватися у комбінації з токолом, є описаними у даній заявці вони можуть являти собою здатне до метаболізації масло, як описано вище.

Ад'юванти на основі емульсії масло-у-воді самі по собі були запропоновані як корисні для ад'ювантних композицій (EP 0399843B), крім того, комбінації емульсій масло-у-воді та інших активних агентів були описані як ад'юванти для вакцин (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/1241). Інші ад'юванти на основі емульсії масло-у-воді були описані, наприклад такі емульсії, як вода-у-маслі (US 5,422,109; EP 0480982B2) та вода-у-маслі у водних емульсіях (US 5,424,067; EP 0480981B). Усі вони утворюють бажані масляні емульсійні системи (зокрема, при введенні токолів) з утворенням ад'ювантів та композицій згідно з даним винаходом.

В одному втіленні масляна емульсія (наприклад емульсії масло-у-воді) додатково включає емульгатор такий, як TWEEN80 та/або стерин, такий, як холестерин.

В одному втіленні масляна емульсія (бажано емульсія масло-у-воді) включає здатне до метаболізації нетоксичне масло, таке, як сквален, сквален або токоферол, такий, як альфа-токоферол (та бажано обидва: сквален та токоферол) та необов'язково емульгатор (або поверхнево-активну сполуку), такий, як Tween 80. Може також бути включений стерин (бажано холестерин).

Спосіб одержання емульсії масло-у-воді є добре відомим спеціалісту в даній області техніки. В загальному випадку спосіб включає змішування токоловмісної масляної фази з поверхнево-активною речовиною, такою, як розчин PBS/TWEEN80™, після чого проводять гомогенізацію при використанні гомогенізатора, спеціалістові в даній області техніки буде зрозумілим, що спосіб, який включає пропускання суміші двічі через голку шприца, буде прийнятним для гомогенізації невеликих об'ємів рідини. У тій самій мірі процес емульгування у мікропсевдозріджувальному пристрої (M110S Microfluidics machine, макси-

мум 50 пропускать, протягом 2 хвилин при максимальному тиску на вході 6 бар (тиск на виході 850 бар)) можуть бути адаптовані спеціалістом в даній області техніки для одержання більших або менших об'ємів емульсії. Пристосування можуть бути досягнуті шляхом простого експерименту, що включає вимірювання одержаної емульсії, поки не буде досягнуто одержання емульсії з необхідним діаметром крапель.

В емульсії масло-у-воді масло та емульгатор будуть знаходитися у водному носії. Водний носій може являти собою, наприклад, забуферений фосфатом фізіологічний розчин.

Розмір масляних крапель, що знаходяться у стабільній емульсії масло-у-воді є бажано меншим 1 мікрона, може бути в інтервалі суттєво 30-600 нм, бажано суттєво близько 30-500 нм у діаметрі, та найбільш бажано суттєво 150-500 нм у діаметрі, та зокрема, приблизно 150 нм у діаметрі, як вимірюється методом фотон кореляційної спектроскопії. Так, 80 % числа масляних крапель буде знаходитися у межах бажаних інтервалів, більш бажано більше 90 %, та найбільш бажано більше 95 % числа масляних крапель знаходяться у межах визначених інтервалів розміру. Кількість компонентів, що є присутніми у масляних емульсіях згідно з даним винаходом, традиційно знаходиться в межах від 0,5 до 20 % або від 2 до 10 % масла (об'єму загальної дози), такого, як сквален; та у разі присутності від 2 до 10 % альфа-токоферолу; та від 0, 3 до 3 % поверхнево-активної сполуки, такої, як поліоксиетиленсорбіт моноолеат. Бажано, коли співвідношення масло (бажано сквален): токол (бажано альфа-токоферол) є рівним або меншим 1, оскільки це забезпечує більш стабільну емульсію. Емульгатор, такий, як Tween80 або Span85, може також бути присутнім на рівні приблизно 1 %. У деяких випадках може бути бажаним, коли вакцини згідно з даним винаходом будуть додатково містити стабілізатор.

Приклади бажаних емульсійних систем є описаними у WO 95/17210, WO 99/11241 та WO 99/12565, які розкривають емульсійні ад'юванти, на основі сквалену, альфа-токоферолу та TWEEN 80, необов'язково рецептовані з імуностимуляторами QS21 та/або 3D-MPL. Таким чином в особливо бажаному втіленні даного винаходу, ад'ювант згідно з винаходом може додатково включати додаткові імуностимулятори, такі, як LPS або його похідні та/або сапоніни. Приклади додаткових імуностимуляторів є описаними в даній заявці та у "Vaccine Design-The Subunit та Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., та Newman, M.J., Plenum Press, New York та London, ISBN 0-306-44867-X.

В одному втіленні ад'ювант та імуногенні композиції згідно з винаходом включають сапонін (бажано QS21) та/або LPS похідну (бажано 3D-MPL) у масляній емульсії, описаній вище, необов'язково зі стерином (бажано холестерин). Додатково масляна емульсія (бажано емульсія масло-у-воді) може містити span85 та/або лецитин та/або трикаприлін. Ад'юванти, що включають емульсію масло-

у-воді, стерин та сапонін, є описаними у WO 99/12565.

Типово, для введення людині сапонін (бажано QS21) та/або LPS похідна (бажано 3D-MPL) буде міститися у дозі імуногенної композиції для людини в інтервалі 1 мкг -200 мкг, наприклад, 10-100 мкг, бажано 10 мкг-50 мкг на дозу. Типово, масляна емульсія (бажано емульсія масло-у-воді) буде включати від 2 до 10 % здатної до метаболізації олії. Бажано вона буде включати від 2 до 10 % сквалену, від 2 до 10 % альфа-токоферолу та від 0, 3 до 3 % (бажано 0, 4-2 %) емульгатора (бажано tween80 [поліоксиетиленсорбіт моноолеат]). Коли є присутніми сквален та альфа-токоферол, бажано співвідношення сквален: альфа-токоферол є рівним або меншим 1, оскільки це забезпечує більш стабільну емульсію. Span85 (сорбіттриолеат) може також бути присутнім на рівні від 0,5 до 1 % в емульсії, що використовується у винаході. У деяких випадках може бути бажаним, коли імуногенні композиції та вакцини згідно з даним винаходом будуть додатково містити стабілізатор, наприклад, інші емульгатори/поверхнево-активні речовини, включаючи каприлову кислоту (merck index10th Edition, entry no. 1739), де трикаприлін є особливо бажаним.

Коли включаються сквален та сапонін (бажано QS21), також є вигідним також додавати стерин (бажано холестерин) до композиції, оскільки це дозволяє знизити загальний рівень масла в емульсії. Це приводить до зниження витрат на виробництво, поліпшення загального комфорту вакцинації, а також до кількісних та якісних поліпшень одержаних імунних відповідей, таких, як поліпшена продукція IFN-γ. Таким чином, ад'ювантна система згідно з даним винаходом типово включає співвідношення здатного до метаболізації масла та сапоніну сапонін (ваг/ваг) у межах від 200:1 до 300:1, крім того, даний винахід може використовуватися форму "низького масла" бажаний інтервал для якої складає від 1:1 до 200:1, бажано від 20:1 до 100:1, та найбільш бажано суттєво 48:1, ця вакцина зберігає сприятливі ад'ювантні властивості усіх компонентів зі значно зниженим профілем реактогенності. Згідно з цим особливо бажані втілення мають співвідношення сквален:QS21 (ваг/ваг) в інтервалі від 1:1 до 250:1, також бажаний інтервал складає від 20:1 до 200:1, бажано від 20:1 до 100:1, та найбільш бажано суттєво 48:1. Бажано, коли стерин (найбільш бажано холестерин) також включається, та співвідношення сапонін:стерин є таким, як описано в даній заявці.

Емульсійні системи згідно з даним винаходом бажано мають невеликий розмір крапель у субмікронному діапазоні. Найбільш бажано, коли розміри крапель будуть в інтервалі від 120 до 750 нм, та найбільш бажано від 120 до 600 нм у діаметрі.

Зокрема, потужна ад'ювантна композиція (для заключної комбінації з AIPO4 в імуногенних композиціях згідно з винаходом) містить сапонін (бажано QS21), LPS похідну (бажано 3D-MPL) та масляну емульсію (бажано сквален та альфа-токоферол в емульсії масло-у-воді)CPM, як описано у WO 95/17210 або у WO 99/12565 (зокрема, ад'ювантна композиція 11 у Прикладі 2, Таблиця 1).

Приклади TLR 2 агоніста включають пептидоглікан або ліпопротеїн. Імідазохіноліни, такі, як іміквімод та резиквімод є відомими TLR7 агоністами. Одноланцюгова РНК є також відомим TLR агоністом (TLR8 у людей та TLR7 мишей), де одноланцюгова РНК та полі ІС (поліінозинова-поліцитидилова кислота - комерційний синтетичний міметик вірусної РНК) є прикладами TLR 3 агоністів. 3D-MPL є прикладом TLR4 агоніста, у той час, як CPG являє собою приклад TLR9 агоніста.

Імуногенна композиція може включати антиген та імуностимулятор, адсорбований на солі металу. Вакцинні композиції на основі алюмінію, де антиген та імуностимулятор 3-де-О-ацилований монофосфорил ліпід А (3D-MPL), є адсорбованими на одній тій самій частинці, є описаними у EP 0576478 B1, EP 0689454 B1, та EP 0633784 B1. У цих випадках антиген спочатку адсорбують на солі алюмінію, після чого здійснюють адсорбцію імуностимулятора 3D-MPL на ті самі частинки солі алюмінію. Такі процеси спочатку передбачають приготування суспензії 3D-MPL шляхом обробки ультразвуком у водяній бані до тих пір, поки частинки не досягнуть розміру від 80 до 500 нм. Антиген типово адсорбують на солі алюмінію протягом 1 години при кімнатній температурі при перемішуванні. 3D-MPL суспензію потім додають до адсорбованого антигену та композицію інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години, а потім витримують при температурі 4 °C до використання.

В іншому процесі імуностимулятор та антиген знаходяться на різних частинках металу, як описано у EP 1126876. Удосконалений процес включає адсорбцію імуностимулятора, на частинці металу, після чого проводять адсорбцію антигену на інших частинках солі металу, після цього перемішують дискретні частинки металу з утворенням вакцини. Ад'ювант для застосування в даному винаході може являти собою ад'ювантну композицію, що включає імуностимулятор, адсорбований на частинці металу, що характеризується тим, що частинка солі металу є суттєво вільною від іншого антигену. Крім того, вакцини, що забезпечуються даним винаходом, характеризуються тим, що імуностимулятор є адсорбованим на частинках солі металу, які є суттєво вільними від іншого антигену, та тим, що частинки металічної солі, які є адсорбованими з антигеном, є суттєво вільними від іншого імуностимулятора.

Згідно з цим даний винахід забезпечує ад'ювантну композицію, що включає імуностимулятор, який був адсорбований на частинці солі металу, та який характеризується тим, що композиція є суттєво вільною від іншого антигену. Крім того, ця ад'ювантна композиція може являти собою проміжний продукт, яка, якщо використовується такий ад'ювант, необхідний для виробництва вакцини. Згідно з цим забезпечується спосіб для виробництва вакцини, що включає змішування ад'ювантної композиції, яка містить один або більше імуностимуляторів, адсорбованих на частинці металу з антигеном. Бажано, коли антиген був попередньо адсорбований на солі металу. Вказана сіль металу

може бути ідентичною або подібною до солі металу, на якій адсорбований імуностимулятор. Бажано, коли сіль металу являє собою сіль алюмінію, наприклад, фосфат алюмінію або гідроокис алюмінію. Даний винахід також забезпечує вакцинну композицію, що включає імуностимулятор, адсорбований на першій частинці солі металу, та антиген, адсорбований на солі металу, що характеризується тим, що перша та друга частинки солі металу є окремими частинками.

LPS або LOS похідні або мутації, або похідні ліпиду А, описані в даній заявці, є сконструйованими так, що є менш токсичними (наприклад, 3D-MPL), ніж нативні ліпополісахариди та є почерговими еквівалентами стосовно будь-якого застосування таких залишків, описаних в даній заявці.

В одному втіленні ад'ювант, що використовується для композицій згідно з винаходом включає ліпосомний носій (виготовлений за допомогою відомих методик з фосфоліпідів (таких, як діолеїлфосфатидил холін [DOPC]) та необов'язково стерину [такого, як холестерин]). Такі ліпосомні носії можуть нести похідні ліпиду А [таку, як 3D-MPL - див. вище] та/або сапоніни (такі, як QS21 - див. вище). В одному втіленні ад'ювант включає (на 0,5 мл дози) 0,1-10 мг, 0,2-7,0, 3-5, 0,4-2 або 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 або 0,125-0,25 мг (наприклад, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 або 0,125 мг) стерину (наприклад холестерину), 5-60, 10-50 або 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 або 50 мкг) похідної ліпиду А (наприклад, 3D-MPL) та 5-60, 10-50 або 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 або 50 мкг) сапоніну (наприклад, QS21).

Цей ад'ювант є, зокрема, прийнятним для вакцинних композицій для людей похилого віку. В одному втіленні вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант, містить сахаридні кон'югати, які походять принаймні з усіх наступних серотипів: 4, 6В, 9В, 14, 18С, 19F, 23F, 1, 5, 7F (та можуть також включати один або більше із серотипів 3, 6А, 19А, та 22F), де титри GMC антитіла, індуковані проти одного або більше (або усіх) вакцинних компонентів 4, 6В, 9В, 14, 18С, 19F та 23F не є значно нижчими за ті, що індуковані вакциною Prevnar® у вакцинованих людей.

