



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/50 (2017.01); A61K 47/61 (2017.01); A61K 39/00 (2017.01); A61K 39/385 (2017.01); A61K 47/6415 (2017.01); A61K 47/646 (2017.01); A61K 2039/6068 (2017.01); A61K 2039/627 (2017.01)

(21)(22) Заявка: 2018135066, 10.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2017Дата регистрации:
26.10.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.03.2016 IN 201611008901

(43) Дата публикации заявки: 06.04.2020 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 26.10.2021 Бюл. № 30

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.10.2018(86) Заявка РСТ:
IV 2017/051408 (10.03.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/158480 (21.09.2017)Адрес для переписки:
125008, Москва, пр-д Черепановых, 36, кв. 8,
Ефимову И.Д.

(72) Автор(ы):

РАНА Ракеш (IN),
ДАЛАЛ Джунед (IN),
ЧХИКАРА Манодж Кумар (IN),
ДЖИЛЛ, Девиндер (IN)

(73) Патентообладатель(и):

МСД УЭЛКОМ ТРАСТ ХИЛЛЕМАН
ЛАБОРАТОРИС ПВТ. ЛТД. (IN)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2011041003 A2, 07.04.2011. WO
2007000314 A2, 04.01.2007. EA 12214 B1,
28.08.2009. RU 2233172 C2, 27.07.2004.

(54) НОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ ПОЛИСАХАРИДА С БЕЛКОМ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Описана группа изобретений, включающая конъюгат полисахарида с белком с высокой иммуногенностью, где указанный конъюгат является стабильным и его можно использовать в качестве кандидата вакцины, и способ получения вышеуказанного конъюгата. В одном из вариантов реализации конъюгат содержит полисахарид, полученный из грамотрицательных бактерий, где грамотрицательной бактерией является *Neisseria meningitidis* (Men), белок-носитель, выбранный из

ТТ (столбнячный анатоксин), ДТ (дифтерийный анатоксин), CRM197 (нетоксический мутант DT) или OMPV (везикулы из белков наружной мембраны), причем полисахарид разлагается в диапазоне размеров коэффициента распределения, составляющего $0,38 \pm 0,06$ kD, конъюгат характеризуется стабильной карбаматной связью -O- (C=O)-N-, и формула указанного конъюгата представляет собой PS-L1-L2-CR, где PS представляет собой полисахарид, L1 представляет собой карбаматную связь, L2 представляет собой гидразидную связь, и CR представляет собой

белок-носитель. Изобретение расширяет арсенал средств с высокой иммуногенностью и стабильностью для использования в качестве

кандидата вакцины. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 8 ил., 7 табл., 12 пр.

R U 2 7 5 8 0 9 0 C 2

R U 2 7 5 8 0 9 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 47/50 (2017.01)
A61K 47/61 (2017.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 47/50 (2021.05); *A61K 47/61* (2021.05); *A61K 39/00* (2021.05); *A61K 39/385* (2021.05); *A61K 47/6415* (2021.05); *A61K 47/646* (2021.05); *A61K 2039/6068* (2021.05); *A61K 2039/627* (2021.05)

(21)(22) Application: **2018135066, 10.03.2017**(24) Effective date for property rights:
10.03.2017Registration date:
26.10.2021

Priority:

(30) Convention priority:
15.03.2016 IN 201611008901(43) Application published: **06.04.2020** Bull. № 10(45) Date of publication: **26.10.2021** Bull. № 30(85) Commencement of national phase: **05.10.2018**(86) PCT application:
IB 2017/051408 (10.03.2017)(87) PCT publication:
WO 2017/158480 (21.09.2017)Mail address:
**125008, Moskva, pr-d Cherepanovykh, 36, kv. 8,
Efimovu I.D.**

(72) Inventor(s):

**RANA Rakesh (IN),
DALAL Juned (IN),
CHHIKARA, Manoj Kumar (IN),
GILL Davinder (IN)**

(73) Proprietor(s):

**MSD WELLCOME TRUST HILLEMANN
LABORATORIES PVT. LTD. (IN)**

(54) **NEW CONJUGATES OF POLYSACCHARIDE WITH PROTEIN AND THEIR PREPARATION METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions is described, including a conjugate of polysaccharide with a protein with high immunogenicity, where the specified conjugate is stable, and it can be used as a vaccine candidate, and a method for preparing the above-mentioned conjugate. In one embodiment, the conjugate contains polysaccharide obtained from gram-negative bacteria, where gram-negative bacterium is *Neisseria meningitidis* (Men), a carrier protein selected from TT (tetanus toxoid), DT (diphtheria toxoid), CRM197 (non-toxic mutant DT) or OMPV (vesicles from outer

membrane proteins), wherein polysaccharide is decomposed in the size range of the distribution coefficient of 0.38 ± 0.06 kD, the conjugate is characterized by a stable carbamate bond -O- (C=O)-N-, and the formula of the specified conjugate is PS-L1-L2-CR, where PS is polysaccharide, L1 is a carbamate bond, L2 is a hydrazide bond, and CR is a carrier protein.

EFFECT: invention expands the arsenal of drugs with high immunogenicity and stability for use as a vaccine candidate.

15 cl, 8 dwg, 7 tbl, 12 ex

RU 2 758 090 C2

RU 2 758 090 C2

Область настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к новым конъюгатам полисахарида с белком и способам их получения. Более конкретно, настоящее изобретение относится к конъюгатам полисахарида с белком, полученным с использованием карбаматной химии, которые можно использовать в получении моновалентной вакцины или мультивалентных комбинированных вакцин, а также диагностического средства. Более конкретно, настоящее изобретение относится конъюгату полисахарида *Neisseria meningitidis* серогруппы X, A, C, Y и W135 с белком-носителем с использованием карбаматной химии и способу его получения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

N. meningitidis (менингококк) представляет собой аэробную грамотрицательную бактерию, которую серологически классифицировали, главным образом, на 13 серогрупп: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y и Z. Система классификации по группам основана на капсульных полисахаридах организма. На официальном сайте ВОЗ упоминается, что *N. meningitidis* представляет собой одну из наиболее распространенных причин бактериального менингита во всем мире и единственную бактерию, способную вызывать большие эпидемии менингита. Сообщалось о взрывоопасных эпидемиях с показателями заболеваемости до 1000 случаев на 100000 жителей, особенно в странах Африки к югу от Сахары.

N. meningitidis передается воздушно-капельным путем или непосредственным контактом с респираторными секретами пациентов или здоровых людей-носителей. Как правило, эндемическое заболевание возникает, главным образом, у детей и подростков, с наивысшими показателями пораженности у детей грудного возраста от 3 до 12 месяцев, тогда как в эпидемии могут быть более вовлечены дети старшего возраста и молодые взрослые. Тем не менее, быстрое прогрессирование менингококковой инфекции часто приводит к смерти в течение 1-2 дней после начала. Можно проводить профилактику инфекций *N. meningitidis* путем вакцинации.

Haemophilus influenzae типа b представляет собой грамотрицательную бактерию, которая вызывает менингит и острые респираторные инфекции, главным образом, у детей. На официальном сайте ВОЗ упоминается, что в развитых и развивающихся странах она представляет собой важную причину неэпидемического менингита у маленьких детей, и часто ассоциируется с тяжелым неврологическим осложнением, даже если антибиотики вводят быстро.

Инфекция *Haemophilus influenzae* передается капельным путем от инфицированных (но не всегда проявляющих симптомы) людей. Можно проводить профилактику инфекций *H. influenzae* типа b путем вакцинации.

Преобладающее большинство менингококковых инфекций вызвано 6 серогруппами, а именно: A, B, C, Y, W135 и X. Исторически сложилось так, что большинство случаев в менингитном поясе вызваны менингококками серогруппы A. Менингококки серогруппы C отвечали за вспышки в менингитном поясе в 1980-х годах, и новая вспышка также наблюдалась в Нигере в 2015 году, а серогруппа W (ранее W-135) возникла как причина эпидемии менингита начиная с 2000 года. Распространенность серогруппы Y в Африке является минимальной; тем не менее, эта серогруппа больше проявляется в случаях менингита в Южной Америке. Согласно одной публикации NCBI менингококки серогруппы X ранее считались редкой причиной спорадического менингита, но в течение 2006-2010 гг. вспышки вызванного серогруппой X менингита произошли в Нигере, Уганде, Кении, Того и Буркина-Фасо, в последней стране сообщалось по меньшей мере о 1300 случаях менингита серогруппы X среди 6732.

Согласно другой публикации NCBI в Того в течение 2006-2009 гг. менингококки серогруппы X являлись причиной 16% из 702 подтвержденных случаев бактериального менингита. В районе Kozah произошла вспышка менингококков серогруппы X в марте 2007 года с сезонной кумулятивной заболеваемостью менингококками серогруппы X, составляющей 33/100000. В Буркина-Фасо в течение 2007-2010 гг. менингококки серогруппы X являлись причиной 7% из 778 подтвержденных случаев бактериального менингита с увеличением с 2009 по 2010 год (от 4% до 35% всех подтвержденных случаев, соответственно). В 2010 году вызванные менингококками серогруппы X эпидемии произошли в северных и центральных районах Буркина-Фасо; наибольшую районную кумулятивную заболеваемость менингококками серогруппы X оценивали как составляющую 130/100000 в течение марта-апреля.

