



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126385** (13) **C2**
(51) МПК

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2019 04547</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.09.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 29.09.2022</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 201641033563</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.09.2016</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: IN</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 27.08.2019, Бюл.№ 16</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 28.09.2022, Бюл.№ 39</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2017/054237, 29.09.2017</p>	<p>(72) Винахідник(и): Матур Рамеш Венкат (IN), Мантена Нарендер Дев (IN), Сріраман Раджан (IN), Чакка Девіпрасанна (IN), Суредді Сатіям Найдю (IN), Буркі Раджендар (IN), Ганті Срініваса Рао (IN), Датла Махіма (IN)</p> <p>(73) Володілець (володільці): БАЙОЛОДЖИКАЛ І ЛІМІТЕД, 18/1 & 3, Azamabad Hyderabad, Telangana 500 020, India (IN)</p> <p>(74) Представник: Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: LIN H ET AL, "Preparation and immunogenicity of capsular polysaccharide-surface adhesin A (PsaA) conjugate of Streptococcus pneumoniae", IMMUNOBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 215, no. 7, doi:10.1016/J.IMBIO.2009.08.008, ISSN 0171-2985, (20100701), pages 545 - 550, (20091031), XP027066167 EP 2425856 A1, 07.03.2012 ALLANA J SUCHER ET AL., "Prevnar 13, the New 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine", THE ANNALS OF PHARMACOTHERAPY, (20111201), vol. 45, no. 12, pages 1516 - 1524, XP055411056</p>
--	--

(54) КОМПОЗИЦІЇ ПОЛІВАЛЕНТНОЇ ПНЕВМОКОКОВОЇ ВАКЦИНИ, ЩО МІСТЯТЬ КОН'ЮГАТИ ПОЛІСАХАРИД-БІЛОК

(57) Реферат:

Винахід стосується мультивалентної композиції пневмококової вакцини, що містить капсульні пневмококові полісахариди двох або більше серотипів, кожний з яких окремо кон'югований із пневмококовим поверхневим білком А адгезії (PsaA) або з комбінацією PsaA і CRM197 як білками-носіями, де щонайменше капсульні пневмококові полісахариди двох серотипів кон'юговані з PsaA і кон'югати адсорбовані на гелі фосфату алюмінію.

UA 126385 C2

Перехресне посилання на споріднену заявку

За даною заявкою запитується пріоритет тимчасової заявки в Індії № 201641033563, поданої 30 вересня 2016 року і включеної в даний винахід як посилання в повному об'ємі.

Галузь винаходу

5 Даний винахід належить до композицій полівалентної пневмококової вакцини, що містить кон'югований з одним або декількома білками-носіями капсульний пневмококовий полісахарид з одного або більше серотипів *Streptococcus pneumoniae*. Якщо згадані капсульний пневмококовий полісахарид і білок-носії є кон'югованими, то в даному винаході вони мають назву "кон'югати полісахарид-білок".

10 Рівень техніки

Streptococcus pneumoniae ("пневмокок") являє собою грампозитивну бактерію, що викликає інфекційні захворювання, такі як пневмонія, бактеріємія і менінгіт, і захворювання, пов'язані з утворенням колоній, такі як гострий середній отит (наприклад, утворення колоній у середньому вусі). Ці викликані пневмококами хвороби є причиною захворюваності і смертності, особливо в 15 дітей у віці до 2 років і в дорослих старше 60 років. Частота пневмококової пневмонії в США в людей старше 60 років становить від 3 до 8 випадків на 100000 людей. Незважаючи на лікування антибіотиками, в 20 % випадків пневмококова пневмонія призводить до бактеріємії і менінгіту, при цьому сукупний показник смертності становить приблизно 30 %.

Проводилося дослідження білків, таких як пневмолізін і пневмококовий поверхневий білок А (PspA), щодо їх придатності до використання в пневмококових вакцинах як можливих білків-носіїв. Обидва ці білка мають часткову профілактичну ефективність у мишей (див. публікації Paton et al. "Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*." *Infect Immun*. 1983 May; 40(2): 548-552, і McDaniel et al. "PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type" *Infect Immun*. 1991 Jan.; 59(1): 222-228), але також мають 25 недоліки в плані їх використання у вакцинах як імуногенів. Пневмолізін добре зберігається серед пневмококів, але при цьому має токсичні ефекти у своєму нативному стані (Alonso De Veiasco et al. "*Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines." *Microbiol. Rev.* 1995 Dec; 59(4): 591-603). З іншого боку, за серологічними і структурними характеристиками PspA являє собою гетерогенний білок (Crainetal. "Pneumococcal surface protein A) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*." *Infect. Immun*. 1990 Oct; 58(10): 3293-3299). Для використання PspA у складі вакцин буде потрібна множина типів PspA, що ускладнить виготовлення вакцини.