В одному втіленні ад'ювант, що використовується для композицій згідно з винаходом включає емульсію масло-у-воді, виготовлену зі здатного до метаболізації масла (такого, як сквален), емульгатора (такого, як Tween 80) та необов'язково токолу (такого, як альфа-токоферол). В одному втіленні ад'ювант включає (на 0,5 мл дози) 0, 5-15, 1-13, 2-11, 4-8 або 5-6 мг (наприклад, 2-3, 5-6 або 10-11 мг) здатного до метаболізації масла (такого, як сквален), 0,1-10,0, 3-8,0, 6-6,0, 9-5, 1-4 або 2-3 мг (наприклад, 0,9-1, 1, 2-3 або 4-5 мг) емульгатора (такого, як Tween 80) та необов'язково 0,5-20, 1-15, 2-12, 4-10, 5-7 мг (наприклад, 11-13, 5-6 або 2-3 мг) токолу (такого, як альфа-токоферол).

Цей ад'ювант може необов'язково додатково включати 5-60, 10-50 або 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 або 50 мкг) похідної ліпиду А (наприклад, 3D-MPL).

Ці ад'юванти є, зокрема, прийнятними для вакцинних композицій для немовлят та людей похилого віку. В одному втіленні вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант включає сахаридні кон'югати, одержані з принаймні усіх наступних серотипів: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (та можуть також включати один або більше із серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титри GMC антитіла, індуковані проти одного або більше (або усіх) вакцинних компонентів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно нижчими за ті, що індуковані вакциною Prevnar® у вакцинованих людей.

Цей ад'ювант може необов'язково містити 0,025-2,5, 0,05-1,5, 0,075-0,75, 0,1-0,3 або 0,125-0,25 мг (наприклад, 0,2-0,3, 0,1-0,15, 0,25 або 0,125 мг) стерину (наприклад, холестерину), 5-60, 10-50 або 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 або 50 мкг) похідної ліпиду A (наприклад, 3D-MPL), та 5-60, 10-50 або 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 або 50 мкг) сапоніну (наприклад, QS21).

Цей ад'ювант є, зокрема, прийнятними для вакцинних композицій для немовлят та людей похилого віку В одному втіленні вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант включає сахаридні кон'югати, одержані з принаймні усіх наступних серотипів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (та можуть також включати один або більше із серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титри GMC антитіла, індуковані проти одного або більше (або усіх) вакцинних компонентів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно нижчими за ті, що індуковані вакциною Prevnar® у вакцинованих людей.

В одному втіленні ад'ювант, що використовується для композицій згідно з винаходом включає фосфат алюмінію та похідну ліпиду A (таку, як 3D-MPL). Цей ад'ювант може включати (на 0,5 мл дози) 100-750, 200-500 або 300-400 мкг Al у вигляді фосфату алюмінію, та 5-60, 10-50 або 20-30 мкг (наприклад, 5-15, 40-50, 10, 20, 30, 40 або 50 мкг) похідної ліпиду A (наприклад, 3D-MPL).

Цей ад'ювант є особливо прийнятними для вакцинних композицій для немовлят та людей похилого віку В одному втіленні вакцинна композиція, що включає цей ад'ювант включає сахаридні кон'югати, одержані з принаймні усіх наступних серотипів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F (та можуть також включати один або більше із серотипів 3, 6A, 19A, та 22F), де титри GMC антитіла, індуковані проти одного або більше (або усіх) вакцинних компонентів 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F та 23F не є значно нижчими за ті, що індуковані вакциною Prevnar® у вакцинованих людей.

Такі вакцинні препарати, що містять імуногенні композиції згідно з даним винаходом, можуть використовуватися для захисту або лікування ссавця, чутливого до інфекції, за допомогою введення вказаної вакцини системним шляхом, або через слизові оболонки. Ці введення можуть включати ін'єкцію шляхом внутрішньом'язового, інтраперитонеального, інтрадермального або підшкірного введення, або введення через слизову оболонку до орального/травного, респіраторного, сечостатевого трактів. Інтраназальне введення вакцин для лікування пневмонії або середнього отиту є

переважним (оскільки назофарингеальне носійство пневмококів може більш ефективно запобігатися, послаблюючи, таким чином, інфекцію на ранній стадії). Незважаючи на те, що вакцина згідно з винаходом може вводиться як одинична доза, її компоненти можуть також сумісно вводиться одночасно або в різні моменти часу (наприклад, пневмококові сахаридні кон'югати можуть вводиться окремо, у той самий час або через 1-2 тижні після введення будь-якого компоненту бактеріального білка для оптимальної координації імунних відповідей стосовно кожної іншої). Для сумісного введення оптимальний Th1 ад'ювант може бути присутнім у будь-якій або усіх різних введеннях. На доповнення до одного шляху введення можуть використовуватися 2 різні шляхи введення. Наприклад, сахариди або сахаридні кон'югати можуть вводиться IM (або ID), а бактеріальні білки можуть вводиться IN (або ID). На доповнення до цього, вакцини згідно з винаходом можуть вводиться IM для примуючих дозувань, а IN дози для бустерних ін'єкцій.

Вміст білкових антигенів у вакцині бути типово знаходиться у межах 1-100 мкг, бажано 5-50 мкг, найбільш типово в інтервалі 5-25 мкг. Після початкової вакцинації, особи можуть одержувати одну або декілька бустерних імунізацій, розділених проміжком часу.

Вакцинний препарат є в загальному вигляді описаним у Vaccine Design ("The subunit та adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Енкапсуляція у ліпосоми є описаною Fullerton, патент США № 4,235,877.

Вакцини або імуногенні композиції згідно з даним винаходом можуть зберігатися у розчині або бути ліофілізованими. В одному втіленні розчин є ліофілізованим у присутності цукру, що діє як аморфний ліопротектор, при цьому цукор являє собою цукрозу, трегалозу, глюкозу, манозу, мальтозу або лактозу. В одному втіленні розчин піддають ліофілізації у присутності цукру, що діє як аморфний ліопротектор, та агенту для збільшення об'єму, що забезпечує поліпшену структуру осаду, такого, як гліцин або маніт. Присутність кристалічного агенту для збільшення об'єму дозволяє вкоротити цикли заморожування-висушування, при наявності високих концентрацій солі. Приклади таких сумішей для застосування у ліофілізації імуногенних композицій або вакцин згідно з винаходом включають цукрозу/гліцин, трегалозу/гліцин, глюкозу/гліцин, манозу/гліцин, мальтозу/гліцин, цукрозу/маніт, трегалозу/маніт, глюкозу/маніт, манозу/маніт та мальтозу/маніт. Типово, молярне співвідношення двох інгредієнтів необов'язково складає 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 або 1:6. Імуногенні композиції згідно з винаходом не обов'язково включають реагенти для ліофілізації, описані вище.

Зазначені вище стабілізуювальні агенти та суміші стабілізуювальних агентів можуть додатково включати полімер, здатний до підвищення температури переходу до скловидного стану (T_g) композиції, такий, як полі(вінілпіролідон) (PVP), гідроксидил крохмаль або декстран, або полімер, що діє як кристалічний агент, що збільшує об'єм, такий, як

поліетиленгліколь (PEG), наприклад такий, що має молекулярну вагу від 1500 до 6000 та декстран.

Вакцини згідно з даним винаходом необов'язково піддаються ліофілізації та відновлюються перед застосуванням. Ліофілізація може приводити до одержання більш стабільної композиції (вакцини) та, можливо, може приводити до більш високих титрів антитіла у присутності 3D-MPL та при відсутності ад'юванту на основі алюмінію.

В одному аспекті згідно з винаходом забезпечується вакцинний набір, що включає пробірку, яка містить вакцинну композицію згідно з винаходом, необов'язково у ліофілізованій формі, та додатково включає пробірку, яка містить ад'ювант, як описано в даній заявці. Є очевидним, що у цьому аспекті згідно з винаходом ад'ювант буде використовуватися для відновлення ліофілізованої імуногенної композиції.

Незважаючи на те, що вакцини згідно з даним винаходом можуть вводитися будь-яким шляхом, введення описаних вакцин у шкіру (ID) утворює одне втілення згідно з даним винаходом. Шкіра людини включає зовнішню "рогову" кутикулу, що називається роговим шаром, що покриває епідерму. Внизу цієї епідерми є шар, який називається дерма, який, у свою чергу, покриває підшкірну тканину. Дослідники показали, що ін'єкція вакцини у шкіру, та зокрема, дерму, стимулює імунну відповідь, що може бути асоційовано з рядом додаткових переваг. Інтрадермальна вакцинація з використанням вакцин, описаних в даній заявці утворює бажану ознаку згідно з даним винаходом.

Традиційна методика для інтрадермальної ін'єкції, "процедура манту", включає етапи очищення шкіри, та потім натягування однією рукою, та за допомогою голки зі скошеним краєм з вузьким каналом (калібр 26-31) скошений край голки вводять під кутом 10-15°. Як тільки скіс голки введений, тіло голки вводять нижче у шкіру та далі просувають при слабкому тиску до послаблення її під шкірою. Потім рідину вводять дуже повільно, формуючи, таким чином пухирець або шишку на шкірній поверхні, після чого повільно витягають голку.

Нещодавно були описані спеціально розроблені пристрої для введення рідких агентів у або через шкіру, наприклад, пристрої, описані у WO 99/34850 та EP 1092444, а також пристрої для впорскування струменем описані, наприклад у 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 способи для інтрадермального введення вакцинних препаратів можуть включати традиційні шприци та голки, або пристрої, призначені для балістичної доставки твердих вакцин (WO 99/27961) або трансдермальні пластири (WO 97/48440; WO 98/28037); або такі, що застосовуються до поверхні шкіри (трансдермальна або трансшкірна доставка WO 98/20734; WO 98/28037).

Коли вакцини згідно з даним винаходом вводяться у шкіру, або зокрема, у дерму, вакцина знаходиться у малому об'ємі рідини, зокрема, об'єм складає від приблизно 0,05 мл до 0,2 мл.

Вміст антигенів у шкірних або інтрадермальних вакцинах згідно з даним винаходом може бути подібним до традиційних доз, як це є у внутрішньом'язових вакцинах (див. вище). Проте ознакою шкірних та інтрадермальних вакцин є те, що композиції можуть бути у "низькій дозі". Відповідно до цього білкові антигени у вакцинах "низької дози" є бажано присутніми у дозі від 0,1 до 10 мкг, бажано у дозі від 0,1 до 5 мкг на дозу; сахаридні (бажано кон'юговані) антигени можуть бути присутніми у межах 0,01-1 мкг, та бажано від 0,01 до 0,5 мкг сахариду на дозу.

Як використовується в даній заявці, термін "інтрадермальна доставка" означає доставку вакцини у район дерми у шкірі. Проте вакцина не буде з необхідністю розташовуватися у дермі. Дерма є шаром у шкірі, який розміщений між приблизно 1,0 та приблизно 2,0 мм від поверхні шкіри людини, проте існує деяка кількість варіацій між індивідуумами та у різних частинах тіла. В загальному випадку, слід очікувати досягнення дерми шляхом проходження 1,5 мм нижче поверхні шкіри. Дерма розміщена між роговим шаром та епідермою на поверхні та підшкірним шаром, розміщеним нижче. У залежності від способу доставки вакцина може в основному розміщуватися виключно або в основному у межах епідерми та дерми.

Даний винахід також забезпечує поліпшену вакцину для запобігання або пом'якшення середнього отиту, спричиненого *Haemophilus influenzae*, шляхом додання білків *Haemophilus influenzae*, наприклад, білка D у вільній або кон'югованій формі. Крім того, даний винахід також забезпечує поліпшену вакцину для запобігання або пом'якшення пневмококової інфекції у немовлят (наприклад, середнього отиту), шляхом додання одного або двох пневмококових білків у вільній формі або як кон'югованих білків до кон'югатних композицій *S. pneumoniae* згідно з винаходом. Вказані пневмококові вільні білки можуть бути такими самими або різними з будь-якими білками *S. pneumoniae*, що використовуються як білки носія. Один або більше білкових антигенів *Moraxella catarrhalis* можуть також включатися у комбінаційну вакцину у вільній або кон'югованій формі. Таким чином, даний винахід представляє собою поліпшений спосіб для встановлення (протективної) імунної відповіді проти середнього отиту у немовлят.

В іншому втіленні даний винахід забезпечує поліпшений спосіб для встановлення (протективної) імунної відповіді проти середнього отиту у немовлят (у контексті даного винаходу визначається, як вік 0-2 роки) шляхом введення безпечної та ефективною кількості вакцини згідно з винаходом [педіатрична вакцина]. Додаткові втілення згідно з даним винаходом включають забезпечення антигенних кон'югатних композицій *S. pneumoniae* згідно з винаходом для застосування у медицині та застосування кон'югатів *S. pneumoniae* згідно з винаходом у виробництві лі-

карського засобу для запобігання (або лікування) пневмококового захворювання.

Ще в одному втіленні даний винахід являє собою поліпшений спосіб для встановлення (протективної) імунної відповіді у популяції людей похилого віку (у контексті даного винаходу пацієнт вважається таким похилого віку, якщо його вік складає 50 років та більше, типово більше 55 років, та у більш загальному випадку більше 60 років) шляхом введення безпечної та ефективної кількості вакцини згідно з винаходом, бажано у поєднанні з одним або більше білками *S. pneumoniae*, що є присутніми як вільні або кон'юговані білки, де вільні білки *S. pneumoniae* можуть бути такими самими або різними з будь-якими білками *S. pneumoniae*, що використовуються як білки носія.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою спосіб імунізації людського хазяйського організму проти захворювання, спричиненого інфекцією *S. pneumoniae* та неонов'язково *Haemophilus influenzae*, що включає введення хазяїну імунопротективної дози імуногенної композиції або вакцини, або набору згідно з винаходом.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою імуногенну композицію згідно з винаходом для застосування у лікуванні або запобіганні захворювання, спричиненого інфекцією *S. pneumoniae* та неонов'язково *Haemophilus influenzae*.