Исходя из вышеизложенных фактов пятивалентная вакцина ACYWx на основе конъюгата полисахарида с белком могла предложить более широкий охват менингококковой инфекции, за исключением серогруппы B. Иммунизация - единственный эффективный подход к борьбе с менингококковой инфекцией. В настоящее время различные моновалентные или мультивалентные вакцины, включающие в себя конъюгаты полисахаридов серогруппы A, C, Y и W135, получили разрешение для продажи на рынке, но не существует ни одной разрешенной к применению вакцины против менингококков серогруппы X. Конъюгаты полисахарида серогруппы X с белком станут новым дополнением к разработке мультивалентных менингококковых конъюгированных вакцин применительно к потребности общественного здравоохранения.

Несколько исследований показывают, что размер сахаридного фрагмента может влиять на иммуногенность конъюгированных вакцин. Первоначальные исследования по иммуногенности конъюгатов декстрана с белком обнаружили, что декстран низкой молекулярной массы, конъюгированный с куриным сывороточным альбумином, индуцировал сильный ответ против декстрана у мышей, при этом увеличение размера декстрана приводило к сниженной иммуногенности. Laferriere с соавт. обнаружили небольшое влияние длины углеводной цепи на иммуногенность пневмококковых конъюгированных вакцин у мышей. Эти исследования указывают на то, что отсутствует явная корреляция между длиной полисахаридной цепи и иммуногенностью конъюгированной вакцины. Тем не менее Rana с соавт. посчитали важным установить оптимальную длину сахаридной цепи для разработки иммуногенной вакцины на основе полисахаридного конъюгата Hib.

Реакция полисахаридов с CDI была показана в нескольких литературных ссылках. Карбонилдиимидазол, особенно предпочтительный реагент, реагирует с гидроксильными группами с образованием имидазолилуретанов полисахарида, и арилхлорформиатов, включая в себя, например, нирофенилхлорформиат, давая в результате смешанные карбонаты полисахарида. В каждом случае полученный активированный полисахарид является очень чувствительным к действию нуклеофильных реагентов, таких как амины, и за счет этого трансформируется в соответствующие уретаны.

Для любой химии конъюгирования структура полисахарида играет очень важную роль. Выбранная химия для конъюгирования любого полисахарида с белком-носителем зависит от доступных функциональных групп на данном полисахариде. Наряду с тем, что некоторые полисахариды содержат химические группы, которые можно без труда использовать для конъюгирования, например, амины, карбоксилы или альдегиды, многие полисахариды нуждаются в активации и дериватизации перед тем, как их можно соединить с белками. Как видно из литературы, вакцины на основе конъюгата

полисахарида с белком можно получить с помощью линкера или без него, при этом линкер может представлять собой часть полисахарида, или его можно прикрепить к белку-носителю.

5 В существующем уровне техники раскрыты вакцины для лечения различных серогрупп, включая в себя *Neisseria meningitidis* серогрупп А, В, С, W и Y, например, в заявке на выдачу патента США № US 2015/0044253 раскрыта иммуногенная композиция, содержащая сахаридный фрагмент, полученный из *N. influenzae* серотипа В (Hib), *N. meningitidis* серогруппы А, В, С, W, Y, конъюгированный с белком-носителем. Тем не менее, в заявке на выдачу патента США № US 2015/0044253 карбаматный линкер
10 присоединяют напрямую на аминокислотные группы белка-носителя, что приводит к низкой эффективности конъюгирования.

В международной патентной публикации WO 2004/019992 также раскрыт модифицированный капсульный сахарид и конъюгаты сахараида с белком для *N. meningitidis* серогруппы А, полученные путем восстановительного аминирования, тем
15 не менее, в указанной заявке речь идет только о серогруппе А.

Существует несколько раскрытий, доступных в отношении *N. meningitidis* серогруппы Х, такие как международная патентная публикация WO 2013/174832, в которой раскрыт конъюгат *N. meningitidis* серогруппы Х, полученный путем химии конъюгирования на основе восстановительного аминирования.

20 Основным недостатком раскрытий в существующем уровне техники является то, что ни в одном из раскрытий предшествующего уровня техники с использованием карбаматной химии не раскрыто растворение полисахарида в органическом растворителе для облегчения процесса конъюгирования. Доступные в настоящее время конъюгаты страдают от проблем со стабильностью. Более конкретно, недоступны
25 стабильные и коммерчески целесообразные конъюгаты для *N. meningitidis* серогруппы Х.

Цель настоящего изобретения

Для устранения недостатков в существующем уровне техники главной целью настоящего изобретения является обеспечение новых конъюгатов полисахарида с
30 белком.

Другая цель настоящего изобретения представляет собой обеспечение стабильных конъюгатов полисахарида с белком, которые можно использовать для получения новых конъюгированных вакцин.

35 Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой обеспечение конъюгата полисахарида *N. meningitidis* серогруппы Х с белком-носителем, чтобы выше расширить охват заболеваемости менингококковой инфекции, предотвращаемой существующими в настоящее время разрешенными к применению вакцинами.

Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой обеспечение способа получения указанных новых конъюгатов полисахарида с белком.

40 Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой обеспечение способа получения указанных новых конъюгатов полисахарида с белком с использованием карбаматной химии.

Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой обеспечение способа быстрой сольюбилизации полисахарида в неводных апротонных растворителях.

45 Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой проведение реакции конъюгирования в более широком диапазоне рН.

Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой завершение способа конъюгирования за очень короткий промежуток времени с высокими выходами.

Еще одна цель настоящего изобретения представляет собой получение новых конъюгатов полисахарида с белком с высокой иммуногенностью, которые можно использовать в вакцине и в качестве диагностического средства.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

5 Соответственно, настоящее изобретение относится к новым конъюгатам полисахарида (PS) с белком и способу их получения. Более конкретно, настоящее изобретение относится к получению конъюгатов полисахарида с белком с помощью карбаматной химии для получения новых конъюгированных вакцин. Более конкретно, настоящее изобретение относится к конъюгату полисахарида *N. meningitidis* серогруппы
10 X, A, C, Y и W135 с белком-носителем с использованием карбаматной химии и к способу его получения.

Настоящее изобретение относится к способу конъюгирования, при котором капсульный полисахарид разлагают до меньших размеров, подходящих для конъюгирования с белком-носителем для получения конъюгатов с повышенной
15 антигенностью.

Белок-носитель выбран из следующего: TT (столбнячный анатоксин), DT (дифтерийный анатоксин), CRM 197 (нетоксический мутант DT), OMPV (везикулы из белков наружной мембраны) или другие подходящие белки-носители. Полисахаридный фрагмент получен из группы грамотрицательных бактерий, включая в себя без
20 ограничения *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), *Neisseria meningitidis* (Men), *Streptococcus pneumoniae*.

Согласно способу конъюгирования капсульный полисахарид *Neisseria meningitidis*, более предпочтительно капсульный полисахарид Men A, C, Y, W или X разлагают. Такое разложение проводят с использованием нескольких техник, доступных в
25 предшествующем уровне техники. Более предпочтительно разложение проводят с помощью обработки ультразвуком и/или ультразвуковой обработки зонда в лабораторном масштабе и с помощью микрофлюидизатора в больших масштабах. Нативный капсульный полисахарид *N. meningitidis* разлагают в диапазоне размеров коэффициента распределения, составляющего 0,38+0,06 Kd, что определяют с помощью
30 гель-проникающей хроматографии (GPC) на высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

После проведения способа разложения указанные разложенный полисахарид растворяют в сильных электролитных солях для обмена противоионов, включая в себя без ограничения галогениды лития, хлорид лития и гидраты галогенидов четвертичного
35 аммония. Обеспечивают правильное смешивание раствора в течение 60±30 минут. Влагу удаляют из полученного капсульного полисахарида с помощью любой техники сушки, такой как роторное испарение. Высушенный капсульный полисахарид затем растворяют в неводных апротонных растворителях, включая в себя без ограничения безводный диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), N-метилпирролидон (NMP) или
40 диметилацетамид. Указанный разложенный и высушенный капсульный полисахарид в неводном апротонном растворителе приводят в реакцию с 5-50 молярной избыточной концентрацией не содержащих влаги активирующих средств, включая в себя без ограничения N,N'-карбонилдиимидазол (CDI), N,N'-ди-сукцинимидилкарбонат (DSC) или N,N'-ди-сукцинимидилоксалат (DSO), и смесь выдерживают в присутствии 4-
45 диметиламинопиридина (DMAP) или пиридина в течение заданного периода времени для завершения реакции.

Полученный активированный капсульный полисахарид очищают путем осаждения полисахарида в избытке низкополярного растворителя, включая в себя без ограничения

этилацетат, дихлорметан, н-бутилацетат или их смесь в различных пропорциях, с последующим растворением осажденного полисахарида в водном буферном растворе хлорида натрия для получения очищенного активированного капсульного полисахарида.

5 Очищенный активированный капсульный полисахарид, полученный таким образом, растворяют в водном буфере с активированным белком-носителем. Активированный белок-носитель можно метить карбогидразидом, или АДН, или гидразином.