35 Пневмококовий поверхневий білок А адгезії ("PsaA") являє собою багатofункціональний ліпопротеїн, що брав участь в адгезії до клітини-хазяїна і утворенні колоній. Він є високо консервативним поверхневим білком і на 97 % гомологічний відомим серотипам *S.pneumoniae*. PsaA володіє імуногенністю і відомо, що при природньому утворенні пневмококових колоній у носоглотці зростає титр антитіл проти PsaA.

40 Пневмококові вакцини можуть використовуватися для профілактики інфекцій. Сучасні вакцини включають полівалентні пневмококові полісахаридні вакцини (що містять пневмококові полісахариди двох або декількох серотипів) і пневмококові кон'юговані вакцини. Відомо, що профілактична ефективність пневмококової полісахаридної вакцини обумовлена концентрацією антитіл, утворених проти капсульного полісахариду. Пневмококові клітини інкапсульовані з 45 полісахаридом, у результаті чого виникає більше ніж 90 різних серотипів пневмокока. Капсула є основним показником ступеня вірулентності для пневмококів - вона не тільки захищає внутрішню поверхню клітини від комплемент-опосередкованого клітинного лізису, але також володіє слабкою імуногенністю.

Вакцина Pneumovax®23 від компанії Merck являє собою полівалентну пневмококову полісахаридну вакцину, яка містить некон'юговані капсульні полісахариди із пневмококів 23 серотипів, включаючи серотипи 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F і 33F. На додаток до вакцини Pneumovax®23, дозволені до застосування сучасні полівалентні пневмококові полісахаридні вакцини довели свою ефективність для профілактики пневмококової інфекції в дорослих, зокрема, у людей похилого віку і осіб з 55 високим ризиком інфекції. Проте, немовлята і діти молодшого віку проявляють слабку реакцію на цю некон'юговану пневмококову полісахаридну вакцину.

Вакцина Prevnar®-7 являє собою пневмококову кон'юговану вакцину полісахарид-білок і включає сім найбільш часто виділюваних полісахаридних серотипів (наприклад, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F і 23F, кон'югованих з CRM₁₉₇ (білком дифтеріїного токсину)). З початку застосування 60 вакцини Prevnar®-7 у США в 2000 році спостерігається значне зниження інфекційних

пневмококових захворювань (IPD) у дітей. Оскільки в деяких регіонах миру вакцина Prevnar®-7 має обмежене охоплення серотипів, була розроблена і схвалена до застосування 13-валентна кон'югована вакцина Prevenar-13®, що містить тринадцять серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, кон'югованих з CRM₁₉₇.

5 Вакцина Synflorix® являє собою пневмококову вакцину, що включає десять полісахаридних серотипів: кон'юговані з білком D (PD) серотипи 1, 4, 5, 6B, 7, 9, 14, 23F, кон'югований із правцевим анатоксином (TT) серотип 18C і кон'югований з дифтерійним анатоксином (DT) серотип 19F. Кожний із цих полісахаридних серотипів кон'югований з використанням 1-ціано-4-

10 диметиламіно-піридинію тетрафторборату (CDAP) при регульованому рівні рН. Незважаючи на наявність зазначених вакцин, існує потреба в додаткових полівалентних пневмококових вакцинах, що містять альтернативні серотипи полісахаридів і білки-носії, а також у простому і ефективному виробництві таких вакцин.

Пневмококові вакцини описані в додаткових посиланнях. Наприклад, у патенті США № 53608 97 розкритий імуногенний кон'югат, що містить продукт відновного амінування інтактного капсульного полімеру з бактеріального патогена *S. pneumoniae*, що має щонайменше дві карбонільні групи, і бактеріальний токсин або анатоксин, при цьому зазначений кон'югат включає зшитий кон'югат, у якому є прямий ковалентний зв'язок між капсульним полімером і токсином або анатоксином.

20 У патенті США № 5693326 запропонований узагальнений спосіб одержання кон'югованої вакцини, у якому для активації вірусних, грибкових або бактеріальних полісахаридів використовується органічна речовина, яка ціанує, вибрана із групи 1-ціано-4-(диметиламіно)-піридинію тетрафторборату, N-ціанотриетил-амонію тетрафторборату, і р-нітрофенілціанату, для утворення активованого вуглеводу і наступного з'єднання з білком або білком-носієм.