Додатковий аспект згідно з винаходом являє собою застосування імуногенної композиції або вакцини, або набору згідно з винаходом у виробництві лікарського засобу для лікування або запобігання захворювань, спричинених інфекцією *S. pneumoniae* та неонов'язково *Haemophilus influenzae*.

Терміни "такий, що включає", "включають" та "включає" в даній заявці призначені винахідниками для неонов'язкової заміни термінів "такий, що складається", "складаються з" "складається з", відповідно у будь-якому випадку.

Втілення в даній заявці, що відносяться до "вакцинних композицій" згідно з винаходом, є також застосовуваними до втілень, що відносяться до "імуногенних композицій" згідно з винаходом, та навпаки.

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

Для кращого розуміння даного винаходу представлені наступні приклади. Приклади представлені тільки з метою ілюстрації та не вважаються такими, що обмежують об'єм даного винаходу будь-яким чином.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Експресія білка D

Білок D *Haemophilus influenzae*

Генетична конструкція для експресії білка D

Початкові матеріали

ДНК, що кодує білок D

Білок D є високо консервативним серед усіх серотипів та нездатних до типування *H. influenzae*. Вектор pHC348, що містить послідовність ДНК, що кодує цільний білок гену D одержували від доктора

A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Sweden. Послідовність ДНК білка D була опублікована Janson та ін. (1991) *Infect. Immun.* 59:119-125.

Експресійний вектор pMG1

Експресійний вектор pMG1 являє собою похідну pBR322 (Gross та ін., 1985), в яку введені контрольні елементи для транскрипції та трансляції чужорідних вбудованих генів елементів, де вказані елементи походять від бактеріофагу (Shatzman та ін., 1983). Крім того, ген стійкості до ампіциліну був замінений на ген стійкості до канаміцину.

Штам *E. coli* AR58

E. coli штам AR58 був одержаний шляхом трансдукції N99 за допомогою P1 вихідного фагу, вищого на SA500 похідній (galE:TN10, lambdaKil' cI857 ΔH1). N99 та SA500 являють собою *E. coli* K12 штами, які одержані з лабораторії доктора. Martin Rosenberg при National Institute of Health.

Експресійний вектор pMG 1

Для одержання білка D, ДНК, що кодує білок, була клонована у експресійний вектор pMG1. Ця плазміда використовує сигнали з ДНК фага лямбда для спрямування транскрипції та трансляції вбудованих чужорідних генів. Вектор містить промотор PL, оператор OL та сайти утилізації (NutL та NutR) для сприяння ефектам транскрипційної полярності, коли забезпечується N білок (Gross та ін., 1985). Вектори, що містять PL промотор, вводять у *E. coli* лізогенного хазяїна для стабілізації плазмідної ДНК. Лізогенні хазяйські штами містять дефектну по реплікації ДНК фага лямбда, інтегровану у геном (Shatzman та ін., 1983). Хромосомна ДНК фага лямбда направляє синтез білка-репресора cI, який зв'язується з OL репресором вектора та запобігає зв'язуванню RNK полімерази з PL промотором та, таким чином, транскрипції вбудованого гена. cI ген експресійного штама AR58 містить чутливий до температури мутант для того, щоб PL направлена транскрипція мала змогу регулюватися температурним зсувом, тобто підвищення температури культури інактивує репресор та ініціюється синтез чужорідного білка. Ця експресійна система дозволяє здійснювати контрольований синтез чужорідних білків, особливо тих, що можуть бути токсичними для клітини (Shimatake & Rosenberg, 1981).

Штам *E. coli* AR58

AR58 лізогенний штам *E. coli*, що використовується для одержання білка носія D, є похідною стандартного NIH *E. coli* K12 штаму N99 (P⁺ su-galK2, lacZ⁺ thr⁻). Він містить дефектний лізогенний фаг лямбда (galE:TN10, lambdaKil' cI857 ΔH1). Kil' фенотип запобігає вимиканню хазяйського макромолекулярного синтезу. cI857 мутація забезпечує чутливість до температури пошкодження cI репресора. ΔH1 делеція видаляє правий операн фага лямбда та хазяйські локуси bio, uvr3 та chlA I. AR58 штам був одержаний шляхом трансдукції N99 початковим фагом P1 перед вирощуванням на SA500 похідній (galE:TN10, lambdaKil' cI857 ΔH1). Введення дефектного лізогену у N99 відбирали за допомогою тетрацикліну при використанні присутності TN10 транспозону, що кодує резистентність у сусідньому galE гені.

Конструювання вектора рMGMDPPrD
рMG1 вектор, який містить ген, що кодує неструктурний S1 білок вірусу грипу (рMGNSI) використовували для конструювання рMGMDPPrD. Ген білка D ампліфікували за допомогою ПЛР з вектора рHIC348 (Janson та ін. 1991 Infect. Immun. 59:119-125) при використанні праймерів ПЛР, що містять NcoI та XbaI рестрикційні сайти на 5' та 3' кінцях, відповідно. NcoI/XbaI фрагмент потім вводили у рMGNSI між NcoI та XbaI, створюючи таким чином, злитий білок, що містить N-термінальні 81 амінокислоту NS1 білка, після яких йде PD білок. Цей вектор позначали, як рMGNSI PrD.

Базуючись на конструкції, описаній вище, створювали заключну конструкцію для експресії білка D. BamHI/BamHI фрагмент видаляли з рMGNSIPrD. Гідроліз цієї ДНК видаляв кодуєчу ділянку NS1, за винятком перших трьох N-термінальних залишків. При повторному лігуванні вектора одержували ген, який кодує злитий білок з наступною N-термінальною амінокислотою послідовністю:

----MDP SSHSS HMANT----

NS1

Білок D

Білок D не містить лідерного пептиду або N-термінально цистеїну, до якого у нормі приєднуються ліпідні ланцюги. Білок, таким чином, не виділяється у периплазму та не піддається ліпидуванню та залишається у цитоплазмі у розчинній формі.

Заклучну конструкцію рMG-MDPPrD вводили у AR58 хазяйський штам за допомогою теплового шоку при 37 °C. Бактерію, що містить плазмиду, піддавали селекції в присутності канаміцину. Присутність вставки ДНК, що кодує білок D, було продемонстровано шляхом перетравлювання ізольованої плазмідної ДНК з вибраними ендонуклеазами. Рекombінантний штам *E. coli* штам називається ECD4.

Експресія білка D знаходиться під контролем промотора фаза лямбда P_L / оператора фага лямбда O_L. Хазяйський штам AR58 містить чутливий до температури ген cI у геномі, який блокує експресію з P_L фага лямбда при низькій температурі шляхом зв'язування з O_L. При підвищенні температури cI вивільняється з O_L, та білок D піддається експресії.

Приготування у невеликих об'ємах

Наприкінці процесу ферментації клітини концентрували та заморожували.

Екстракцію із зібраних клітин та очистку білка D проводили так, як описано нижче. Заморожений осад клітин розморожували та ресуспендували у розчині для дезінтеграції клітин (цитратний буфер рН 6,0) до заключного значення OD₆₅₀=60. Суспензію пропускали двічі через гомогенізатор з високим тиском при P = 1000 бар. Гомогенат культури клітин освітлювали шляхом центрифугування, та клітинний дебрис видаляли за допомогою фільтрації. На першому етапі очистки відфільтрований лізат пропускали через катіонообмінну хроматографічну колонку (SP Sepharose Fast Flow). PD зв'язується з гелевим матриксом за допомогою іонної взаємодії та вимивається на етапі підвищення іонної сили буфера для елюювання.

На другому етапі очистки забруднюючі речовини затримувалися аніонообмінним матриксом (Q Sepharose Fast Flow). PD не зв'язується з гелем та може збиратися у потоці, що проходить через колонку.

На обох етапах колонкової хроматографії зібрані фракції піддавали моніторингу при використанні OD. Потік, що пройшов через аніонообмінну хроматографічну колонку та містить очищений білок D, піддавали концентрації шляхом ультрафільтрації.

Ультрафільтраційний ретентат, що містить білок D на завершення пропускали через 0,2 мкм мембрану.

Приготування у великих об'ємах

Екстракцію зібраних клітин та очистку білка D проводили так, як описано нижче. Зібраний бульйон охолоджували та безпосередньо двічі пропускали через гомогенізатор високого тиску при тиску близько 800 бар.

На першому етапі очистки гомогенат культури клітин розводили та пропускали через катіонообмінну хроматографічну колонку (SP Sepharose Big beads). PD зв'язується з гелевим матриксом за допомогою іонної взаємодії та вимивається на етапі підвищення іонної сили буфера для елюювання та фільтрується.

На другому етапі очистки забруднюючі речовини затримувалися аніонообмінним матриксом (Q Sepharose Fast Flow). PD не зв'язується з гелем та може збиратися у потоці, що проходить через колонку.

На обох етапах колонкової хроматографії зібрані фракції піддавали моніторингу при використанні OD. Потік, що пройшов через аніонообмінну хроматографічну колонку та містить очищений білок D, піддавали концентрації та діафільтрації шляхом ультрафільтрації.

Ультрафільтраційний ретентат, що містить білок D на завершення пропускали через 0,2 мкм мембрану.

Приклад 1b: ЕКСПРЕСІЯ PhtD

PhtD білок є членом родини білків пневмококових гістидинових тріади (Pht), що характеризується присутністю гістидинових тріад (HXXHXXH мотив). PhtD являє собою молекулу, що містить 838 амінокислот та несе 5 гістидинових тріад (див. MedImmune WO 00/37105SEQ ID NO:4 для амінокислотної послідовності та SEQ ID NO:5 для ДНК послідовності). PhtD також містить багату на пролін ділянку у середині (амінокислотні положення 348-380). PhtD має 20 амінокислот N-термінальної сигнальної послідовності з мотивом LXXC.

Генетична конструкція

Послідовність гена зрілого MedImmune білка PhtD (від aa 21 до aa 838) переносили рекombінантно до *E. coli* при використанні виготовленого на фірмі вектора рTCMP14, що несе рX промотор. Хазяйський штам *E. coli* являє собою AR58, що несе cI857 термочутливий репресор, що дозволяє проводити теплову індукцію промотора.

Проводили полімеразну ланцюгову реакцію для ампліфікації phtD гена з плазмиди MedImmune (яка несе phtD ген з штаму *Streptococcus pneumoniae* Norway 4 (серотип 4) - SEQ ID NO:5,

як описано у WO 00/37105). Праймери, специфічні для phtD гену використовували тільки для ампліфікації phtD гена у двох фрагментах. Праймери несли або NdeI та KpnI, або KpnI та XbaI рестрикційні сайти. Ці праймери не гібридизувалися із жодним нуклеотидом з вектора, але тільки з phtD специфічними генними послідовностями. Штучний ATG стартовий кодон вбудовували при використанні першого праймера, що несе NdeI рестрикційний сайт. Одержані ПЛР продукти потім вбудовували у rGEM-T клонуючий вектор (Promega), та послідовність ДНК підтверджували. Субклонування фрагментів у TCMP14 експресійний вектор потім проводили при використанні стандартних методик, та вектор трансформували у E. coli AR58.

Очистка PhtD

Очистку PhtD проводили так, як описано нижче:

Вирощування клітин E. coli у присутності канаміцину: ріст протягом 30 годин при 30 °C, потім індукція протягом 18 годин при 39,5 °C

Руйнування клітин E. coli з цільної культури при OD₆₀₀ 115 у присутності EDTA 5 мМ та PMSF 2 мМ як інгібіторів протеази: Rennie, 2 пасажі, 1000 бар.

Захоплення антигену та видалення клітинного дебрису при використанні Streamline Q XL хроматографії при кімнатній температурі (20 °C); колонку промивали NaCl 150 мМ + Empigen 0,25 % pH 6,5 та елюювали при використанні NaCl 400 мМ + Empigen 0,25 % у 25 мМ буфера на основі фосфату калію pH 7,4.

Фільтрування на Sartobran150 картриджі (0,45+0,2 мкм)

Зв'язування антигену при використанні хроматографії на Zn²⁺ хелатній сефарозі FF IMAC при pH 7,4 у присутності 5 мМ імідазолу при 4 °C; колонку промивали імідазолом 5 мМ та Empigen 1 % та елюювали при використанні 50 мМ імідазолу, обидва рази буфер на основі 25 мМ фосфату калію pH 8,0.

Слабка аніонообмінна хроматографія у позитивному режимі на Fractogel EMD DEAE при pH 8,0 (25 мМ фосфат калію) при 4 °C; колонку промивали 140 мМ NaCl та елюювали при 200 мМ NaCl, у той час, як забруднюючі речовини (білки та ДНК) залишалися адсорбованими на обміннику.

Концентрація та ультрафільтрація з використанням 2 мМ Na/K фосфату pH 7,15 на мембрані 50 кДа.

Стерилізуюча фільтрація очищеної партії на фільтрувальному картриджі Millipak-200,2 мкм.

Приклад 1с: ЕКСПРЕСІЯ ПНЕВМОЛІЗИНУ

Пневмококовий пневмолізін готували та знешкоджували так, як описано у WO 2004/081515 та WO 2006/032499.

Приклад 2:

Одержання кон'югатів

В області техніки є добре відомим, як приготувати очищені пневмококові полісахариди. Для цілей цих прикладів полісахариди готували суттєво так, як описано у EP072513 або спорідненими з ними способами. Перед проведенням кон'югації полісахариди можуть бути калібровані за розміром шляхом мікропсевдозріднення, як описано нижче.

Активація та злиття є специфічними для кожного полісахариду. Дані приведені у Таблиці 1. Калібрований за розміром полісахарид (виняток для PS5, 6B та 23F) розчиняли у NaCl 2M, NaCl 0,2M або у воді для ін'єкцій (WFI). Оптимальну концентрацію полісахариду оцінювали для усіх серотипів. Усі серотипи за винятком серотипу 18C, були кон'юговані безпосередньо до білка носія, як детально описано нижче. Одержували два альтернативні кон'югати серотипу 22F; один - кон'югований безпосередньо, один - через ADH лінкер.