Раствор очищенного активированного капсульного полисахарида и активированного белка-носителя оставляют смешиваться при комнатной температуре в течение заданного периода времени, предпочтительно 15 ± 5 часов, при диапазоне различных значений рН 10 в зависимости от того, является ли указанный полисахарид активированным с помощью CDI, активированным с помощью DSC или активированным с помощью DSO. Диапазон рН для активированного с помощью CDI полисахарида составляет 8-10, при этом диапазон рН для активированного с помощью DSC или активированного с помощью DSO полисахарида составляет 6-9. Во время этой реакции амин гидразидного фрагмента 15 на белке и -N-содержащий ароматический остаток карбаматного или карбонатного фрагмента на активированном полисахариде реагируют и приводят к образованию конъюгата полисахарида с белком со стабильной карбаматной связью -O- (C=O)-N-. В результате этого получают конечный конъюгат с формулой PS-L1-L2-CR, где PS представляет собой полисахарид, L1 представляет собой карбаматную связь, L2 20 представляет собой гидразидную связь, и CR представляет собой белок-носитель. Очищенные конъюгаты получают с помощью способа очистки, включая в себя без ограничения ультрафильтрацию, осаждение сульфатом аммония, гель-проникающую хроматографию.

Согласно настоящему изобретению также раскрыто прикрепление одного линкера, 25 предпочтительно карбамата, к полисахариду и второго линкера, предпочтительно гидразина, к белку-носителю с последующей реакцией активированного полисахарида и активированного белка, имеющих отдельные линкеры, для получения конъюгата.

Настоящий улучшенный способ конъюгирования завершается за более короткий промежуток времени и дает на выходе конъюгаты с более стабильной ковалентной 30 связью в широком рабочем диапазоне рН. Новый конъюгат полисахарида с белком согласно настоящему изобретению проявляет большую стабильность, высокий выход и высокую иммуногенность.

Согласно настоящему изобретению также раскрыт способ растворения полисахарида в неводном апротонном растворителе, что облегчает реакцию конъюгирования между 35 полисахаридом и образующим карбамат средством для завершения способа конъюгирования за более короткий промежуток времени.

Наиболее значимым результатом улучшенного способа согласно настоящему изобретению является получение новых конъюгатов полисахарида с белком, которые можно использовать в вакцине или в качестве диагностического средства. Указанный 40 новый конъюгат полисахарида с белком вызывает специфический и гомологичный иммунный ответ и, следовательно, является применимым в получении моновалентной вакцины или мультивалентных комбинированных вакцин, а также диагностического средства.

Краткое описание графических материалов

45 На фигуре 1 изображена схема реакции поперечного сшивания EDC (карбодиимида) ($R-NH_2$ представляет собой либо гидразин (H_2N-NH_2), либо дигидразид адипиновой кислоты (ADH) ($NH_2NHCO(CH_2)_4CONHNH_2$)).

На фигуре 2 изображено мономерное звено химической структуры капсульного

полисахарида Men X.

На фигуре 3 изображен профиль HPLC-SEC, на котором показан элюирующий объем на колонке TSKgel PWWL5000 - PWWL4000 при скорости потока, составляющей 1 мл/мин, показан свободный объем, общий объем и элюирующий объем образца.

5 На фигуре 4 изображен полученный с помощью HPLC-SEC профиль сравнения нативного полисахарида Men X с доведенными до нужных размеров полисахаридами.

На фигуре 5 изображен полученный с помощью HPLC-SEC профиль сравнения дериватизированного гидразином ТТ с нативным ТТ.

10 На фигуре 6 изображена хроматограмма, на которой показана очистка дериватизированного гидразидом ТТ на sephadex G25.

На фигуре 7 изображена полная схема карбаматного конъюгирования.

На фигуре 8 изображен полученный с помощью HPLC-SEC профиль сравнения дериватизированного гидразином ТТ с сырым конъюгатом Men X.

Подробное раскрытие настоящего изобретения с иллюстрациями и примерами

15 Настоящее изобретение относится к новым конъюгатам полисахарида с белком и способу их получения. Более конкретно, настоящее изобретение относится к получению химически стабильных конъюгатов полисахарида с белком с помощью карбаматной химии. Полисахаридный фрагмент получают из группы грамотрицательных бактерий, включая в себя без ограничения Haemophilus influenzae типа b (Hib), Neisseria meningitidis
20 (Men), Streptococcus pneumoniae, более предпочтительно N. meningitidis серогруппы Men A, C, Y, W и предпочтительно Men X. Настоящее изобретение также относится к получению новых конъюгатов полисахарида с белком с высокой иммуногенностью, которые можно использовать в вакцине индивидуально или в комбинациях или в качестве диагностического средства.

25 Настоящее изобретение также относится к способу конъюгирования, при котором указанный капсульный полисахарид разлагают до меньших размеров, подходящих для конъюгирования с белком-носителем, для получения конъюгатов с повышенной антигенностью.

30 Настоящее изобретение относится к способу конъюгирования с использованием CDI для активации гидроксильной группы для образования конъюгатов полисахарида с белком с помощью карбаматной химии.

Белок-носитель выбран из следующего: ТТ (столбнячный анатоксин), DT (дифтерийный анатоксин), CRM 197 (нетоксический мутант DT), OMPV (везикулы из белков наружной мембраны) или другие подходящие белки-носители.

35 Указанный капсульный полисахарид разлагают с использованием некоторых техник, доступных в предшествующем уровне техники. Более предпочтительно разложение проводят с помощью обработки ультразвуком и/или ультразвуковой обработки зонда в лабораторном масштабе и с помощью микрофлюидизатора в больших масштабах. Нативный капсульный полисахарид N. meningitidis разлагают в диапазоне размеров
40 коэффициента распределения, составляющего 0,38±0,06 Kd. Размер полисахарида определяют с помощью гель-проникающей хроматографии (GPC) на высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

После проведения способа разложения указанный разложенный полисахарид растворяют в сильных электролитных солях для обмена противоионов, включая в себя
45 без ограничения галогениды лития, хлорид лития и гидраты галогенидов четвертичного аммония. Обеспечивают правильное смешивание раствора в течение 60±30 минут. Влагу удаляют из полученного капсульного полисахарида с помощью любой техники сушки, такой как роторное испарение. Высушенный капсульный полисахарид затем растворяют

в неводных апротонных растворителях, включая в себя без ограничения безводный диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), N-метилпирролидон (NMP) или диметилацетамид. Указанный разложенный и высушенный капсульный полисахарид в неводном апротонном растворителе приводят в реакцию с 5-50 молярной избыточной концентрацией не содержащих влаги активирующих средств, включая в себя без

5 ограничения N,N'-карбонилдиимидазол (CDI), N,N'-ди-сукцинимидилкарбонат (DSC) или N,N'-ди-сукцинимидилоксалат (DSO), и смесь выдерживают в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP) или пиридина в течение заданного периода времени для завершения реакции. PS Men содержит свободную гидроксильную группу в своем

10 повторяющемся звене, которая при проведении реакции с карбонилдиимидазолом (CDI) образует промежуточное соединение имидазолилкарбамат и побочный продукт имидазол.

Полученный активированный капсульный полисахарид очищают путем осаждения полисахарида в избытке низкополярного растворителя, включая в себя без ограничения

15 этилацетат, дихлорметан, н-бутилацетат или их смесь в различных пропорциях, с последующим растворением осажденного полисахарида в водном буферном растворе хлорида натрия для получения очищенного активированного капсульного полисахарида.

Белок-носитель приводят в реакцию с водорастворимым карбодиимидом EDC (N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимидгидрохлорид) в присутствии гидразина

20 или ADH с получением на выходе стабильных имидных связей с выступающими концевыми гидразидными группами. EDC реагирует с доступными карбоксилатными группами с образованием промежуточного соединения, в высокой степени реакционноспособной о-ацилизомочевины. Этот активный сложный эфир далее может реагировать с нуклеофилами, такими как гидразид, с получением на выходе стабильного

25 конечного продукта (фиг. 1). Схема поперечного сшивания EDC (R-NH₂) представляет собой либо гидразин, либо ADH.

Карбонилы реагируют с гидразидами и аминами при pH 5-7. Гидролиз EDC представляет собой параллельную реакцию во время сочетания и он зависит от

30 температуры, pH и состава буфера. 4-Морфолиноэтансульфоная кислота (MES) представляет собой эффективный буфер карбодиимидной реакции. Фосфатные буферы снижают эффективность реакции EDC, но увеличение количества EDC может компенсировать сниженную эффективность. Трис-, глицин- и ацетат-содержащие буферы не могут быть использованы в качестве буферов для конъюгирования.

Гидразиды, метящие ТТ, определяют с помощью анализа TNBS; и концентрацию

35 белка определяют с помощью анализа Лоури. Степень дериватизации рассчитывают путем деления моль образованных гидразидов на моль белка.

Очищенный активированный капсульный полисахарид, полученный таким образом, растворяют в водном буфере с активированным белком-носителем. Активированный

40 белок-носитель можно метить с помощью карбогидразида, или ADH, или гидразина.