25 У патенті США № 5854416 розкриті амінокислотні послідовності і ДНК-послідовності білків з *S. pneumoniae* розміром 37 кДа, відомі як PsaA (пневмококові поверхневі білки А адгезії), і в патенті США № 7862823 розкрита композиція полівалентної кон'югованої вакцини, що містить пневмококові капсульні полісахариди і щонайменше два різні білки-носії, такі як DT і TT.

30 У патенті США № 7955605 описаний спосіб одержання імуногенного кон'югату, що включає серотип 19A, при цьому активований полісахаридний серотип 19A і білок-носії ресуспендовані в диметилсульфоксиді (ДМСО) з утворенням кон'югату.

У патенті США № 8192746 розкрита композиція 15-валентної пневмококової кон'югованої вакцини полісахарид-білок, що містить капсульні полісахариди серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кон'юговані з CRM₁₉₇.

35 Патент США № 8465749 належить до способу одержання кон'югованої вакцини шляхом взаємодії полісахариду з CDAP і взаємодії білка з гідразином або дигідрозидом адипінової кислоти в певному діапазоні рН.

У патенті США № 8557250 B2 розкритий спосіб, що включає контактування суміші, що складається з множини ціанат-активованих полісахаридів з різною імуногенністю, щонайменше з одним гідрозид-активованим білком.

40 У патентах США № 8808708, 7955605 і в патенті США № 8603484 описана 13-валентна імуногенна композиція, що складається із кон'югатів полісахарид-білок із серотипами 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, і білка-носія CRM₁₉₇.

45 У патентній публікації США № 2009/0017059 A1 розкрита імуногенна композиція, у якій серотипи 19A і 19F кон'юговані з різними бактеріальними анатоксинами, включаючи правцевий анатоксин, дифтерійний анатоксин, коклюшний анатоксин, бактеріальні цитолізани і/або пневмолізін.

50 У патентній публікації США № 2010/0074922 A1 розкрита імуногенна композиція, що містить 10 або більше серотипів, у якій капсульний сахарид серотипу 19F кон'югований з DT, капсульний сахарид серотипу 18C кон'югований із правцевим анатоксином і капсульні сахариди серотипів 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 і 23F кон'юговані з білком D, виділеним з *Haemophilus influenzae*.

55 У патентній публікації США № 2010/0239604 описана імуногенна композиція, що включає полівалентні кон'югати капсульного сахариду *S. pneumoniae* серотипів 19A і 19F, при цьому серотип 19A кон'югований з першим бактеріальним анатоксином і 19F кон'югований із другим бактеріальним анатоксином і капсульні сахариди *S. pneumoniae* серотипів 2-9 кон'юговані з білком D.

60 У патентній публікації США № 2012/321658 A1 розкрита імуногенна композиція, у якій серотипи 1, 3, 19A і 19F пов'язані з білком-носієм (носіями) або прямо, або опосередковано за допомогою хімічної реакції, відмінної від відновного амінування, і один або більше інших сахаридів вибрані із другої групи, що складається із серотипів 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C і 23F, які пов'язані з білком-носієм (носіями) за допомогою відновного амінування.

У патенті IN 140/DEL/2011 розглянута вакцина *S.pneumoniae*, що містить або (а) 7 або більше, або (b) 10 або більше полісахаридів з різних серотипів, кон'югованих щонайменше з 2 або з більшою кількістю білків-носіїв, вибраних із групи, що включає DT, дифтерійний анатоксин, CRM₁₉₇ і правцевий анатоксин.

5 У публікації WO № 2013/191459 A1 розкрита кон'югована 15-валентна композиція, що містить різні серотипи *S.pneumoniae*, отримані з капсульного полісахариду серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, кон'югованого з CRM₁₉₇.

У публікації WO № 2014/092377 A1 розкрита 13-валентна композиція, у якій 12 серотипів вибрано з 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, і серотип, що залишився, 12 або 9N кон'югований з CRM₁₉₇.

10 У публікації WO № 2014/092378 A1 описана імуногенна кон'югована композиція, у якій 12 серотипів вибрано з 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, і один із серотипів, що залишився, 22F або 33F кон'югований з CRM₁₉₇.