3 100 мг/мл маткового розчину в ацетонітрилі або у суміші ацетонітрил/вода 50 %/50 %, CDAP (CDAP/PS співвідношення 0,5-1,5 мг/ мг PS) додавали до розчину полісахариду. Через 1,5 хвилину, додавали 0,2M-0,3M NaOH для одержання специфічної активації pH. Активацію полісахариду проводили при цьому значенні pH протягом 3 хвилин при 25 °C. Очищений білок (білок D, PhtD, пневмолізін або DT) (кількість залежить від початкового співвідношення PS/білок носія) додавали до активованого полісахариду та реакцію злиття проводили при характерному значенні pH протягом 2 годин (у залежності від серотипу) при регульованому значенні pH. Для того, щоб погасити групи ціанатного естеру, що не прореагували, потім до суміші додавали 2M розчин гліцину. Значення pH доводили до pH 9,0. Розчин перемішували протягом 30 хвилин при 25 °C, а потім протягом ночі при 2-8 °C при постійному повільному перемішуванні.

Одержання 18C:

18C зв'язували з білком носія через лінкер - дигідразид адипінової кислоти (ADH). Полісахарид серотипу 18C піддавали мікропсевдозрідненню перед кон'югацією.

Дериватизація токсоїду правця при використанні EDAC

Для дериватизації токсоїду правця очищений TT розводили при концентрації 25 мг/мл у 0,2 M NaCl та додавали ADH спейсер для того, щоб досягти заключної концентрації 0,2 M. Коли розчинення спейсера завершувалося, значення pH доводили до 6,2. EDAC (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід) потім додавали до досягнення заключної концентрації 0,02M, та суміш перемішували протягом 1 години при регуляції значення pH. Реакцію конденсації зупиняли шляхом підвищення значення pH аж до 9,0 протягом принаймні 30 хвилин при 25 °C. Дериватизований TT потім піддавали діалізації (10 кДа CO мембрана) для того, щоб видалити залишкові ADH та EDAC реагенти.

TT_{АН} на завершення стерильно фільтрували перед етапом злиття та зберігали при -70 °C.

Хімічне злиття TT_{АН} з PS18C

Деталі параметрів кон'югації можуть бути знайдені у Таблиці 1.

2 грами мікропсевдозрідненого PS розводили при визначеній концентрації у воді та доводили до концентрації 2M NaCl додаванням порошка NaCl.

Додавали CDAP розчин (свіжо приготовлений розчин 100 мг/мл у 50/50 об/об ацетонітрил/WFI) до досягнення прийнятного співвідношення CDAP/PS.

Значення рН підвищували до активації рН 9,0 шляхом додання 0,3М NaOH та стабілізували на цьому значення рН до додання ТТ_{АН}.

Через 3 хвилини додавали дериватизований ТТ_{АН} (20 мг/мл у 0,2 М NaCl) до досягнення співвідношення ТТ_{АН} / PS2; значення рН регулювали до досягнення рН 9,0. Розчин залишали на одну годину стояти при умовах регуляції рН.

Для погашення додавали 2М розчин гліцину, до суміші PS/ТТ_{АН}/CDAP.

Значення рН доводили до погашення значення рН (рН 9,0).

Розчин перемішували протягом 30 хвилин при 25 °С, та потім залишали стояти протягом ночі при 2-8°С при постійному повільному перемішуванні.

PS22F_{АН}-PhtD кон'югат

У другому способі кон'югації для цього сахариду (перший є безпосереднім способом PS22-PMD кон'югації, метод представлений у Таблиці 1), 22F зв'язували з білком носія через лінкер - дигідразид адипінової кислоти (ADH). Полісахарид серотипу 22F піддавали мікропсевдозрідженню перед кон'югацією.

Дериватизація PS22F

Активацію та злиття проводили при 25 °С при постійному перемішуванні на водяній бані з контрольованою температурою.

Мікропсевдозрідений PS22F розводили з одержанням заключної концентрації PS 6 мг/мл у 0,2 М NaCl та розчин доводили при рН 6,05±0,2 за допомогою 0,1 N HCL. Розчин CDAP (100 мг/мл свіжоприготовленого у суміші ацетонітрил/ WFI, 50/50) додавали до досягнення прийнятного співвідношення CDAP/PS (1, 5/1 ваг/ваг).

Значення рН підвищували до активації рН 9,00±0,05 шляхом додання 0,5 М NaOH та стабілізували на цьому значення рН до додання ADH.

Через 3 хвилини додавали ADH до досягнення прийнятного співвідношення ADH/PS (8, 9/1 ваг/ваг); значення рН регулювали до зв'язування рН 9,0. Розчин залишали на одну годину стояти при умовах регуляції рН.

PS_{АН} похідну концентрували та піддавали діалізації.

Злиття

PhtD при концентрації 10 мг/мл у 0,2М NaCl додавали до PS22F_{АН} похідної для того, щоб досягти співвідношення PhtD/PS22F_{АН} 4/1 (ваг/ваг). Значення рН доводили до 5,0±0,05 за допомогою HCl. Розчин EDAC (20 мг/мл у 0,1 М Трис-HCl рН 7, 5) додавали у ручному режимі протягом 10 хвилин (250 мкл/мін) до одержання 1 мг EDAC / мг PS22F_{АН}. Одержаний розчин інкубували протягом 150 хвилин (хоча також використовували 60 хвилин) при 25 °С при перемішуванні та регуляції рН. Розчин нейтралізували шляхом додання 1М Трис-HCl рН 7,5 (1/10 заключного об'єму) та залишали на 30 хвилин при 25X.

Перед елюванням на Sephacryl S400HR кон'югат просвітлювали при використанні фільтру 5 мкм Minisart.

Одержаний кон'югат мав заключне співвідношення PhtD/PS 4,1 (ваг/ваг), вміст вільного PS нижче 1 % та антигенність (α-PS/α-PS) 36, 3 % та анти-PhtD антигенність 7,4 %.

Очистка кон'югатів:

Кон'югати очищали шляхом гель-фільтрації при використанні Sephacryl S400HR гель-фільтраційної колонки, урівноваженої 0,15 М NaCl (S500HR для 18С) для видалення невеликих молекул (включаючи DMAP) та некон'югованих PS та білка. На основі різних молекулярних розмірів реакційних компонентів, PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-пневмолізину або PS-DT, кон'югати елювалися першими, після цього елювався вільний PS, потім вільний PD або вільний DT та на завершення DMAP та інші солі (NaCl, гліцин).

Фракції, що містять кон'югати, визначали шляхом UV₂₈₀ нм. Фракції розділяли на пули згідно з їх K_d, стерильно фільтрували (0,22 мкм) та зберігали при +2-8°. Визначали співвідношення PS/білок у кон'югатних препаратах.

Умови специфічної активації/злиття/гасіння кон'югатів PS *S. pneumoniae* - білок D/TT/DT/PhtD/Ply

Коли "мкпсевд." міститься у назві стовпчика, то це показує, що сахарид був калібрований за розміром шляхом мікропсевдозрідження перед кон'югацією. Розміри сахаридів після мікропсевдозрідження приведені у Таблиці 2.

Таблиця 1

Умови специфічної активації/злиття/гасіння PS кон'югатів *S. pneumoniae* - білок D/TT/DT/PhtD/Ply

Серотип	1 мкпсевд	4 мкпсевд	5	6A	6B	7F мкпсевд
PS конц. (мг/мл)	2,5	2,5	7,1	5,0	5,0	5,0
PS розчинення	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
Вихідне співвідношення PD/PS (ваг/ваг)	1,5/1	1,5/1	1/1	1/1	1,1/1	1,2/1
CDAP конц. (мг/ мг PS)	0,50	0,50	0,79	0,83	0,83	0,75
pH _а =pH _с =pH _д	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 мкпсевд.	14 мкпсевд	18C мкпсевд	19A мкпсевд.	19F мкпсевд.	22F мкпсевд.	23F
PS конц. (мг/мл)	5,0	5,0	4,5	15,0	9,0	6,0	2,38
PS розчинення	2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0,2M	NaCl 2M
PD конц. (мг/мл)	10,0	10,0	20,0 (TT)	10,0 (Ply)	20,0 (DT)	10,0 (PhtD)	5,0
Вихідне співвідношення PD/PS	1,2/1	1,2/1	2/1	2,5/1	1,5/1	3/1	1/1
CDAP конц. (мг/мг PS)	0,50	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	0,79
pH _a =pH _c =pH _d	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_a, c, q відповідає pH для активації, злиття та гасіння, відповідно

Характеристика:

Кожний кон'югат характеризували на відповідність характеристикам, приведеним у Таблиці 2. Вміст полісахариду (мкг/мл) вимірювали за допомогою резорцинового тесту, а вміст білка (мкг/мл) за допомогою аналізу Лоурі. Заключне співвідношення PS/PD (вар/вар) визначали співвідношенням концентрацій.

Вміст вільного полісахариду (%):

Вміст вільного полісахариду кон'югатів, витриманих при 4 °C, або таких, що зберігалися 7 днів при 37 °C, визначали на супернатантах, одержаних після інкубації з антитілами α-білка носія та насичених сульфатом амонію, центрифугування.

α-PS/α-PS ELISA використовували для кількісної оцінки полісахариду у супернатанті. Відсутність кон'югату також контролювали при використанні α-білок носія / α-PS ELISA.

Антигенність:

Антигенність однакових кон'югатів в аналізі ELISA-типу, де захоплення та визначення антитіл були α-PS та α-білок, відповідно.

Вміст вільного білка (%):

Некон'югований білок носія може бути відокремлений від кон'югату під час етапу очистки. Вміст залишкового білка визначали при викорис-

танні ексклюзійної хроматографії розмірів (TSK5000-PWXL), після чого проводили UV визначення (214 нм). Умови елюювання дозволяли проводити розділення вільного білка носія та кон'югату. Вміст вільного білка у кон'югатних партіях потім визначали проти калібрувальної кривої (від 0 до 50 (мкг/мл білка носія). Вільний білок носія у % так, як описано далі: % вільний носій = (вільний носій (мкг/мл) / (загальна концентрація білка носія, виміряна згідно з Лоурі (мкг/мл)*100 %).

Стабільність:

Розподіл молекулярної маси (K_{av}) та стабільність вимірювали при використанні ВЕРХ-SEC гелі-фільтрації (TSK5000-PWXL) для кон'югатів, витриманих при 4 °C, або таких, що зберігалися 7 днів при 37 °C,

10/11/13/14-валентна характеристика приведена у Таблиці 2 (див. коментарі нижче).

Білкові кон'югати можуть бути адсорбовані на фосфаті алюмінію та розділені на пули з утворенням заключної вакцини.

Висновок:

Були одержані імуногенні кон'югати, що були продемонстровані як компоненти запропонованої вакцини.

Таблиця 2

Характеристика кон'югатів

Кон'югати	PS розмір (Да×10 ³)	Співвідношення носій/PS	Вільний PS (Elisa)	Вільний носій	PS антигенність (Elisa)	Розмір кон'югату (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 проводили	45,9 %	Не проводили
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-TT"	89-97*	2,2-2,4	1,5-2,2 %	<4 %	46 %-56 %	5464-6133
PS19A-Plv*	151	3,2	<1 %		29 %	
PS19F-DT	133-143*	1,4-1,5	4,1 %-5,9 %	<1,2 %-<1,3 %	82 %-88 %	2059-2335
PS22F-	159-167	2,17	5,8	Не проводили	37 %	Не проводили
PS22F-AHPhtD*	1*159-167	3,66-4,34	<1 %	Не проводили	28-31 %	Не проводили
PS23F-PD***	914-980	0,5	1,4-1,9 %	3,7 %-4,9 %	137 %-154 %	2933-3152

* Розмір PS після мікропсевдозрідження нативного PS

10-валентну вакцину одержували шляхом змішування кон'югати серотипів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F (наприклад, при дозі 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3, 1 мкг сахариду, відповідно на дозу для людини). 11-валентну вакцину одержували шляхом додаткового введення кон'югату серотипу 3 з Таблиці 5 (наприклад, при дозі 1 мкг сахариду на дозу для людини). 13-валентну вакцину одержували шляхом додаткового додання кон'югатів серотипів 19A та 22F, приведених вище (з 22F, що є або безпосередньо приєднаним до PhtD, або, альтернативно, через ADH лінкер) [наприклад, при дозі 3 мкг кожного сахариду на дозу для людини]. 14-валентна вакцина може бути одержана шляхом додаткового додання кон'югату серотипу 6A, описаного вище [наприклад, при дозі 1 мкг сахариду на дозу для людини].

Приклад 3: Підтвердження факту, що включення білка D Haemophilus influenzae в імуногенну композицію згідно з винаходом може забезпечувати поліпшений захист проти гострого середнього отиту (AOM).

Модель дослідження.

У дослідженні використовували 11Pn-PD вакцину, що включає серотипи 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F та 23F, кожний кон'югований з білок D з H. influenzae (відноситься до Таблиці 5 у Прикладі 4). Осіб випадковим чином розділяли на 2 групи для одержання чотирьох доз або 11Pn-PD вакцини або Navrix у віці приблизно 3, 4, 5 та 12-15 місяців. Усі суб'єкти отримували вакцину Infanrix-hexa GSK Biologicals' (DTPa-HBV-IPV/Hib) паралельно у віці 3, 4 та 5 місяців. Infanrix-hexa є комбінацією Pediarix та Hib, змішаних перед введенням. Ефективність оцінювали у відповідності з аналізом "Згідно-з-прописом", що розпочинався через 2 тижні після введення третьої вакцинової дози та закінчувався до досягнення віку 24-27 місяці. Назофарингеальне носійство S. pneumoniae та H. influenzae оцінювали у вибраній підгрупі осіб.