Раствор очищенного активированного капсульного полисахарида и активированного

белка-носителя оставляли для смешивания при комнатной температуре в течение 15±5 часов при диапазоне различных значений pH в зависимости от того, является ли

45 указанный полисахарид активированным с помощью CDI, активированным с помощью DSC или активированным с помощью DSO. Диапазон pH для активированного с помощью CDI полисахарида составляет 8-10, при этом диапазон pH для активированного с помощью DSC или активированного с помощью DSO полисахарида составляет 6-9. Во время этой реакции амин гидразидного фрагмента на белке и -N-содержащий ароматический остаток карбаматного или карбонатного фрагмента на

активированном полисахариде реагируют и приводят к образованию конъюгата полисахарида с белком со стабильной карбаматной связью -O- (C=O)-N-. В результате этого получают конечный конъюгат с формулой PS-L1-L2-CR, где PS представляет собой полисахарид, L1 представляет собой карбаматную связь, L2 представляет собой гидразидную связь, и CR представляет собой белок-носитель. Очищенные конъюгаты получают с помощью способа очистки, включая в себя без ограничения ультрафильтрацию, осаждение сульфатом аммония, гель-проникающую хроматографию.

Конъюгаты, полученные с использованием карбаматной химии, подвергали испытанию для определения соотношения полисахарида к белку, количества свободного полисахарида в конъюгатах и распределения по размерам молекул. Согласно настоящему изобретению различные эксперименты по оптимизации проводили для достижения соотношения полисахарида к белку в диапазоне от 0,30 до 1,0 и выходов конъюгирования, составляющих вплоть до 60%, при этом среднее значение составляет 30±5%.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления PS Men, полученный из бактериальной ферментации, очищают с помощью последующего способа очистки и анализируют после очистки в отношении всех критически важных параметров качества. Химическая структура PS Men состоит из повторяющихся звеньев со свободной(ыми) гидроксильной(ыми) группой(ами), например, PS Men X (фиг. 2) состоит из повторяющегося звена с фосфатным каркасом и N-ацелированием в положении 3. Гидроксильные группы в положении 4 и 7 действуют как реакционноспособные функциональные группы для конъюгирования с карбаматом, индуцируя химические соединения, подобные CDI. Мономерные повторяющиеся звенья называются моносахаридами, и длинная цепь, образованная ковалентной связью между моносахаридными звеньями, составляет полисахарид. Тип моносахарида является специфическим для конкретной серогруппы (таблица 1).

Таблица 1: Химическая структура капсульных полисахаридов различных серогрупп *N. meningitidis*

Группа	Повторяющееся звено
X	→4)-D-GlcpNAc-α-(1→OPO ₃ →
A	→6)-D-ManpNAc(3/4OAc)-α-(1→OPO ₃ →
C	→9)-D-Neup5Ac(7/8OAc)-α-(2→
Y	→4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)-α-(2→6)-D-Glc-α-(1→
W	→4)-D-Neup5Ac(7/9OAc)-α-(2→6)-D-Gal-α-(1→

Нативные PS Men характеризуются диапазоном размеров коэффициента распределения, составляющим 0,38+0,06 Kd, что определяют с помощью SEC на HPLC с использованием пуллулановых стандартов. Карбаматная химия согласно настоящему изобретению и структура полисахарида вносят вклад в образование стабильных конъюгатов полисахарида с белком, которые подлежат использованию в качестве кандидата вакцины либо отдельно, либо в комбинации.

Содержание разложенного полисахарида определили с помощью физико-химических

анализов, например, анализа с использованием фосфора в отношении Men X и Men A, и обнаружили, что оно являлось сходным с содержанием исходного полисахарида.

Различные эксперименты проводили для оптимизации и достижения коэффициентом распределения оптимального диапазона, составляющего $0,38+0,06$ Kd. Использовали различные условия, поскольку условия варьируют для различных партий в зависимости от начального размера молекул и структуры отдельного полисахарида.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления полисахарид Men X разлагают до меньших размеров, подходящих для конъюгирования с белком-носителем для получения конъюгатов с высокой антигенностью. Столбнячный анатоксин (ТТ) используют в качестве белка-носителя. Указанный разложенный полисахарид Men X растворяют в хлориде лития. Обеспечивают правильное смешивание раствора в течение 60 ± 30 минут. Влагу удаляют из полученного капсульного полисахарида с помощью одной известной техники сушки, такой как роторное испарение. Разложенный и высушенный капсульный полисахарид затем растворяют в безводном диметилсульфоксиде (DMSO). Высушенный капсульный полисахарид в неводном апротонном растворителе приводят в реакцию с 5-50 молярной избыточной, предпочтительно 30 молярной избыточной концентрацией активирующего средства N,N'-карбонилдиимидазола (CDI) и смесь выдерживают для смешивания в течение периода, составляющего 2 ч - 3 ч для завершения реакции. рН реакционной смеси поддерживают при 7-10, предпочтительно при 9,0. Полученный активированный полисахарид Men X очищают путем осаждения полисахарида в избытке низкополярного растворителя этилацетата с последующим растворением осажденного полисахарида в водном буферном растворе хлорида натрия для получения очищенного активированного капсульного полисахарида.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления линкер представляет собой гидразин или его производное, прикрепленные к белку-носителю. Доведенный до нужного размера активный полисахарид и дериватизированный белок-носитель смешивают в пропорции, составляющей 0,5:1 - 1:0,5 масс./масс., более предпочтительно 1:1 масс./масс., в буфере с рН 7,0-10,0, предпочтительно 0,1 М карбоната натрия, 0,1 М NaCl, рН 9,0. Во время этой реакции амин гидразидного фрагмента на белке и -N-содержащий ароматический остаток карбаматного или карбонатного фрагмента на активированном полисахариде реагируют и приводят к образованию конъюгата полисахарида с белком с очень стабильной карбаматной связью -O-(C=O)-N-. Указанный конъюгат очищают с помощью известных техник и анализируют в отношении общего содержания полисахарида, содержания белка, свободного полисахарида, соотношения полисахарида к белку и выхода конъюгирования. Очищенные конъюгаты хранят при 2-8°C.

Конъюгаты согласно настоящему изобретению являются стабильными при действии на них высокотемпературных условий, составляющих 37°C. Конъюгаты Men согласно настоящему изобретению показывают высокую антигенность и высокую иммуногенность, что выявлено с помощью сывороточного бактерицидного теста (SBA) и различных иммуногенных анализов, таких как ELISA.

НЕОГРАНИЧИВАЮЩИЕ ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение нужного размера полисахарида Men X
200 мг полисахарида Men X помещают в концентрации, составляющей 10 мг/мл, в аналитический стакан на ледяной бане. Запускают ультразвуковой диспергатор с 20% амплитудой в течение 3 ч. Размер разложенного полисахарида определяют в единицах коэффициента распределения (Kd) путем проведения анализа на HP-GPC (таблица 2) с

использованием датчика показателя преломления (RI). Образцы элюируют в 0,1 М NaNO₃ при pH 7,2 в изократическом режиме на колонке TSKgel G5000 PWXL + G4000 PWXL последовательно. Элюирующие объемы измеряют в единицах времени удерживания. Свободный объем (V₀) колонки рассчитывают из времени удерживания инъекции высокомолекулярного декстрана и общий объем (V_t) колонки определяют по времени удерживания инъекции азида натрия, соответственно. K_d рассчитывают из формулы $K_d = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$. V_e представляет собой время удерживания (RT) элюирующего объема образца (фиг. 3). Данные, зарегистрированные с использованием датчика RI, показывают сдвиг пика вправо, указывая на деполимеризацию нативных полисахаридов (фиг. 4).

Таблица 2: Результаты, показывающие распределение по размерам менингококкового полисахарида серогруппы X с помощью HP-SEC на колонке TSKgel G5000 PWXL + G4000 PWXL.

Средний размер нативного полисахарида	Концентрация полисахарида	Время снижения размера при 20% амплитуде	RT пика на HP-SEC в датчике RI	Конечный коэффициент распределения доведенного до нужного размера полисахарида (K _d) (V ₀ = 10,729 мин V _t = 22,801 мин)
492 кДа	200 мг/20 мл	3,0 ч	15,365 мин	0,384 K _d
570 кДа	200 мг/20 мл	4,5 ч	15,322 мин	0,380 K _d

Пример 2: Активация полисахарида с помощью CDI

200 мг доведенного до нужного размера полисахарида и LiCl смешивали с медленным перемешиванием при комнатной температуре в течение 1 ч и после этого высушивали на роторном испарителе при 40°C. Затем повторно растворяли в 15 мл сухого DMSO и поддерживали перемешивание в течение 2 ч. Затем добавляли 30× молярный карбонилдимидазол (CDI) к полисахариду. pH доводили до 9,0 путем добавления триэтиламина (TEA). Медленное перемешивание выполняли при комнатной температуре в течение 2 ч и охлаждали образец на льду для остановки реакции. Добавляли этилацетат и удаляли супернатант сверху. Снова добавляли этилацетат и удаляли супернатант сверху. Высушивали при высоком вакууме в течение 30 минут.