15 У документі WO 2016207905 A2 розкрита композиція полівалентної пневмококової кон'югованої вакцини (PCV), що містить: 1) щонайменше 12 капсульних полісахаридів, вибраних із серотипів *S. Pneumoniae* 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, активованих за допомогою CDAP і кон'югованих з білком-носієм CRM₁₉₇, і 2) фармацевтично прийнятний носій, при цьому композиція не містить капсульний полісахарид із серотипу 6A.

20 В опублікованій заявці на китайський патент CN 101590224 описана 14-валентна пневмококова полісахаридно-білкова кон'югована вакцина, що містить серотипи 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F і 23F, кон'юговані з CRM₁₉₇.

В опублікованій заявці на китайський патент CN 103623401 розкрита композиція 14-полівалентного пневмококового капсульного полісахаридно-білкового кон'югату, у якій зазначені 14 різних серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM₁₉₇.

25 В опублікованій заявці на китайський патент CN 103656632 розкрита полівалентна композиція пневмококового капсульного полісахариду, що містить серотип 6A, і щонайменше один додатковий серотип, вибраний із групи, що складається 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F і 33F, кон'югований з CRM₁₉₇.

30 В опублікованій заявці на китайський патент CN 103656631 розглянута полівалентна композиція пневмококового капсульного полісахаридно-білкового кон'югату і спосіб її одержання. Кон'юговану композицію одержують із капсульних полісахаридів пневмокока 24 різних серотипів і білка-носія шляхом ковалентного зв'язку, при цьому 24 різних серотипи 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM₁₉₇.

35 В опублікованій заявці на китайський патент CN 104069488 розкриті полівалентні пневмококові капсульні полісахариди 14 різних серотипів і білок-носії, при цьому 14 серотипів включають кон'юговані з CRM₁₉₇ серотипи 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F.

40 Автори Deborahetal. (1996, том 21, випуск 1, сторінки 17-22) описують значну гомологію PsaA і фімбріальних білків адгезії. Імунізація мишей CBA/CAHnJ XID шляхом введення PsaA з використанням або повного ад'юванту Фрейнда, або повного ад'юванту TiterMax™ створює потужний захист мишей від гетерологічного внутрішньовенного зараження пневмококовим штамом WU2 3-го типу в дозах, що перевищують LD₅₀ до 45 раз.

45 Автори Miyaji E.N. et al. (2001, Vaccine, 20 (5-6): 805-12) описують *S.pneumoniae* як один з найбільш важливих патогенів людини. Автори сконструювали вектори ДНК-вакцини, що містять або повнорозмірний ген PsaA, або усічений ген PspA. Обидві конструкції проявляють транзиторну експресію антигенів у клітинах хребетних і індуковану виражену реакцію антитіл на пневмококові антигени в мишей BALB/c після внутрішньом'язового введення.

50 Автори Wuorimaaetal. (2001, The Paediatric Infectious Disease Journal, том 20 (3), стор. 272-277), проводили дослідження за участю здорових дітей раннього віку з метою оцінки переносимості і імуногенності 11-валентної пневмококової кон'югованої вакцини, у якій як носії використовували і TT, і DT.

55 Автори Gatchalian et al. (2001, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), стендове повідомлення № 4, P1A, стендова сесія 1, Стамбул, Туреччина) приводять результати опсонофагоцитарного аналізу (OPA) у дітей після введення 11-валентної вакцини, без прояву реакції антитіл на серотип 3 на рівні, який можна порівняти з реакціями на інші досліджувані серотипи.

60 Автори Anderson et al. (2003, Vaccine, 21 (13-14): 1554-9) описують порівняльне дослідження чотиривалентних кон'югованих вакцин з кожним з полісахаридних типів 6A, 14, 19F і 23F окремо, у комбінації із правцевим анатоксином або дифтерійним CRM₁₉₇, або із сумішшю з половини доз

полісахаридних типів 6A, 14, 19F і 23F окремо, у комбінації із правцевим анатоксином і дифтерійним CRM₁₉₇.

5 Автори Nurkkaet al. (2004, Ped. Inf. DisJ., 23: 1008-1014) проводили дослідження імуногенності і безпеки 11-валентної вакцини, кон'югованої із пневмококовим білком D, при цьому в серотипі 3 не виявлено примувального ефекту у випадку введення дітям раннього віку, які одержали три дози вакцини з наступною бустерною дозою або такої ж вакцини, або пневмококової полісахаридної вакцини.