Батькам давали пораду консультуватися у дослідника, якщо їх дитина мала слабкість, мала вушний біль, спонтанну перфорацію барабанної перетинки або спонтанні виділення з вуха. Якщо дослідник мав підозру на епізод AOM, дитини негайно відсилали до отоларинголога (ENT) для підтвердження діагнозу.

Клінічний діагноз AOM базувався на або на візуальних спостереженнях за барабанною перетинкою (тобто, почервоніння, здуття, втрату світлового рефлексу), або на присутності витікання рідини з середнього вуха (як демонструється при використанні або простої або пневматичної отоскопії або при використанні мікроскопу. Крім того, принаймні дві наступні ознаки або симптоми повинні були бути присутніми: вушний біль, виділення з вух, втрата слуху, лихоманка, летаргія, подразливість, анорексія, блювання або діарея. Якщо ENT спеціаліст підтверджував клінічний діагноз, збирали зразки рідини із середнього вуха шляхом проколів барабанної перетинки для бактеріологічного дослідження.

Для осіб, які мали повторювані візиту з причини захворювання, новий епізод AOM вважався таким, що почався, якщо пройшло більше 30 днів з

початку попереднього епізоду. Крім того, AOM епізод вважався новим бактеріальним епізодом, якщо ізолювана(ий) бактерія/серотип відрізнявся від попереднього ізоляту яким би не був інтервал між двома послідовними епізодами.

Результати дослідів

Дослідженню піддавали 4968 немовлят, 2489 у 11Pn-PD групі та 2479 у контрольній групі. Не існувало великих відмінностей у демографічних характеристиках факторів ризику між двома групами

Клінічні епізоди та визначення випадку AOM

Протягом періоду спостереження було зареєстровано загалом 333 епізоду клінічного AOM у 11Pn-PD групі та 499 у контрольній групі.

Таблиця 3 представляє протективну ефективність 11Pn-PD вакцини та обох 7-валентних вакцин, попередньо тестованих у Фінляндії (Eskola та ін. N Engl J Med 2001;344:403-409 та Kilpi та ін. Clin Infect Dis 2003 37:1155-64) проти будь-яких епізодів AOM та AOM, спричинених різними пневмоковими серотипами, H. influenzae, NTHi та M. catarrhalis.

Статистично значуще та клінічно релевантне зниження на 33,6 % загального числа AOM спалахів захворювання було досягнуте при використанні 11Pn-PD, незалежно від етіології (Таблиця 3).

Загальна ефективність проти AOM епізодів завдяки будь-якому з 11 пневмокових серотипів, що містяться у 11Pn-PD вакцині становило 57,6 % (Таблиця 3).

Інше важливе відкриття у даному дослідженні полягало у 35,6 % захисту, забезпечуваного 11Pn-PD вакциною проти AOM спричиненого H. influenzae (та зокрема 35,3 % захист забезпечувався NTHi). Це відкриття має основне клінічне значення, що підкреслює підвищену важливість H. influenzae як основної причини AOM у пневмоковій кон'югатній вакцині. Разом із захистом, що забезпечується проти AOM, 11Pn-PD вакцина також знижувала назофарингеальне носійство H. influenzae після введення бустерної дози на другий рік життя. Ці відкриття суперечать попереднім спостереженням у Фінляндії, де для обох 7-валентних пневмокових кон'югатних вакцин спостерігали підвищення кількості епізодів AOM завдяки H. influenzae (Eskola та ін. та Kilpi та ін.) як підтвердження етіологічного заміщення.

Однозначна кореляція між захистом проти епізодів AOM завдяки Hi та рівням антитіла проти білка носія D не могли бути встановлені, оскільки пост-первинні концентрації анти-PD IgG антитіла у вакцинованих 11Pn-PD, що не мали Hi AOM епізодів, були суттєво такими самими, що й пост-первинні рівні анти-PD IgG антитіла, виміряні у 11Pn-PD вакцинованих, що розвивали принаймні один Hi AOM епізод під час подальшого періоду. Проте, незважаючи на те, що кореляція не могла бути встановлена між біологічним впливом вакцини та пост-первинною IgG анти-PD імуногенністю, буде доречним зробити припущення, що PD білок носія, який є високо консервативним серед штамів H. influenzae, вносить значний вклад в індукцію захисту проти Hi.

Ефект AOM захворювання супроводжується ефектом назофарингеального носійства, яке хара-

ктеризується подібною величиною для вакцинного серотипу пневмококу та *H. influenzae* (Фігура 1). Таке зниження назофарингеального носійства *H. influenzae* у вакцинованих PD-кон'югатом підтримує гіпотезу безпосереднього протективного ефекту PD-кон'югатної вакцини проти *H. influenzae*, навіть якщо протективна ефективність не може бути скорельована з анти-PD IgG імунними відповідями, як вимірюється за допомогою ELISA.

У наступних експериментах використовували модель середнього отиту шиншили із пулами сироватки немовлят, імунізованих 11-валентною

композицією згідно з даним прикладом або за допомогою 10-валентної вакцини Прикладу 2 (див. також Таблиці 1 та 2 та коментарі, приведені нижче). Обидва пули індукували значне зниження проценту тварин із середнім отитом проти пулом сироватки до імунізації. Не існувало значної різниці між 10- та 11-валентними імунними пулами. Це демонструє, що обидві вакцини мають подібний потенціал щодо індукції захисту проти середнього отиту, спричиненого нездатним до типування *H. influenzae* у цій моделі.

Таблиця 3

Тип АОМ епізоду	11Pn-PD					Prevnar y FinOM ^(ESK010 та ін.)					7v-OMP y FinOM ^(KIP та ін.)				
	n		VE			n		VE			n		VE		
	11Pn-PD	Контроль	%	95 %CI		7v-CRM	Контроль	%	95%CI		7v-OMP	Контроль	%	95 %CI	
				НГ	ВГ				НГ	ВГ				НГ	ВГ
N	2455	2452				786	794				805	794			
Будь-яке АОМ	333	499	33,6	20,8	44,3	1251	1345	6	4	16	1364	1345	-1	-12	10
Будь-яке АОМ з МЕР	322	474	32,4	19,0	43,6	1177	1267	7	-5	17	1279	1267	0	-12	10
Культурально підтверджений пневмокок	92	189	51,5	36,8	62,9	271	414	34	21	45	314	414	25	11	37
Вакцина пневмококових серотипів (*)	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
Нездатний до типування <i>H. influenzae</i> (NTHi)	41	63	35,3	1,8	57,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NC	NP	NP
<i>M. catarrhalis</i>	31	34	9,4	-52,5	46,1	379	381	-1	-19	15	444	381	-16	-36	2

NP = не опубліковано; N = число осіб у групі АТР ефективності; n = кількість епізодів

* Вакцина пневмококових серотипів: для 11Pn-PD=11 серотипів, для Prevna та 7v-OMP=7 серотипів

MEF = рідина середнього вуха

Приклад 4:

Відбір білка носія для серотипу 19F

Використовуваний метод ELISA

Метод інгібування 22F ELISA суттєво базувався на аналізі, запропонованому у 2001 Консерсіон та Frasc та описаному Henckaerts та ін., 2006, Clinical та Vaccine Immunology 13:356-360. Коротко, очищені пневмококові полісахариди змішували з метилованим альбуміном сироватки людини та адсорбованим на Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) мікротитрувальних планшетах з високим ступенем зв'язування протягом ночі при 4 °C. Планшети блокували при використанні 10 % фетальної телячої сироватки (FBS) у PBS протягом 1 години при кімнатній температурі при перемішуванні. Зразки сироватки розводили у PBS, що містить 10 % FBS, 10 мкг/мл полісахариду клітинної стінки (SSI) та 2 мкг/мл пневмококового полісахариду серотипу 22F (ATCC), та додатково розводили у мікротитрувальних планшетах тим самим буфером. Внутрішній контроль, калібрований проти стандартної сироватки 89-SF при використанні специфічних для серотипу концентрацій IgG у 89-SF, обробляли

тим самим способом та включали у кожний планшет. Після промивання зв'язані антитіла визначали при використанні кон'югованого з пероксидазою анти-людського IgG моноклонального антитіла (Strattech Scientific Ltd, Soham, UK), розведеного у 10 % FBS (у PBS), та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при перемішуванні. Забарвлення розвивалося при використанні готового до застосування однокомпонентного субстратного набору для імуноаналізу на основі тетраметилбензидинпероксидазного ферменту (BioRad, Hercules, CA, US) у темноті при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли при використанні H₂SO₄ 0,18 M, та оптичну густину зчитували при 450 нм. Концентрації специфічного для серотипу IgG (у мкг/мл) у зразках підраховували шляхом порівняння точок оптичної густини у межах визначених границь з кривою сироватки внутрішнього контролю, яка була змодельована за допомогою 4-параметерного логістичного логарифмічного рівняння, підрахованого за допомогою SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) програмного забезпечення. Зупинку ELISA проводили за допомогою

0,05 мкг/мл IgG для усіх серотипів, беручи до уваги границю визначення та границю кількісного визначення.

Опсонифагоцитарний аналіз

На WHO консультативній зустрічі у червні 2003 року було рекомендовано використовувати OPA аналіз, як представлено Romero-Steiner та ін Clin Diagn Lab Immunol 2003 10 (6) стор 1019-1024. Цей пропис використовували для аналізу OPA активності серотипів у наступних тестах.

Приготування кон'югатів

У дослідження 11Pn-PD&Di-001 та 11Pn-PD&Di-007 включали три 11-валентні вакцинні композиції (Таблиця 4), в яких 3 мкг 19F полісахариду були кон'югованими з токсойдом дифтерії (19F-DT) замість 1 мкг полісахариду, кон'югованого з білок D (19F-PD) Параметри кон'югації для дослідження 11Pn-PD, 11Pn-PD&Di-001 та 11Pn-PD&Di-007 є розкритими в Таблицях 5, 6 та 7, відповідно.

Відповіді анти-пневмококового антитіла та OPA активність проти серотипу 19F через один місяць після первинної вакцинації при використанні цих 19F-DT композицій показані у Таблицях 8 та 9, відповідно.

Таблиця 10 показує концентрації 22F-ELISA антитіла та процентне співвідношення осіб, які

досягли порогу 0,2 мкг/мл перед та після бустерної вакцинації 23-валентним чистим полісахаридом.

Опсонифагоцитарна активність була продемонстрована як значно поліпшена для антитіл, індукованих цими 19F-DT композиціями, як продемонстровано більш високими значеннями серопозитивності (опсонифагоцитарні титри > 1:8) та OPA GMT через один місяць після первинної вакцинації (Таблиця 9). Через один місяць після бустерної вакцинації 23-валентним чистим полісахаридом опсонифагоцитарна активність 19F антитіл залишалася значно більшою для дітей, примованих за допомогою 19F-DT композиції (Таблиця 11)

Таблиця 12 представляє дані імуногенності після введення 11Pn-PD бустерної дози у дітей, які почали ходити, що раніше були примовані 19F-DT або 19F-PD кон'югатами, у порівнянні з четвертою послідовною дозою Prevnar® Враховуючи випадки збоїв, про які було повідомлено після використання Prevnar® у США, поліпшена опсонифагоцитарна активність проти серотипу 19F, кон'югованого з DT білком носія, можуть бути перевагою для кандидатної вакцини. Таблиця 13 забезпечує дані ELISA та OPA для 19F-DT кон'югату стосовно перекресної реактивності серотипу 19A. Було виявлено що 19F-DT індукує низьку, але значущу OPA активність проти 19A.

Таблиця 4

Пневмококова кон'югатна вакцинна композиція, що використовується у клінічних дослідженнях

Композиція	Пневмококовий серотип мкг/білок носія											Al ³⁺ мг
	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 Форма1	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-DTF Форма2	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 Форма3	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

Умови специфічної активації/злиття/гасіння кон'югатів PS S. pneumoniae-білок D/TT/DT

Серотип	1 нативний	3 мкпсевд.	4 нативний	5 нативний	6B нативний	7F нативний
PS конц. (мг/мл)	1,5	2	2,0	7,5	5,5	3,0
PS розчинення	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
Початкове співвідношення PS/PD (ваг/ваг)	1/0,7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP конц. (мг/мг PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _d	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 злиття	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	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц. (мг/мл)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Початкове співвідношення PS/PD (ваг/ваг)	1/0,75	1/0,75	1/1,2	1/1	1/1

Продовження таблиці 5

CDAP конц. (мг/ мг PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	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 злиття	60 хв.	60 хв.	45 хв.	30 хв.	60 хв.

Таблиця 6

Умови специфічної активації/злиття/гасіння PS *S. pneumoniae*-білок D/DT
кон'югатів для 11Pn-PD&Di-001 дослідження

Серотип	1 мкпсевд.	3 мкпсевд.	4 мкпсевд.	5 мкпсевд.	6B мкпсевд.	7F нативний
PS конц. (мг/мл)	4	2,0	2,5	7,5	10	3,0
PS	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
Початкове співвідношен- ня PS/PD (вар/вар)	1,2/1	1/1	1/1	1/1	1,5/1	1/1
CDAP конц. (мг/мг PS)	1,50	0,75	1,5	2	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	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 злиття	60 хв.	60 хв.	60 хв.	60 хв.	60 хв.	60 хв.

Продовження таблиці 6

Серотип	9V натив- ний	14 нативний	18C мкпсевд.	19F мкпсевд.	23F мкпсевд.
PS конц. (мг/мл)	1,75	2,5	5, 0	9,0	10
PS	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц. (мг/мл)	5,0	5,0	5,0	20 (DT)	10(DT)
Початкове співвідношен- ня PS/PD (вар/вар)	0,75/1	0,75/1	1,2/1	1,5/1	1,5/1
CDAP конц. (мг/ мг PS)	0,75	0,75	1,5	1,5	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	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 злиття	60 хв.	60 хв.	30 хв.	60 хв.	60 хв.