Пример 3: Активация ТТ

250 мг ТТ концентрируют с использованием центрифужного фильтра с MWCO (номинальным отсечением по молекулярной массе), составляющим 50 кДа, для получения конечных 10 мл. 2,75 мл моногидрата гидразина из маточного раствора 5 М или 2,5 г АДН, эквивалента 10× по массе ТТ, добавляют к 10 мл реакционного буфера, т.е. 0,15 М буфера MES, содержащего 0,2 М NaCl, pH 5,75 и добавляют к ТТ, описанному выше. К этой смеси добавляют равное количество EDAC (250 мг) в 1 мл реакционного буфера для получения конечной концентрации, составляющей приблизительно 30 мМ. pH реакционной смеси доводят до 5,85 и конечный объем реакционной смеси доводят до 25 мл. Концентрация ТТ в реакционной смеси составляет 10 мг/мл. В реакционной смеси поддерживают медленное перемешивание в течение 1,0 ч на ледяной бане. Дериватизированный ТТ далее очищают и анализируют в отношении степени активации и SEC-HPLC для мониторинга профиля пиков. Сравнение полученного с помощью

HPLC-SEC профиля активированного гидразином ТТ с нативным ТТ показано на фиг. 5, где образцы пропускали через хроматографическую колонку в изократическом режиме и данные регистрировали с использованием датчика PDA.

Пример 4: Очистка активированного ТТ

5 Очистка представляет собой одну из наиболее важных стадий в способе и в активации ТТ. Необходимо убедиться, что избавились от всего непрореагировавшего гидразина или АДН до возможного максимума. Очистку проводят с помощью способа обессоливания с использованием Sephadex G-25. Обессоливают реакционную смесь на колонке Sephadex G25 против 50 мМ фосфатного буфера, содержащего 75 мМ NaCl,
10 рН 7,5 для очистки дериватизированного белка. Хроматографическую колонку уравнивают с помощью 50 мМ фосфатного буфера, содержащего 75 мМ NaCl, рН 7,5 с последующей загрузкой образца и элюированием при скорости потока 110 см/ч. Элюированные фракции, по 10 мл каждая, собирают и фракции, соответствующие пику при 280 нМ при УФ (фиг. 6), объединяют и концентрируют с помощью мембраны
15 Amikon с MWCO, составляющим 50 кДа. Выбранные фракции, содержащие ТТ, концентрируют до такого объема, чтобы получить концентрацию ТТ, составляющую приблизительно 30-50 мг/мл (учитывая приблизительно 75% извлечение активированного ТТ после обессоливания). Конечный активированный ТТ анализируют в отношении концентрации белка с помощью анализа Лоури и в отношении гидразидного мечения
20 с помощью анализа TNBS. Оба значения используют для расчета степени активации (DOA) ТТ. Активированный ТТ анализируют на HPLC в концентрации, составляющей 1 мг/мл, с использованием колонок PWXL 5000 - PWXL 4000 последовательно для проверки профиля пиков в отношении его целостности.

Способ согласно настоящему изобретению активирует гидроксильные группы
25 различных полисахаридов, предпочтительно PS Men X, с помощью различных активирующих средств, предпочтительно карбонилдиимидазола, чтобы сделать его реакционноспособным в отношении белка-носителя для образования стабильного конъюгата PS-ТТ (фиг. 7).

Пример 5: Реакция конъюгирования активированного Men X и дериватизированного 30 ТТ

Дериватизированный ТТ добавляли к активированному PS Men X непосредственно в 3 мл буферного раствора, содержащего 0,1 М карбоната натрия, 0,1 М NaCl, при рН 9,0 и поддерживали рН при 9,0. Активированный полисахарид и дериватизированный ТТ смешивают в пропорции 1:1 масс./масс., для реакции конъюгирования. Образование
35 конъюгата подтверждают только через три часа, но сырую смесь конъюгата перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Реакцию затем гасят с использованием 5-10 молярного избытка амин-содержащего реагента, такого как глицин.

Течение конъюгирования подвергают мониторингу с помощью анализа SEC-HPLC
40 по изменению времени удерживания активированного ТТ и сдвигу пиков влево. Полученный с помощью HPLC-SEC профиль конъюгата показывает, что реакция конъюгирования завершается максимально в течение трех - четырех часов. Полученные с помощью SEC-HPLC профили нативного и активированного ТТ и конъюгата указывают на то, что при активации размер активированного ТТ остается неизменным
45 по сравнению с нативным ТТ, указывая на то, что происходит лишь небольшая агрегация или она не происходит вообще. Образцы пропускали через хроматографическую колонку со скоростью потока, составляющей 1,0 мл/мин, с использованием буфера, содержащего 0,1 М нитрата натрия, рН 7,2, в изократическом

режиме и данные регистрировали с использованием датчика PDA. После конъюгирования высокомолекулярный пик появлялся слева от пика дериватизированного ТТ, что указывает на образование конъюгатов PS-ТТ (фиг. 8).

5 Пример 6: Удаление непрогреагировавшего (свободного) полисахарида из сырого конъюгата с помощью осаждения сульфатом аммония

Далее сырой конъюгат очищают с помощью способа осаждения белка для удаления свободного или непрогреагировавшего полисахарида. Очистку проводят путем медленного добавления твердого сульфата аммония к реакционной смеси до выпадения конъюгата в осадок из раствора. Осадки отделяли с помощью центрифугирования при 10 5000×g в течение 45 минут. Супернатант отбрасывают и осадки заново растворяют в 30 мл 50 мМ буфера MES, содержащего 100 мМ NaCl, pH 6,5.

Пример 7: Очистка конъюгата полисахарида с белком с помощью тангенциальной проточной фильтрации (TFF)

15 Образец конъюгата после очистки сульфатом аммония далее очищают с использованием кассет от Pall с MWCO, составляющим 300 кДа. Эта стадия обеспечивает удаление свободного белка (если он есть) из конъюгата и дополнительно отделение свободного PS от конъюгированного PS. Конъюгат подвергают диафильтрации с 20× объемом буфера MES, pH 6,5 и в конце концов концентрируют до объема, составляющего 35 мл.

20 Следовательно, удаление остаточных реагентов, используемых в течение всего способа конъюгирования, обеспечивают на четырех стадиях: первая для PS: во время стадии осаждения активированного PS, вторая для белка-носителя: на стадии очистки с помощью GPC, третья для всего способа конъюгирования: с помощью осаждения сульфатом аммония, и четвертая: с помощью стадии диафильтрации 300 кДа. Далее 25 проводят фильтрование с помощью 0,2 мкм фильтров и хранение при 2-8°C.

Пример 8: Определение характеристик конъюгата Men X-ТТ

Очищенный конъюгат анализируют в отношении общего содержания полисахарида с помощью анализа с использованием фосфора для конъюгатов Men X-ТТ. Содержание белка определяют с помощью анализа Лоури. Свободный полисахарид, определенный 30 путем осаждения с помощью способа с использованием дезоксихолата натрия, и супернатант анализируют с помощью соответствующего колориметрического анализа. Различные анализы для определения различных остаточных продуктов проводят перед его использованием для получения состава. Очищенные конъюгаты хранят при 2-8°C.

35 Конъюгаты согласно настоящему изобретению анализировали в отношении различных параметров качества (таблица 3) и обнаружили, что они дают соотношение полисахарида к белку в диапазоне, составляющем 0,3-0,7 (масс./масс.). Количество свободного полисахарида является различным для различных конъюгатов, тем не менее, во всех очищенных конъюгатах свободный полисахарид составлял меньше чем 10%. Выход конъюгирования также варьировал для различных конъюгатов от 18% до 40 43%. Согласно настоящему изобретению пробовали различные масштабы конъюгирования от 20 мг до 230 мг.

Таблица 3: Определение характеристик различных партий конъюгатов Men X-ТТ

№ серии конъюгата	PS, взятый для конъюгир.	Общий PS в конечном конъюгате	Общий белок в конечном конъюгате	Соотношение PS:белок в очищенном конъюгате (масс./масс.):	Свободный PS в очищенном конъюгате	Выход конъюгирования
1	35 мг	11,6 мг	29,8 мг	0,389	2,5%	31%
2	20 мг	3,7 мг	7,2 мг	0,512	7,0%	19%
3	24 мг	7,0 мг	11,43 мг	0,612	9,7%	29%
4	22 мг	8,9 мг	25 мг	0,356	1,1%	40%
5	100 мг	18,4 мг	27,6 мг	0,666	<1,0%	18%
6	230 мг	43 мг	120 мг	0,357	<1,0%	19%
7	200 мг	69 мг	105 мг	0,657	4,0%	35%
8	200 мг	85 мг	170 мг	0,500	1,8%	43%
Средний				0,506	3,5%	29,3%

Пример 9: Определение характеристик конъюгатов Men A, C, Y, W, полученных с помощью карбаматной химии

Способом, аналогичным для Men X, получали конъюгаты серогрупп Men A, C, Y и W с использованием настоящего изобретения. Все конъюгаты характеризовали в отношении различных параметров качества и обнаружили, что они дают требуемые результаты (таблица 4).

Таблица 4: Определение характеристик различных конъюгатов Men-ТТ

Тип конъюгата (Men-ТТ)	PS, взятый для конъюгир.	Общий PS в конечном конъюгате	Общий белок в конечном конъюгате	Соотношение PS:белок в очищенном конъюгате (масс./масс.):	Свободный PS в очищенном конъюгате	Выход конъюгирования
Men A - ТТ	20 мг	5,6 мг	13,6 мг	0,412	4,5%	28%
Men C - ТТ	40 мг	9,7 мг	27,1 мг	0,358	6,0%	24%
Men Y - ТТ	25 мг	8,2 мг	20,3 мг	0,404	2,7%	33%
Men W - ТТ	30 мг	10,1 мг	24,2 мг	0,417	4,1%	34%

Пример 10: Стабильность конъюгата Men X-ТТ

Конъюгаты согласно настоящему изобретению подвергают действию высокотемпературных условий, составляющих 37°C в течение 28 дней. Образцы забирали на 7, 14, 21 и 28 день для мониторинга образованного свободного полисахарида. Стабильность конъюгатов Men X, полученных с помощью заданной карбаматной химии, согласно настоящему варианту осуществления, подтверждала применимость способа для получения чрезвычайно стабильных конъюгатов (таблица 5).