Таблиця 7

Умови специфічної активації/злиття/гасіння PS *S. pneumoniae*-білок D/DT
кон'югатів для 11Pn-PD&Di-007 дослідження

Серотип	1 нативний	3 мкпсевд.	4 нативний	5 нативний	6B нативний	7F мкпсевд.
PS конц. (мг/мл)	1,5	2,0	2	7,5	5,5	5,0
PS розчинення	NaCl 150мМ	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD конц. (мг/мл)	5,0	5,0	5,0	5,0	5	10
Початкове співвідношен- ня PS/PD (вар/вар)	0,7/1	1/1	1	1/1	1/1	1,2/1
CDAP конц. (мг/ мг PS)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	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	9,5/9,5/9,0
Час злиття	60 хв.	60 хв.	45 хв.	40 хв.	60 хв.	60 хв.

Продовження таблиці 7

Серотип	9V мкпсевд.	14 мкпсевд.	18C нативний	19F мкпсевд.	19F мкпсевд.	23F мкпсевд.
PS конц. (мг/мл)	5,0	5,0	1,75	9,0	10,0	9,5
PS розчинення	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
Білок носія конц. (мг/мл)	10	10,0	5,0	20 (DT)	5,0 (PD)	10
Початкове співвідношен- ня білок носія/PS (вар/вар)	1,2/1	1,2/1	1,2/1	1,5/1	1,2/1	1/1
CDAP конц. (мг/мг PS)	0,5	0,75	0,75	1,5	0,75	0,75
pH _a =pH _c =pH _q	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 злиття	60 хв.	60 хв.	45 хв.	120 хв.	120 хв.	60 хв.

Таблиця 8

Процент осіб з концентрацією 19F антитіла $\geq 0,20$ мкг/мл та середньо геометричне значення концентрацій 19F антитіла (GMC з 95 % CI (довірчий інтервал); мкг/мл,) через один місяць після первинної вакцинації 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Pevnar (2 мкг 19F-CRM) (загальна група осіб)

Група	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007(22F-ELISA)		
	N	% $\geq 0,20$ мкг/мл (95 % CI)	GMC (мкг/мл) (95 % CI)	N	% $\geq 0,20$ 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 ^г	146	99,3 (96,2-100)	2,88 (2,45-3,38)	-	-	-
19F-DT форма 2 ^г	150	96,0 (91,5-98,5)	2,43 (2,01-2,94)	-	-	-
19F-DT форма 3 ^г	-	-	-	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)

^гКомпозиція різних складів приведена у Таблиці 4

Таблиця 9

Процент осіб з титром 19F OPA $\geq 1:8$ та GMT для 19F OPA через один місяць після первинної вакцинації за допомогою 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Pevnar (2 мкг 19F-CRM) (загальна група)

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 ^г	137	95,6 (90,7-98,4)	263,2 (209,4-330,7)	-	-	-
19F-DT форма 2 ^г	139	92,1 (86,3-96,0)	218,9 (166,5-287,9)	-	-	-
19F-DT форма 3 ^г	-	-	-	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)

^гКомпозиція різних складів приведена у Таблиці 4

Таблиця 10

Процент осіб з концентрацією 19F антитіла $\geq 0,20$ мкг/мл та GMC 19F антитіла (мкг/мл) до та через один місяць після бустеризації 23-валентним чистим полісахаридом у дітей, примованих 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Pevnar (2 мкг 19F-CRM) (загальна група)

Первинна група	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	перед бустерною вакцинацією			через 1 місяць після бустеризації 23-валентним PS		
	N	% $\geq 0,20$ мкг/мл (95 % CI)	GMC (мкг/мл) (95 % CI)	N	% $\geq 0,20$ 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 ^г	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)

Продовження таблиці 10

19F-DT форма 2 ^г	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)
Prevnar	65	64,6 (51,8-76,1)	0,40 (0,27-0,60)	67	100 (94,6-100)	9,40 (6,95-12,71)

Композиція різних складів приведена у Таблиці 4

Таблиця 11

Процент осіб з титром 19F OPA $\geq 1:8$ та GMT 19F OPA перед та через один місяць після бустеризації 23-валентним чистим полісахаридом у дітей примованих 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Prevnar (2 мкг 19F-CRM) (загальна група)

Первинна група	11Pn-PD&Di-002					
	перед бустерною вакцинацією			через 1 місяць після бустеризації 23-валентним PS		
	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 ^г	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 ^г	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)

Композиція різних складів приведена у Таблиці 4

Таблиця 12

Процент осіб з концентраціями антитіла $\geq 0,2$ мкг/мл, OPA $> 1:8$ та GMC/GMT проти 19F пневмокока через один місяць після бустеризації 11Pn-PD або Prevnar у дітей, примованих 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Prevnar (2 мкг 19F-CRM) (загальна група)

Первинна група	11Pn-PD&Di-002					
	Аналіз 22F-ELISA assay			OPA аналіз		
	N	% $\geq 0,20$ 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 ^г	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 ^г	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)

Композиція різних складів приведена у Таблиці 4.

Таблиця 13

Процент осіб з концентраціями антитіла $\geq 0,2$ мкг/мл, OPA $\geq 1:8$ та GMC/GMT проти 19A пневмокока через один місяць після первинної вакцинації 1 мкг 19F-PD, 3 мкг 19F-DT або Prevnar (2 мкг 19F-CRM) (загальна група)

Група	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA аналіз			OPA аналіз		
	N	% $\geq 0,20$ 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 [†]	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	3,3 (0,4-11,3)	4,6 (3,8-5,6)

[†]Композиція різних складів приведена у Таблиці 4.

Приклад 5: Ад'ювант експерименти у передклінічних моделях: вплив на імуногенність пневмококових 11-валентних полісахаридних кон'югатів у старих мавп резус

Для оптимізації відповіді, яка викликається на кон'югат пневмококових вакцин у популяції людей похилого віку, GSK виготовляло 11-валентну полісахаридну (PS) кон'югатну вакцину з новим ад'ювантом - Ад'ювантом С, див. нижче.

Групи, що складаються з 5 старих мавп резус (у віці 14-28 років), імунізували внутрішньовенно (IM) у дні 0 та 28 за допомогою 500 мкл або 11-валентних PS кон'югатів, адсорбованих на 315 мкг AlPO₄, або 11-валентних PS кон'югатів, змішаних з Ад'ювантом С.

В обох вакцинних композиціях 11-валентні PS кон'югати кожний складався з наступних кон'югатів PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT та PS6B-DT. Використовувана вакцина складала 1/5 людської дози людини вакцини (5 мкг кожного сахариду на дозу для людини, за виключен-

ням 6B [10 мкг]), кон'югованої згідно з умовами Таблиці 6 (Приклад 4), за винятком 19F, який виготовляли згідно з умовами CDAP процесу калібрований сахарид у концентрації 9 мг/мл, PD у концентрації 5 мг/мл, початкове співвідношення PD/PS 1, 2/1, концентрація CDAP 0,75 мг/мг PS, рНа=рНс=рНq 9,0/9,0/9,0 та час злиття 60 хв.

Вимірювали рівні анти-PS ELISA IgG та опсонофагоцитарні титри у сироватці, зібраній у день 42. Концентрацію анти-PS3 В-клітин пам'яті вимірювали шляхом Elispot при використанні клітин периферичної крові, зібраних у день 42.

Згідно з результатами, показаними у даній заявці нижче, Ад'ювант С значно поліпшує імуногенність 11-валентних PS кон'югатів проти кон'югатів з AlPO₄ у старих мавп. Новий ад'ювант підвищує відповіді IgG на PS (Фігура 1) та опсонофагоцитарні титри антитіла (Таблиця 14). Існують також дані, що підтверджують факт, частота зустрічальності PS3-специфічних В-клітин пам'яті підвищується при використанні Ад'юванта С (Фігура 2).

Таблиця 14

Імуногенність кон'югату у старих мавп резус (post-II опсонофагоцитарні титри)

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11-валентний AlPO ₄	перед імунізацією	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	день 14 post II	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11-валентний Ад-С	перед імунізацією	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	день 14 post II	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

Elispot В-клітин

Принцип аналізу базується на факті, що В-клітини пам'яті дозрівають і перетворюються у зрілі клітини плазми in vitro після культивування з СрG протягом 5 днів. In vitro одержані антигенспецифічні клітини плазми можуть бути легко визначені та підраховуються при використанні Elispot

аналізу В-клітин. Кількість специфічних клітин плазми відображає частоту зустрічальності В-клітин пам'яті на початку культивування.

Коротко, in vitro одержані клітини плазми інкубували у культуральних планшетах, вкритих антигеном. Антигенспецифічні клітини плазми утворюють плями антитіл/антиген, які визначаються за

допомогою традиційної імуно-ферментної процедури та підраховуються як В-клітини пам'яті. У даному дослідженні полісахариди використовували для покриття культуральних планшетів для того, щоб підрахувати відповідні В-клітини пам'яті. Результати виражали як частоту PS-специфічних В-клітин пам'яті в одному мільйоні В-клітин пам'яті.

Дослідження показало, що Ад'ювант С може бути здатним полегшити відому проблему стабільності PS3 при бустеризації (див 5-ий міжнародний симпозіум з пневмококу та пневмококових захворювань 2-6 квітня 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 знешкодженого пневмолізіну (dPly) як білка носія для поліпшення імуногенності PS19F у молодих Balb/c мишей

Групи з 40 самок Balb/c мишей (у віці 4 тижнів) піддавали імунізації ІМ у дні 0, 14 та 28 при використанні 50 мкл або 4-валентного чистого PS або 4-валентного dPly-кон'югованого PS, обидва були змішані з Ад'ювантом С

Обидві вакцинні композиції склалися з 0,1 мкг (кількість сахариду) кожного з наступних PS PS8, PS12F, PS19F та PS22F.

Рівні анти-PS ELISA IgG визначали у сироватці, зібраній у день 42.

Анти-PS19F відповідь, показана як приклад на Фігурі 3, була значно підвищена у мишей, які одержували 4-валентні dPly кон'югати, у порівнянні з мишами, імунізованими за допомогою чистого PS. Таке саме поліпшення спостерігали для анти-PS8, 12F та 22F IgG відповідей (дані не показані)

Приклад 7. Ефективність Білка D пневмококовою гістидинової тріади (PhtD) як білка носія для посилення імуногенності PS22F у молодих Balb/c мишей

Групи з 40 самок Balb/c мишей (у віці 4 тижнів) піддавали імунізації ІМ у дні 0, 14 та 28 при використанні 50 мкл або 4-валентного чистого PS, або 4-валентного PhtD-кон'югованого PS, обидва були змішані з Ад'ювантом С.

Обидві вакцинні композиції склалися з 0,1 мкг (кількість сахариду) кожного з наступних PS: PS8, PS12F, PS19F та PS22F.

Рівні анти-PS ELISA IgG визначали у сироватці, зібраній у день 42

Анти-PS22F відповідь, показана як приклад на Фігурі 4, була значно підвищена у мишей, які одержували 4-валентні PhtD кон'югати, у порівнянні з мишами, імунізованими за допомогою чистого PS. Таке саме поліпшення спостерігали для анти-PS8, 12F та 19F IgG відповідей (дані не показані).

Приклад 8. Імуногенність у старих C57Bl мишей 13-валентних PS кон'югатів, що містять 19A-dPly та 22F-PhtD

Групи з 30 старих C57Bl мишей (у віці >69 тижнів) піддавали імунізації ІМ у дні 0, 14 та 28 при використанні 50 мкл або 11-валентних PS кон'югатів, або 13-валентних PS кон'югатів, обидва були змішані з Ад'ювантом С (див. 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 (див. Таблицю 1 та коментар стосовно 11-валентної вакцини, що наведений під Таблицею 2). 13-валентна вакцинна композиція містила на доповнення 0,1 мкг PS19A-dPly та PS22F-PhtD кон'югатів (див. Таблицю 1 та коментар стосовно 13-валентної вакцини, що наведений під Таблицею 2 [при використанні безпосередньо кон'югованого 22F]). У групах 2 та 4 пневмолізіновий носій піддавали знешкодженню при використанні GMBS обробки, у групах 3 та 5 цю процедуру проводили за допомогою формальдегіду. У групах 2 та 3 PhtD використовували для кон'югації PS22F, у групах 4 та 5 використовували PhtD_E злитий білок (конструкція VP147 з WO 03/054007). У групі 6 19A був кон'югований з токсодом дифтерії, а 22F з білком D.

Рівні анти-PS19A та 22F ELISA IgG визначали у сироватці індивідумів, зібраній на 42 день. ELISA IgG відповідь, одержану до інших PS, вимірювали у розділеній на пули сироватці.

19A-dPly та 22F-PhtD, введені у складі 13-валентної кон'югатної вакцинної композиції, продемонстрували імуногенність у старих C57Bl мишей (Таблиця 15). Імунна відповідь, індукована проти інших PS, не піддавалася негативному впливові у мишей, які одержували 13-валентні композиції у порівнянні з такими, імунізованими 11-валентною композицією.

Таблиця 15

PS імуногенність у старих C57Bl мишей (рівні IgG post-III)

Старі C57 чорні миші						
ELISA	ГРУПА 1	ГРУПА 2	ГРУПА 3	ГРУПА 4	ГРУПА 5	ГРУПА 6
	11V 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtD 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly формальдегід 22F-PhtD 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtD-E 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly формальдегід 22F-PhtD-E 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-DT 22F-PD 0,1 мкг/50 мкл Ад С
1 усереднений пул	19,30	20,20	24,40	12,80	12,10	13,60
3 усереднений пул	6,32	4,84	5,21	6,74	2,38	2,54

Продовження таблиці 15

4 усереднений пул	60,9	67,1	51,4	47,4	45,5	41,1
5 усереднений пул	1,34	3,81	3,06	2,75	1,26	1,23
6В усереднений пул	4,41	4,12	5,88	1,58	2,31	5,64
7F усереднений пул	0,83	0,81	1,65	1,98	0,89	0,99
9V усереднений пул	13,8	23,7	20,0	13,1	15,5	9,6
14 усереднений пул	25,73	42,96	34,12	32,53	23,97	15,60
18C усереднений пул	13,4	20,1	11,9	9,1	8,3	8,4
19F усереднений пул	57,5	90,0	63,8	36,5	47,0	69,1
23F усереднений пул	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A GMC IC % сироват.	0,06 0,04-0,1 33 %	0,09 0,05-0,14 47 %	0,25 0,15-0,41 83 %	0,08 0,06-0,12 53 %	0,23 0,14-0,38 80 %	0,19 0,09-0,3 73 %
22F GMC IC % сироват.	не реєстр. 0 %	5,81 3,2-10,6 97 %	3,76 1,8-7,9 90 %	0,54 0,3-1,1 77 %	0,85 0,4-1,7 87 %	2,02 1,2-3,4 97 %

Приклад 9. Імуногенність у молодих Balb/c мишей 13-валентних PS кон'югатів, що містять 19A-dPly та 22F-PhtD

Групи з 30 молодих Balb/c мишей (у віці 4 тижнів) піддавали імунізації ІМ у дні 0, 14 та 28 при використанні 50 мкл або 11-валентних PS кон'югатів, або 13-валентних PS кон'югатів, обидва були змішані з Ад'ювантом С (див. 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 (див. Таблицю 1 та коментар стосовно 11-валентної вакцини, що наведений під Таблицею 2). 13-валентна вакцинна композиція містила на доповнення 0,1 мкг PS19A-dPly та PS22F-PhtD кон'югатів (див. Таблицю 1 та коментар стосовно 13-валентної вакцини, що наведений під Таблицею 2 [при використанні безпосередньо кон'югованого 22F]). У групах 2 та 4 пневмолізино-

вий носій піддавали знешкодженню при використанні GMBS обробки, у групах 3 та 5 цю процедуру проводили за допомогою формальдегіду. У групах 2 та 3 PhtD використовували для кон'югації PS 22F, у групах 4 та 5 використовували PhtD_E злитий білок (конструкція VP147 з WO 03/054007). У групі 6 19A був кон'югований з токсидом дифтерії, а 22F з білком D.

Рівні анти-PS19A та 22F ELISA IgG визначали у сироватці індивідуумів, зібраній на 42 день. ELISA IgG відповідь, одержану до інших PS, вимірювали у розділеній на пули сироватці.

19A-dPly та 22F-PhtD, введені у складі 13-валентної кон'югатної вакцинної композиції, продемонстрували імуногенність у молодих Balb/c мишей (Таблиця 16). Імунна відповідь, індукована проти інших PS, не піддавалася негативному впливові у мишей, які одержували 13-валентні композиції у порівнянні з такими, імунізованими 11-валентною композицією.

Таблиця 16

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

BalbC миші						
ELISA	ГРУПА 1	ГРУПА 2	ГРУПА 3	ГРУПА 4	ГРУПА 5	ГРУПА 6
	11V 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtD 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly формальдегід 22F-PhtD 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A- dPlyGMBS22F- PhtD-E 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly формальдегід 22F-PhtD-E 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A- DT22F-PD 0,1 мкг/50 мкл Ад С
1 усереднений пул	131,70	101,20	83,00	82,40	67,90	85,50
3 усереднений пул	21,85	10,38	12,53	8,83	8,73	14,98

Продовження таблиці 16

4 усереднений пул	147,4	127,0	104,4	95,0	113,6	114,2
5 усереднений пул	21,38	20,29	18,26	18,95	18,02	23,04
6В усереднений пул	1,97	4,76	3,72	2,35	1,43	1,05
7F усереднений пул	7,69	4,58	4,77	4,24	3,92	3,94
9V усереднений пул	30,1	30,7	26,5	21,4	23,4	28,3
14 усереднений пул	28,78	27,67	26,23	21,54	24,34	13,73
18С усереднений пул	53,4	52,37	46,5	57,8	47,8	75,8
19F усереднений пул	186,6	157,7	169,3	178,9	181,9	223,2
23F усереднений пул	4,98	3,9	5,11	0,57	3,13	4,57
19A GMC IC % сироват.	0,4 0,2-0,6 93 %	32,6 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 IC % сироват.	не реєстр. 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 морських свинок 13-валентних PS кон'югатів, що містять 19A-dPly та 22F-PhtD

Групи з 30 молодих морських свинок (штам Hartley, у віці 5 тижнів) піддавали імунізації ІМ у дні 0,14 та 28 при використанні 125 мкл або 11-валентних PS кон'югатів, або 13-валентних PS кон'югатів, обидва були змішані з Ад'ювантом С (див. нижче).

11-валентна вакцинна композиція складалася 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 (див. Таблицю 1 та коментар стосовно 11-валентної вакцини, що наведений під Таблицею 2). 13-валентна вакцинна композиція містила на доповнення 0,1 мкг PS19A-dPly та

PS22F-PhtD кон'югатів (див. Таблицю 1 та коментар стосовно 13-валентної вакцини, що наведений під Таблицею 2 [при використанні безпосередньо кон'югованого 22F]). У групах 2 та 4 пневмолізиновий носій піддавали знешкодженню при використанні GMBS обробки, у групах 3 та 5 цю процедуру проводили за допомогою формальдегіду. У групах 2 та 3 PhtD використовували для кон'югації PS22F, у групах 4 та 5 використовували PhtD_E злитий білок (конструкція VP147 з WO 03/054007). У групі 6 19A був кон'югований з токсодом дифтерії, а 22F - з білком D.

Рівні анти-PS19A та 22F ELISA IgG визначали у сироватці індивідумів, зібраній на 42 день.

ELISA IgG відповідь, одержану до інших PS, вимірювали у розділеній на пули сироватці.

Таблиця 17

PS Імуногенність у молодих морських свинок (рівні IgG post-III)

Морські свинки						
ELISA	ГРУПА	ГРУПА 2	ГРУПА 3	ГРУПА 4	ГРУПА 5	ГРУПА 6
	11V 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtD 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly формальдегід 22F-PhtD 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly GMBS 22F- PhtD-E 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A-dPly формальдегід 22F-PhtD-E 0,1 мкг/50 мкл Ад С	11V 19A- DT22F-PD 0,1 мкг/50 мкл Ад С
1 усереднений пул	78,00	77,21	76,15	68,77	68,59	81,04
3 усереднений пул	7,75	9,31	12,73	7,94	4,75	9,59
4 усереднений пул	130,7	94,4	132,6	166,8	85,0	101,3
5 усереднений пул	109,10	117,10	110,70	158,40	74,10	100,40

Продовження таблиці 17

6В усереднений пул	3,14	4,26	14,4	7,63	6,3	7,52
7F усереднений пул	154,2	216,0	240,0	181,0	142,0	179,1
9V усереднений пул	90,69	105,45	98,20	93,45	54,12	73,05
14 усереднений пул	71,19	77,18	46,53	59,67	38,47	53,69
18C усереднений пул	109,4	122,3	137,1	79,9	73,7	83,1
19F усереднений пул	73,9	102,5	112,2	75,5	62,3	72,1
23F усереднений пул	19,19	30,74	29,44	31,52	19,13	24,94
19AGMC IC % сироват.	0,4 0,24-0,68 75 %	25,58 12-54,5 100 %	41,49 24,4-70,5 100 %	14,25 5,9-34,6 100 %	27,49 16,6-45,4 100 %	6,74 4-11,3 100 %
22FGMC IC % сироват.	0,12 0,09-0,16 10 %	2,51 0,94-6,73 95 %	3,67 1,59-8,42 95 %	45,74 29,3-71,4 100 %	30,68 17-53,3 100 %	96,38 73,5-126,4 100 %

Приклад 11: Композиція, що була виготовлена та перевірена

а) Виготовляли наступну композицію (при використанні 13-валентної вакцини з Таблиці 1 та серотипу 3 з Таблиці 5 - див. коментар стосовно

14-валентної вакцини, приведений під Таблицею 2 [при використанні безпосередньо кон'югованого 22F або кон'югованого за допомогою ADH лінкера]). Сахариди рецептували з фосфатом алюмінію та 3D-MPL, як показано нижче.

14V 25 мкг MPL Сумарний вміст ВАС алюмінію → FF на дозу:					
PS	Носій	мкг PS	мкг MPL	співвіднош. PS/Al 1/x	мкг Al
1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10
18C	TT _{АН}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30
23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100
FF вміст алюмінію				Усього =	355

б) Таку саму сахаридну композицію доповнювали ад'ювантом, вибраним з наступних ад'ювантів:

14V 10 мкг MPL Сумарний вміст ВАС алюмінію → FF на дозу:					
PS	Носій	мкг	мкг MPL	співвіднош. PS/Al 1/x	мкг Al
1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10
6D	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10
18C	TT _{АН}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30
22F	PhtD	3		10	30
23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			10	4	40
FF вміст алюмінію				Усього =	295

У Таблиці, що представлена нижче, приведена концентрація компонентів емульсії на 500 мкл дози.

Інгредієнти	Ад'ювант А1 250 мкл об/ваг емульсії	Ад'ювант А2 125 мкл об/ваг емульсії	Ад'ювант А3 50 мкл об/ваг емульсії
Альфа-токоферол	11,88 мг	5,94 мг	2,38 мг
Сквален	10,7 мг	5,35 мг	2,14 мг
Твін 80	4,85 мг	2,43 мг	0,97 мг

Інгредієнти	Ад'ювант А4 250 мкл об/ваг емульсії	Ад'ювант А5 250 мкл об/ваг емульсії	Ад'ювант А6 125 мкл об/ваг емульсії	Ад'ювант А7 50 мкл об/ваг емульсії
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
Твін 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 рецептували з двома ліпосомними ад'ювантами:

Склад Ад'юванту В1

Якісний та кількісний вміст (на 0,5 мл дози)

Ліпосоми:

-DOPC 1 мг

- холестерин 0,25 мг

3DMPL 50 мкг

QS21 50 мкг

KH_2PO_4 13,124 мг Буфер

Na_2HPO_4 10,290 мг Буфер

NaCl 2,922 мг

(100 мМ)

WFI достатня кількість до 0,5 мл розчинника

pH 6,1

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

Склад Ад'юванту В2

Якісний та кількісний вміст (на 0,5 мл дози)

Ліпосоми:

- DOPC 0,5 мг

- холестерин 0,125 мг

3DMPL 25 мкг

QS21 25 мкг

KH_2PO_4 13,124 мг Буфер

Na_2HPO_4 10,290 мг Буфер

NaCl 2,922 мг

(100 мМ)

WFI достатня кількість до 0,5 мл розчинника

pH 6,1

d) Сахариди також рецептували з Ад'ювантом С (див. вище для інших композицій, де використовується цей ад'ювант):

Якісний та кількісний вміст (на 0,5 мл дози)

Емульсія масло-у-воді: 50 мкл

- сквален 2,136 мг

- α -токоферол 2,372 мг

- Твін 80 0,97 мг

- холестерин 0,1 мг

- 3DMPL 50 мкг

- QS21 50 мкг

KH_2PO_4 10,470 мг Буфер

Na_2HPO_4 10,219 мг Буфер

NaCl 4,003 мг

(137 мМ)

KCl 0,101 мг

(2,7 мМ)

WFI достатня кількість до 0,5 мл розчинника

pH 6,8

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

Групи з 30 самок Balb/c мишей піддавали імунізації внутрішньом'язово (IM) у дні 0,14 та 28 13-валентними PS композиціями, що містять PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F та 23F (دوزи: 0,3 мкг сахариду / PS для PS 4, 18C, 19A, 19F та 22F та 0,1 мкг сахариду / PS для інших PS)

PS 18C був кон'югованим з токсойдом правця, 19F з токсойдом дифтерії, 19A зі знешкодженням при використанні формальдегіду Ply, 22F з PhtD, а інші PS - з PD.

Порівнювали дві композиції, які складаються або з 22F-PhtD, що був одержаний за допомогою безпосередньої CDAP хімії, або 22F-AH-PhtD (ADH-дериватизований PS). Див. Приклад 2, Таблиця 1 та коментар під Таблицею 2 для характеристики 13-валентної вакцини, приготовленої при використанні 22F, кон'югованого безпосередньо або через ADH спейсер. Вакцинну композицію доповнювали ад'ювантом С.

Рівні анти-PS22F ELISA IgG та опсонофагоцитарні титри вимірювали у сироватці, яку збирали у день 42.

22F-AH-PhtD був продемонстрований як набагато більш імунотенний, ніж 22F-PMD стосовно як рівнів IgG (Фігура 5), так і опсонофагоцитарних титрів (Фігура 6).

Приклад 13. Вплив нових ад'ювантів на імунотенність капсулярних PS кон'югатів *Streptococcus pneumoniae*

Групи з 40 самок Balb/c мишей піддавали імунізації IM шляхом у дні 0,14 та 28 13-валентними PS композиціями, що містять PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F та 23F (دوزи: 0,3 мкг сахариду / PS для PS4, 18C, 19A, 19F та 22F та 0,1 мкг сахариду / PS для інших PS)

PS 18C був кон'югованим з токсойдом правця, 19F з токсойдом дифтерії, 19A зі знешкодженням при використанні формальдегіду Ply, 22F з PhtD, а інші PS - з PD. Див. Приклад 2, Таблиця 1 та коментар під Таблицею 2 для характеристики 13-валентної вакцини, виготовленої з безпосередньо кон'югованого 22F.

Порівнювали чотири композиції, доповнені Al-PO_4 , ад'ювантом А1, ад'ювантом А4 або ад'ювантом А5.