Таблица 5: Данные в отношении стабильности для партии конъюгатов Men X-ТТ, полученных с помощью химии конъюгирования согласно настоящему изобретению

Тип конъюгата	% свободного PS в начальной точке	% свободного PS при 37°C через 7 дней	% свободного PS при 37°C через 14 дней	% свободного PS при 37°C через 21 день	% свободного PS при 37°C через 28 дней
Партия конъюгата Men X-ТТ 1	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<1,0%	<3,0%
Партия конъюгата Men X-ТТ 2	4,0%	7,5%	7,6%	9,0%	10,5%
Партия конъюгата Men X-ТТ 3	1,8%	2,1%	3,4%	3,5%	4,0%

Пример 11: Иммуногенность конъюгатов Men X

Группы из 8 самок мышей BALB/c возрастом 5-9 недель иммунизировали в дни 0, 14 и 28 двумя различными партиями конъюгированного PS Men X антигена, составленного в нормальном растворе хлорида натрия (таблица 6) с уровнем дозы, составляющим 1 мкг. Все иммунизации проводят путем введения 200 мкг разведения вакцины подкожным путем. Нормальный раствор хлорида натрия отдельно используют для группы отрицательного контроля. Производят забор сыворотки через 7-14 дней после 2 и 3 доз. Титры специфического IgG антитела к PS оценивают с помощью ELISA после 2 и 3 доз.

Максимальные титры IgG для конъюгатов Men X достигаются после двух бустер-доз. Обнаружили, что для Men X увеличение значения титра после 3 доз, по сравнению с отрицательным контролем, является приблизительно 100-кратным в партии 1 конъюгата Men X и 150-кратным в партии 2 конъюгата Men X (таблица 6).

Таблица 6: Геометрическое среднее для титра IgG с помощью ELISA после 2 и 3 доз (+, - 95% доверительный интервал для значения после 3 доз) для составов Men X-ТТ в мышинной модели после иммунизации антигеном в дни 0, 14 и 28

Геометрическое среднее для титра IgG с помощью ELISA			
Дни	Контроль носителем (95% CI)	1 мкг партии 1 конъюгата Men X-ТТ (95% CI)	1 мкг партии 2 конъюгата Men X-ТТ (95% CI)
После 2 доз (анализ объединенных сывороток)	196	30338	30946
После 3 доз (анализ отдельных сывороток)	261 (405, 169)	25293 (32112, 19922)	38224 (48928, 29862)

Пример 12: Сывороточный бактерицидный тест (SBA) для конъюгатов Men X

Равный объем каждого сывороточного образца, принадлежащего группе мышей, объединяют вместе, чтобы создать пулы групп сывороток для тестирования

сывороточным бактерицидным тестом. Анализ проводят следующим образом:

Наносят штрихами целевой штамм *N. meningitidis* серогруппы X для выделения отдельной колонии и инкубируют в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ на планшете с овечьим кровяным агаром. Штамм субкультивируют путем распространения клеток по всей поверхности другого планшета с овечьим кровяным агаром и затем инкубируют для свежего роста при 37°C с 5% CO₂. Бактерии ресуспендируют в ~ 5 мл буфера для бактерицидного анализа. OD₆₅₀ суспензии корректируют эквивалентно числу колоний, составляющему приблизительно 1×10⁵ КОЕ/мл. Сыворотки серийно разводят 2-кратно и буфер для анализа добавляют в контрольные лунки. 10 мкл рабочего раствора бактерий добавляют к каждой лунке. 10 мкл инактивированного тепловой обработкой комплемента (выдержанного при 56°C в течение 30 мин) добавляют во все контрольные лунки с неактивным комплементом и 10 мкл указанного инактивированного комплемента добавляют к лункам, содержащим сыворотки, и контрольным лункам с активным комплементом. Встряхивали планшеты и их инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

После инкубации наносили пятнами по 10 мкл из каждой лунки на планшет со скошенными краями с кровяным агаром. Инкубировали все планшеты с агаром в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Подсчитывали количество колоний в каждом пятне планшетов. Самое высокое разведение сыворотки, показывающие ≥50% гибели бактерий по сравнению с контролем - комплементом, считали титром SBA для этого образца сыворотки.

Данные SBA показывают незначительный ответ от иммунизаций носителем после 3 доз, тогда как обе исследуемые партии конъюгатов Men X показали значимо высокие титры SBA по сравнению с контролем носителем, что указывает на то, что вакцина является эффективной *in vivo* в мышинной модели (таблица 7).

Таблица 7: Геометрическое среднее титра для SBA после 2 и 3 доз (+, - 95% доверительный интервал для значения после 3 доз) для составов Men X-TT в мышинной модели после иммунизации антигеном в дни 0, 14 и 28

Геометрическое среднее титра с помощью SBA			
Дни	Контроль носителем (95% CI)	1 мкг партии 1 конъюгата Men X-TT (95% CI)	1 мкг партии 2 конъюгата Men X-TT (95% CI)
После 2 доз (анализ объединенных сывороток)	2	64	256
После 3 доз (анализ отдельных сывороток)	2 (2, 2)	235 (686, 80)	395 (564, 276)

(57) Формула изобретения

1. Конъюгат полисахарида с белком с высокой иммуногенностью, причем указанный конъюгат полисахарида с белком содержит следующее:

- полисахарид, полученный из грамотрицательных бактерий, где грамотрицательной

бактерией является *Neisseria meningitidis* (Men);

- белок-носитель, выбранный из следующего: TT (столбнячный анатоксин), DT (дифтерийный анатоксин), CRM197 (нетоксический мутант DT) или OMPV (везикулы из белков наружной мембраны); причем

5 - указанный полисахарид разлагается в диапазоне размеров коэффициента распределения, составляющего $0,38 \pm 0,06$ kD,

- указанный конъюгат полисахарида с белком характеризуется стабильной карбаматной связью -O- (C=O)-N-, и

10 - формула указанного конъюгата представляет собой PS-L1-L2-CR, где PS представляет собой полисахарид, L1 представляет собой карбаматную связь, L2 представляет собой гидразидную связь, и CR представляет собой белок-носитель; и

15 где указанная высокая иммуногенность указанного конъюгата, выявленная с помощью ELISA, находится в диапазоне от 100-кратного до 150-кратного увеличения в значении титра после трех доз по сравнению с отрицательным контролем, и где указанный конъюгат является стабильным и его можно использовать в качестве кандидата вакцины либо отдельно, либо в комбинации.

2. Конъюгат полисахарида с белком по п. 1, где указанный полисахарид представляет собой предпочтительно капсульный полисахарид *Neisseria meningitidis*, более предпочтительно капсульный полисахарид *Neisseria meningitidis* серогруппы A, C, Y, W или X.

3. Конъюгат полисахарида с белком по п. 2, где указанный полисахарид представляет собой капсульный полисахарид *Neisseria meningitidis* серогруппы X.

4. Конъюгат полисахарида с белком по п. 1, причем указанный конъюгат является стабильным при комнатных температурах.

25 5. Конъюгат полисахарида с белком по п. 1, причем указанный конъюгат характеризуется постепенным увеличением содержания свободного полисахарида, составляющим меньше чем 10,5%, при хранении при 37°C в течение 28 дней.

30 6. Конъюгат полисахарида с белком по п. 1, причем указанный конъюгат показывает титры в сывороточном бактерицидном тесте в диапазоне от 32-кратного до 128-кратного после двух доз и от 118-кратного до 198-кратного после трех доз по сравнению с контролем носителем.

7. Способ получения конъюгата полисахарида с белком с высокой иммуногенностью, содержащего:

35 - полисахарид, полученный из грамотрицательных бактерий, где грамотрицательной бактерией является *Neisseria meningitidis* (Men);

- белок-носитель, выбранный из следующего: TT (столбнячный анатоксин), DT (дифтерийный анатоксин), CRM197 (нетоксический мутант DT) или OMPV (везикулы из белков наружной мембраны); причем

40 - указанный полисахарид разлагается в диапазоне размеров коэффициента распределения, составляющего $0,38 \pm 0,06$ kD,

- указанный конъюгат полисахарида с белком характеризуется стабильной карбаматной связью -O- (C=O)-N-, и

45 - формула указанного конъюгата представляет собой PS-L1-L2-CR, где PS представляет собой полисахарид, L1 представляет собой карбаматную связь, L2 представляет собой гидразидную связь, и CR представляет собой белок-носитель, где указанная высокая иммуногенность указанного конъюгата, выявленная с помощью ELISA, находится в диапазоне от 100-кратного до 150-кратного увеличения в значении титра после трех доз по сравнению с отрицательным контролем, и где указанный

конъюгат является стабильным и его можно использовать в качестве кандидата вакцины либо отдельно, либо в комбинации;

где указанный способ предусматривает стадии, на которых:

- 5 (a) разлагают капсульный полисахарид до оптимального диапазона размеров коэффициента распределения, составляющего $0,38 \pm 0,06$ kD ,
- (b) растворяют указанный разложенный полисахарид согласно стадии (a) в сильных электролитных солях и обеспечивают правильное смешивание полученной смеси в течение заданного периода времени, причем указанный заданный период времени находится в диапазоне от 30 мин до 90 мин,
- 10 (c) удаляют влагу из полученной смеси, полученной на стадии (b), с помощью известных техник, включая в себя без ограничения лиофилизацию, роторное испарение или вакуумную сушку, для получения высушенного полисахарида,
- (d) растворяют указанный высушенный полисахарид согласно стадии (c) в неводном апротонном растворителе,
- 15 (e) проводят реакцию полученного раствора согласно стадии (d) с заданной концентрацией не содержащего влаги активирующего средства в диапазоне от 5 до 50 молярного избытка, предпочтительно 30 молярный избыток,
- (f) выдерживают полученную смесь согласно стадии (e) в течение заданного периода времени с линкером для получения полисахарида, который представляет собой
- 20 активированный полисахарид, причем указанный заданный период времени находится в диапазоне от 2 ч до 3 ч, где линкер на активированном полисахариде представляет собой карбамат,
- (g) очищают указанный активированный полисахарид согласно стадии (f) с помощью известных способов, включая в себя без ограничения осаждение сульфатом аммония,
- 25 диафильтрацию, гель-фильтрацию и/или их комбинацию, и
- (h) проводят реакцию указанного очищенного активированного полисахарида согласно стадии (g) с активированным белком-носителем, имеющим встроенный линкер, в течение заданного периода времени при pH в диапазоне от pH 6 до pH 10, причем указанный заданный период времени находится в диапазоне от 2 ч до 20 ч, где указанный
- 30 линкер на активированном белке-носителе представляет собой гидразид.
8. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где указанный неводный апротонный растворитель выбран без ограничения из безводного диметилсульфоксида (DMSO), диметилформамида (DMF), N-метилпирролидона (NMP) или диметилацетамида.
- 35 9. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где указанное не содержащее влаги активирующее средство представляет собой N,N'-карбонилдиимидазол (CDI), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (DSC) или N,N'-дисукцинимидилоксалат (DSO).
10. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где указанный разложенный и активированный полисахарид и указанный активированный белок-носитель смешивают в пропорции, находящейся в диапазоне от 0,5:1 до 1:0,5 масс./масс., более предпочтительно 1:1 масс./масс. в буфере с pH 7,0-10,0, предпочтительно pH 9,0.
- 40 11. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 10, где указанный буфер выбирают без ограничения из карбонатного буфера, боратного буфера.
12. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где соотношение полисахарида к белку в указанном конъюгате находится в диапазоне от 0,3 до 1,0 (масс./масс.).
- 45 13. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где указанный конъюгат характеризуется свободным полисахаридом, составляющим меньше чем 10%

в очищенном конъюгате.

14. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где выход конъюгата, полученного с помощью указанного способа конъюгирования, составляет вплоть до 60%.

5 15. Способ получения конъюгата полисахарида с белком по п. 7, где средний выход конъюгата, полученного с помощью указанного способа конъюгирования, составляет $30\pm 5\%$.