Рівні анти-PS, Ply, PhtD та PD ELISA IgG вимірювали у сироватці, зібраній у день 42 та розділяли на пули для кожної групи. Наступні співвідношення підраховували для кожного антигену: рівень

IgG, індукований новим досліджуваним ад'ювантом / рівень IgG, індукований AlPO₄.

Усі нові досліджувані ад'юванти давали принаймні у 2 рази поліпшені імунні відповіді на 13-валентні кон'югати у порівнянні з класичною AlPO₄ композицією (Фігура 7).

Приклад 14. Протективна ефективність комбінації PhtD/знешкоджений Ply у пневмококовій мавпячій моделі пневмонії

Групи з 6 мавп резус (у віці 3-8 років), відібрані з тих, що мали найнижчі попередньо існуючі рівні анти-19P антитіла, піддавали імунізації внутрішньом'язово у дні 0 та 28 або при використанні 11-валентних PS кон'югатів (тобто 1 мкг PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 та 23F, та 3 мкг PS 4, 18C та 19F), або PhtD (10 мкг) + знешкоджений формаліном Ply (10 мкг), або тільки ад'юванту.

PS18C був кон'югованим з токсодом правця, 19F з токсодом дифтерії, а інші PS -з PD. Див. Приклад 2, Таблиця 1 та коментар під Таблицею 2 для характеристики 11-валентної вакцини. Усі композиції доповнювали ад'ювантом С.

Пневмокок типу 19F (5,10⁸ КУО) інокулювали у праву легеню у день 42. Підраховували колонії у бронхо-альвеолярних змивах, зібраних у дні 1, 3 та 7 після контрольного зараження. Результати виражали як кількість тварин на групу, які або померли, або мали колонізовані легені або звільнилися від патогена на 7 день після контрольного зараження.

Як показано на Фігурі 8, хороший захист, близький до статистичної значущості (незважаючи на

низьку кількість тварин, що використовувалися) отримували з 11-валентними кон'югатами та комбінацією PhtD+dPly ($p < 0,12$, точний критерій Фішера) у порівнянні з групою, що містила тільки ад'ювант.

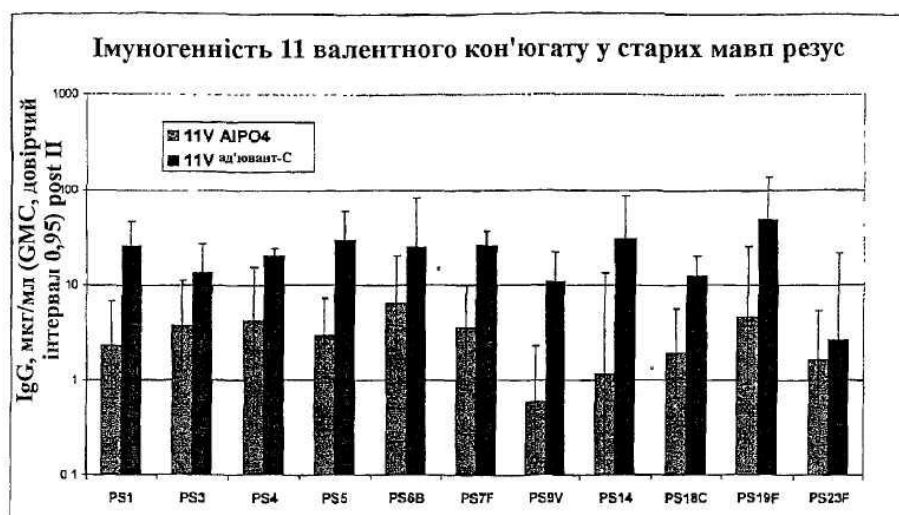
Приклад 15. Вплив кон'югаційної хімії на відповідь анти-PhtD антитіла та протективну ефективність проти контрольного зараження типу 4, індуковані 22F-PhtD кон'югатами

Групи з 20 самок OF1 мишей піддавали імунізації ІМ шляхом у дні 0,14 при використанні 3 мкг або 22F-PhtD (приготовлений при використанні безпосереднього CDAP зв'язування), або 22F-AH-PhtD (ADH-derivatизований PS) або тільки ад'юванта. Обидва моновалентні 22F кон'югати одержували за допомогою процесів Прикладу 2 (див. також Таблицю 1 та Таблицю 2). Кожну композицію доповнювали ад'ювантом С.

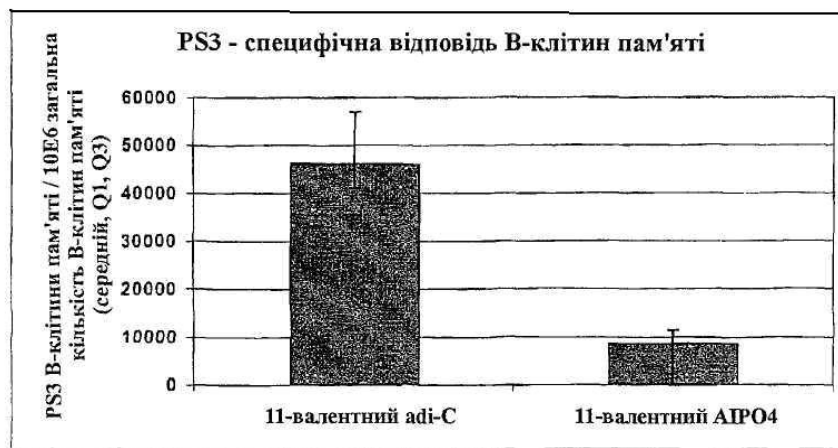
Рівні анти-PhtD ELISA IgG вимірювали у сироватці, зібрані у день 27.

Мишей піддавали контрольному інтраназальному зараженню при використанні 5,10⁶ КУО пневмококу типу 4 у день 28 (тобто пневмоковим серотипом, що потенційно не покривається PS, присутнім у досліджуваній вакцинній композиції). Індуковану смертність піддавали моніторингу до 8 дня після контрольного зараження 8 post-challenge.

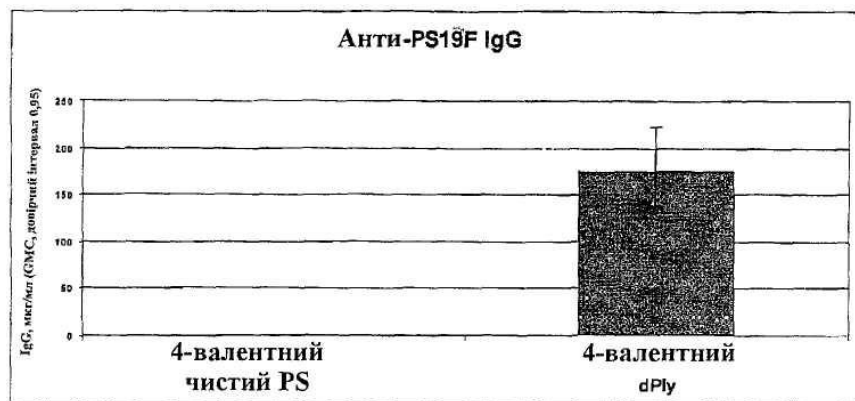
22F-AH-PhtD, індукувала значно вищу анти-PhtD IgG відповідь та кращий захист проти контрольного зараження типом 4, ніж 22F-PhtD.



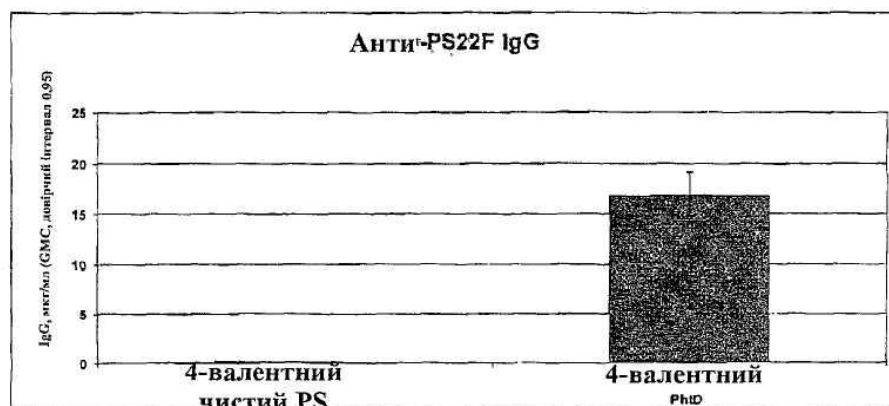
Фігура 1. Імуногенність кон'югату у старих мавп резус (рівні анти-PS IgG post II)



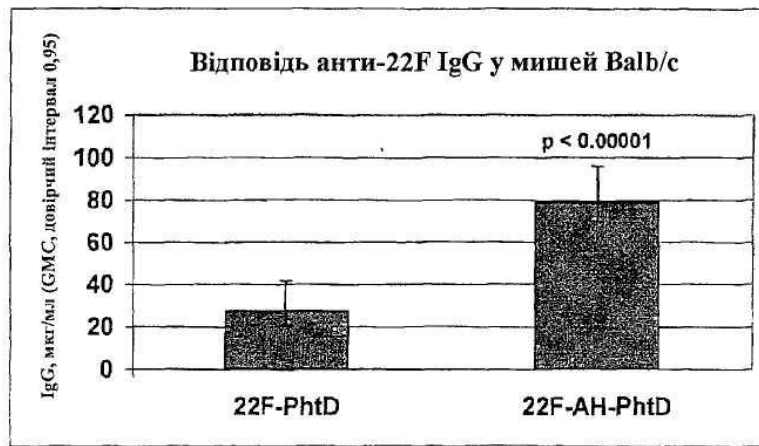
Фігура 2. Імуногенність кон'югату у старих мавп резус (концентрація анти-PS3 В-клітин пам'яті post II)



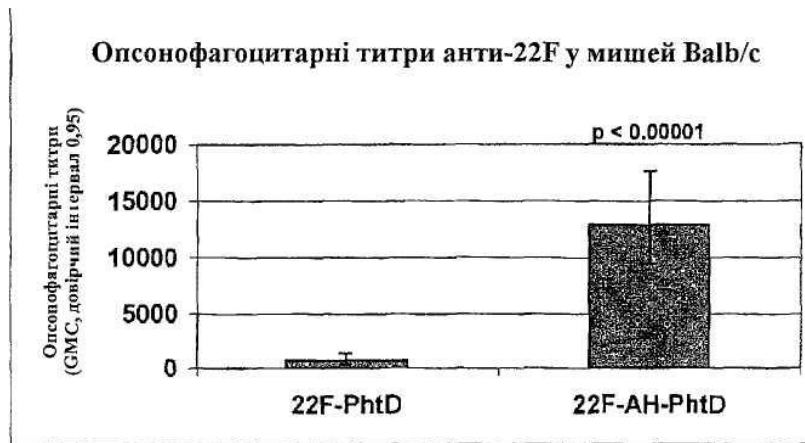
Фігура 3. PS19F імуногенність у Balb/c мишей (рівні IgG post III)



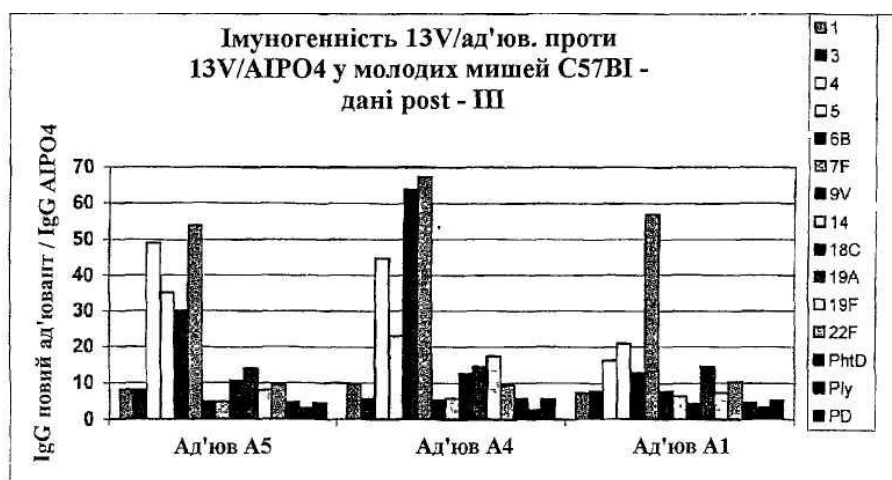
Фігура 4. PS22F імуногенність у Balb/c мишей (рівні IgG post III)



Фігура 5. Рівні анти-PS IgG у сироватці



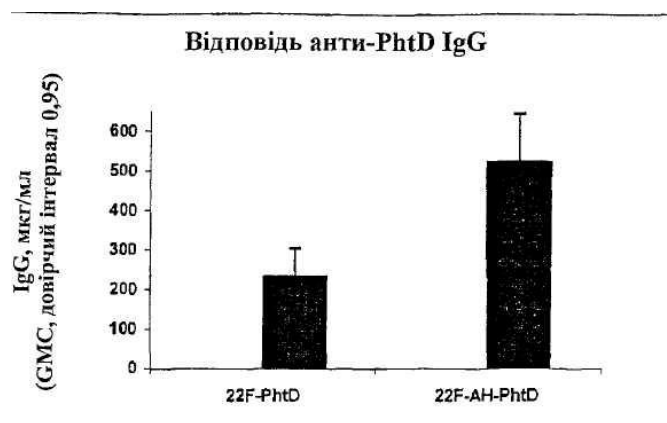
Фігура 6. Опsonoфагоцитарні титри



Фігура 7. Порівняння IgG відповідей, індукованих новими ад'ювантами, з відповіддю, що викликається AIPO4



Фігура 8. Протективна ефективність комбінації білків PhtD + dPly проти типу 19F колонізації легень у мавп резус



Фігура 9. Відповідь анти-PhtD IgG у сироватці



Фігура 10. Захист проти контрольного зараження пневмококом типу 4 у мишей