10

15

20

25

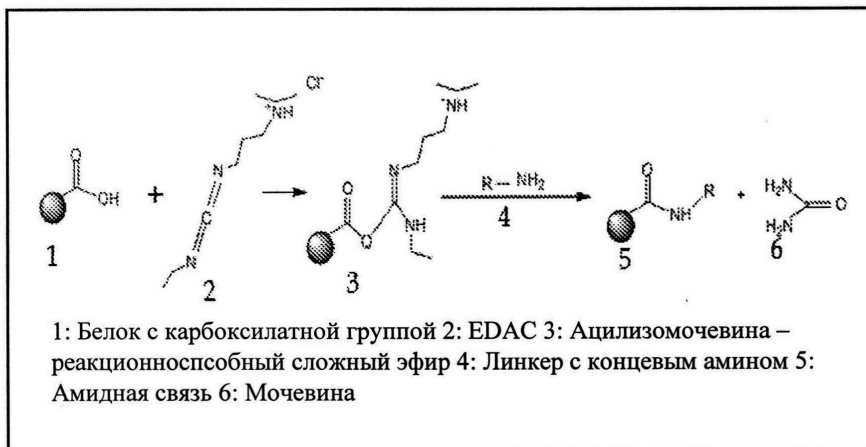
30

35

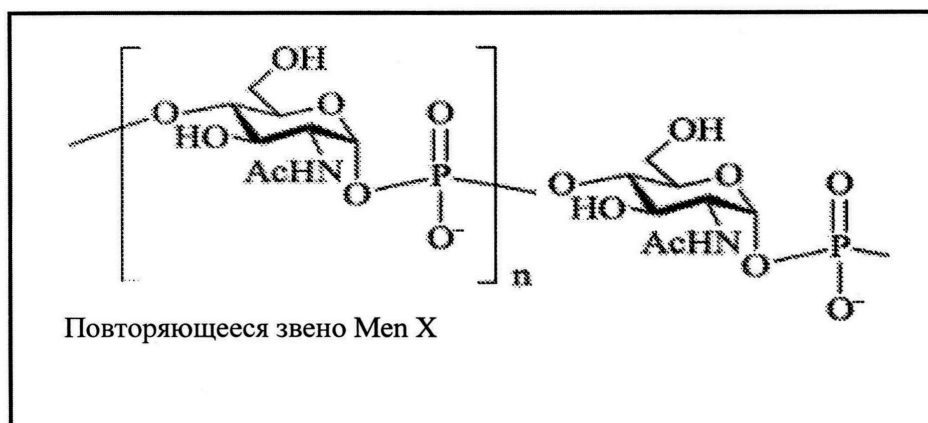
40

45

1

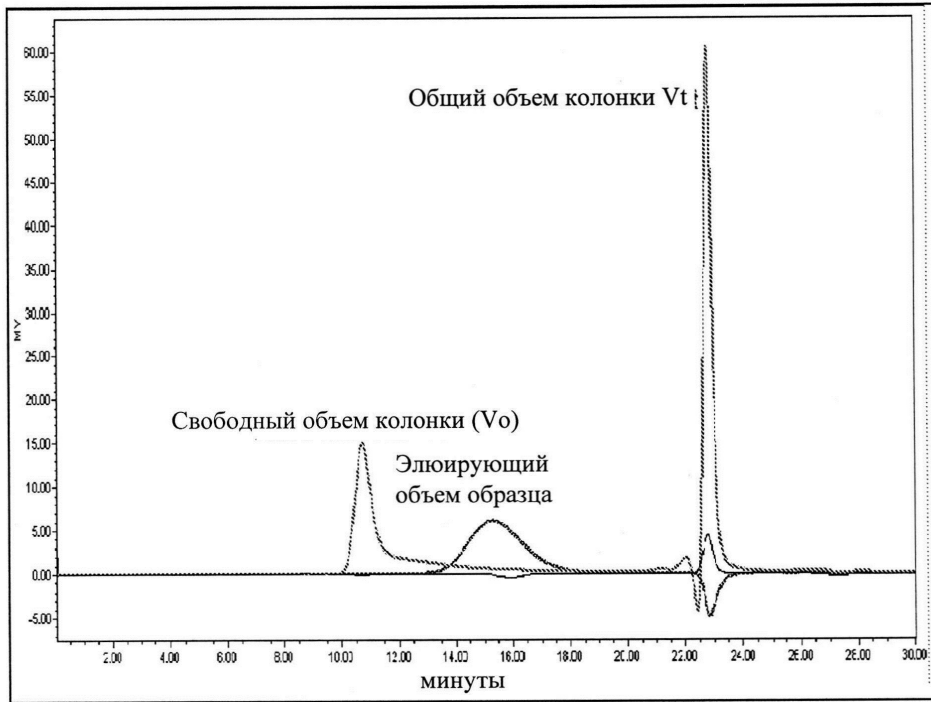


ФИГУРА 1

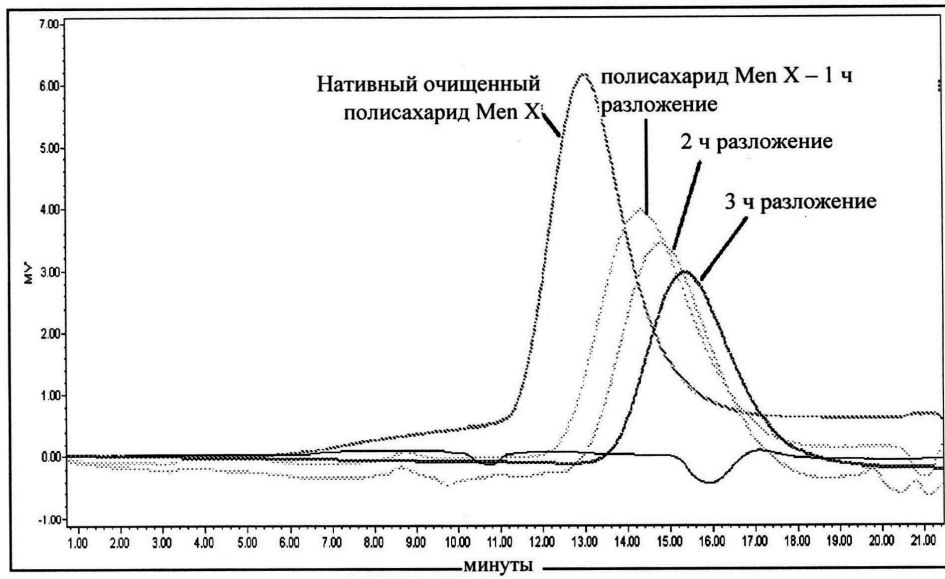


ФИГУРА 2

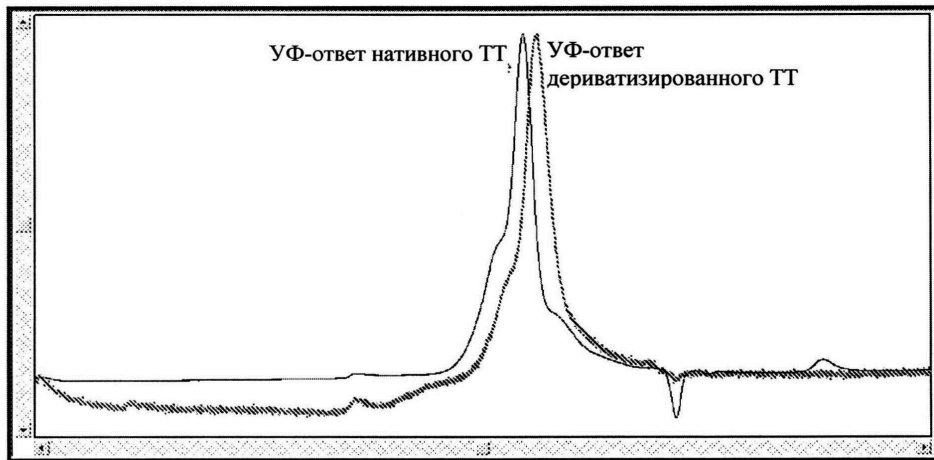
2



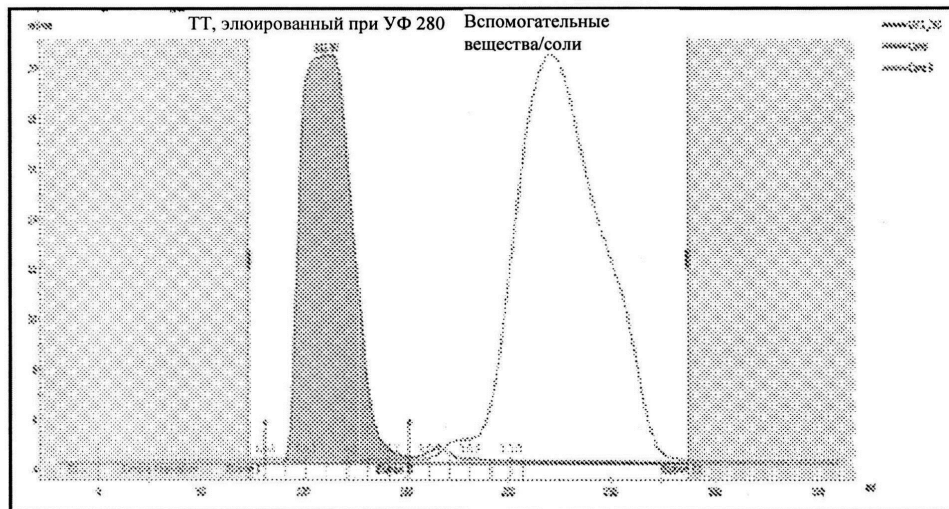
ФИГУРА 3



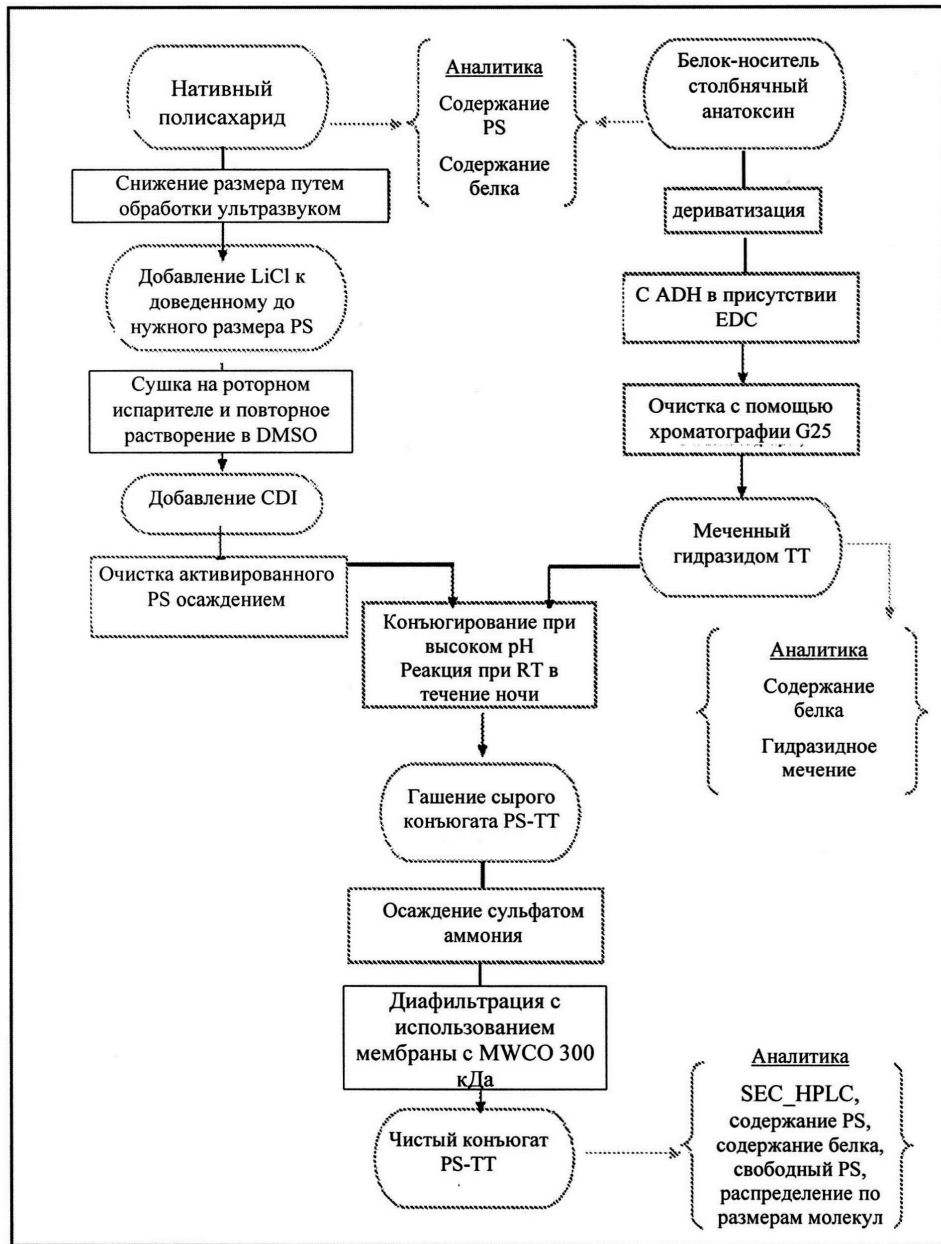
ФИГУРА 4



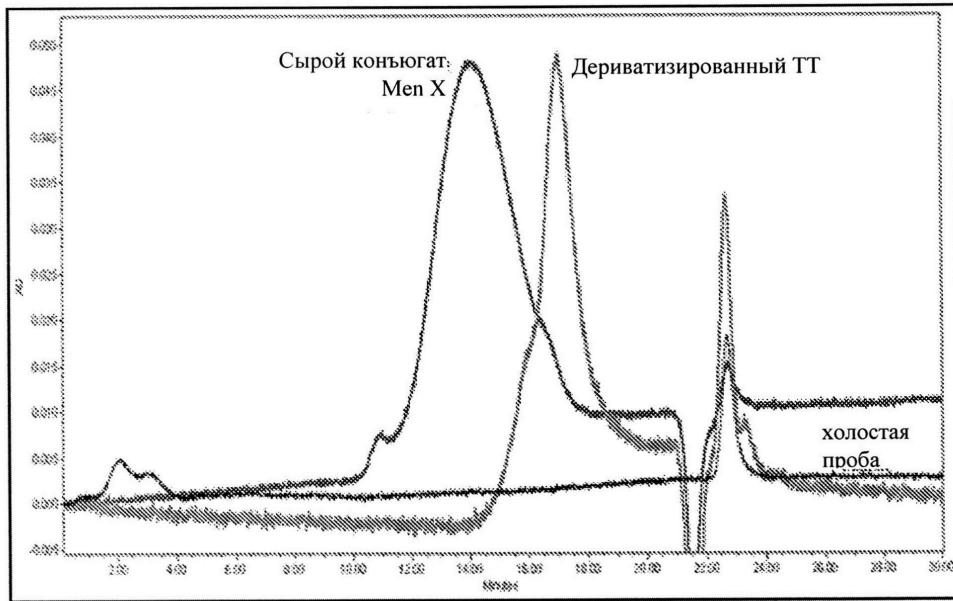
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6



ФИГУРА 7



ФИГУРА 8