10 У зазначених вище посиланнях розкриті, поряд з іншими композиціями, способами тощо полівалентні пневмококові вакцини, що містять полісахариди з одного або більше серотипів, а також кон'югування цих полісахаридів з білками-носіями, такими як CRM₁₉₇, білок D, DT і TT. Враховуючи, що в різних регіонах превалюють різні серотипи, існує потреба в додаткових полівалентних пневмококових вакцинах, що містять нові кон'югати полісахаридів із серотипів з поліпшеною імунною реакцією, а також у простому і ефективному способі їх виробництва.

СУТЬ ВИНАХОДУ

15 У деяких варіантах здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини і зазначена композиція містить два або більше капсульних пневмококових полісахариди із серотипів, і кожний з них окремо кон'югований із пневмококовим поверхневим білком адгезії A (PsaA) або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇ як білками-носіями.

20 В одному варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, яка являє собою композицію 10-валентної, 14-валентної, 15-валентної, 17-валентної, 18-валентної, 19-валентної, 20-валентної, 22-валентної, 23-валентної, 24-валентної або 25-валентної пневмококової вакцини.

25 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди з кожного із серотипів, вибраних із пневмококових серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45.

30 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди з кожного із серотипів, вибраних із пневмококових серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані із пневмококовим поверхневим білком A адгезії (PsaA) як білком-носієм.

35 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів, вибраних з 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані із пневмококовим поверхневим білком адгезії A (PsaA) або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇ як білками-носіями.

40 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів, вибраних з 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, при цьому щонайменше 3 пневмококових полісахариди кон'юговані із пневмококовим поверхневим білком A адгезії (PsaA).

45 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 3, 6A, 6B, кон'юговані із пневмококовим поверхневим білком A адгезії (PsaA).

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить щонайменше 10 пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, і білки-носії включають PsaA або комбінацію PsaA і CRM₁₉₇.

50 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить щонайменше 14 пневмококових полісахаридних кон'югатів.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить щонайменше 17 пневмококових полісахаридних кон'югатів.

55 В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить щонайменше 19 пневмококових полісахаридних кон'югатів.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить щонайменше 20 пневмококових полісахаридних кон'югатів.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить щонайменше 22 пневмококових полісахаридних кон'югатів.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 17-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B кон'югований з CRM₁₉₇.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 20-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B, кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45 кон'югований з CRM₁₉₇.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 22-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'югований з CRM₁₉₇.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 22-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому серотипи 1, 3, 6, 10, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35B і 38 кон'юговані з PsaA, і серотипи 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F і 33F кон'юговані з CRM₁₉₇.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 24-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'югований з CRM₁₉₇.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 24-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9B, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому серотипи 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A, 15B, 16F, 22F, 34, 35 і 38 кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F і 33F кон'югований з CRM₁₉₇.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, отриманої у вигляді стандартної лікарської форми.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, отриманої у вигляді стандартної лікарської форми, при цьому стандартна лікарська форма містить від приблизно 0,1 мкг до приблизно 50 мкг кожного полісахариду, від приблизно 0,1 мкг до приблизно 10 мкг або від приблизно 1 мкг до приблизно 5 мкг кожного полісахариду, при цьому кожний полісахарид окремо кон'югований з білком-носієм, і кількість білка-носія становить від приблизно 1,5 мкг до приблизно 5 мкг.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить фармацевтично прийнятні речовини, такі як розріджувач, буфер, консервант, стабілізатор, ад'ювант і/або ліофілізувальний ексципієнт.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, отриманої у вигляді стандартної лікарської форми, яка поставляється як флакон з однічною дозою, флакон з декількома дозами або попередньо заповнений шприц.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини у вигляді разової дози 0,5 мл, і зазначена разова доза містить: один або більше пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 до 4,4 мкг; PsaA у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мкг, кон'югований з кожним з одного або більше пневмококових полісахаридів; CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мкг, кон'югований з кожним з одного або більше пневмококових полісахаридів; ад'ювант фосфат алюмінію в кількості від приблизно 0,2 мг до приблизно 1 мг; і ексципієнт.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 13-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить кожний полісахарид у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 25 мкг до приблизно 30 мкг, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 14-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція
5 отримана у вигляді стерильної рідини, що містить кожний полісахарид у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 30 мкг до приблизно 35 мкг, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 14-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з PsaA або комбінацією PsaA і CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція
10 отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 до 4,4 мкг кожного полісахариду, від приблизно 30 мкг до приблизно 35 мкг PsaA і CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 15-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, у якій щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або
20 більше серотипів з 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'югований з CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг кожного полісахариду, від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг PsaA, від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 17-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B, у якій щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і
30 один або більше серотипів з 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B кон'юговані з CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг кожного полісахариду, від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг PsaA, від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 20-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, у якій щонайменше серотипи 3, 6A і 6B
40 кон'юговані з PsaA, і один або більше серотипів з 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45 кон'юговані з CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг кожного полісахариду, від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг PsaA, від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 22-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, в якій щонайменше серотипи 3, 6A і 6B
50 кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'юговані з CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг кожного з полісахаридів, від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг PsaA, від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 22-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, в якій серотипи 1, 3, 6, 10, 12F, 15A 15B, 22F, 34, 35B, 38 кон'юговані з PsaA, і серотипи 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F і 33F
60 кон'юговані з CRM₁₉₇, при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно

0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг кожного полісахариду, від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг PsaA, від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до 24-валентної пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, у якій щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів з 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'юговані з CRM₁₉₇? при цьому доза композиції пневмококової вакцини становить приблизно 0,5 мл, і композиція отримана у вигляді стерильної рідини, що містить від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг кожного полісахариду, від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг PsaA, від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг CRM₁₉₇, хлорид натрію і L-гістидиновий буфер, і елементарний алюміній у кількості приблизно 0,125 мг у вигляді приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1: хроматограма ексклюзивної ВЕРХ показує кінетику реакції кон'югування серотипу 7F (A), серотипу 14 (B), серотипу 19F (C), серотипу 3 (D), серотипу 6A (E) і серотипу 6B (F).

Фігура 2: хроматограма ексклюзивної ВЕРХ показує кінетику реакції кон'югування серотипу 5 (A), серотипу 9V (B), серотипу 18C (C), серотипу 3 (D), серотипу 6A (E) і серотипу 6B (F).

Фігура 3: Імунна відповідь на різні серотипи в кроликів, імунізованих з композицією за даним винаходом, як описано в прикладі 3.

Фігура 4: Імунна відповідь на різні серотипи в кроликів, імунізованих вакциною Prevna[®] 13.

Фігура 5: Імунна відповідь на різні серотипи в кроликів, імунізованих іншою композицією даного винаходу, описаної в прикладі 4.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

В одному варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди, у якій один або більше пневмококових полісахаридів являють собою нативні пневмококові полісахариди.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди, у якій один або більше пневмококових полісахаридів фрагментовані, і середня молекулярна маса кожного із фрагментованих пневмококових полісахаридів менша ніж у нативного пневмококового полісахариду.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди, у якій кожний із пневмококових полісахаридів перед кон'югуванням з білком-носієм активований за допомогою 1-ціано-4-диметиламіно-піридинію тетрафторборату (CDAP) з утворенням ефіру ціанової кислоти.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди, у якій один або більше пневмококових полісахаридів приєднані до аміногрупи білка-носія прямо або приєднані до аміногрупи за допомогою спейсеру.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди, у якому спейсером є цистамін, цистеамін, гександіамін, дигідрозид адипінової кислоти (ADH), EDAC або EDC (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід).

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди з одного або більше серотипів і білок-носії, при цьому білок-носії PsaA являє собою модифікований PsaA і не містить гідрофобний N-кінцевий лідерний пептид дикого типу.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди з одного або більше серотипів і білок-носії, при цьому білок-носії PsaA містить 290 амінокислот.

Даний винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить два або більше серотипів капсульних пневмококових полісахаридів, кожний з яких окремо кон'югований з білком-носієм, і в даному винаході це називається кон'югатами полісахарид-білок і/або кон'югатами. Якщо ці кон'югати включені в композицію пневмококової вакцини за винаходом, пневмококова вакцина є полівалентною вакциною з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок (також називаної у винаході полівалентною кон'югованою вакциною, кон'югованою вакциною і/або полісахарид-білковою кон'югованою вакциною). На додаток до полівалентної кон'югованої вакцини, даний винахід належить до способу одержання і/або введення такої вакцини пацієнтам.

У деяких варіантах здійснення композиція пневмококової вакцини є полівалентною імуногенною композицією, що містить один або більше кон'югатів. Наприклад, кон'югати можуть включати два або більше пневмококових полісахаридів, і кожний із пневмококових полісахаридів вибраний із пневмококових полісахаридів, що належать до серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45.

У деяких варіантах здійснення композиція пневмококової вакцини є полівалентною і включає п'ять пневмококових полісахаридів (5-валентна), десять пневмококових полісахаридів (10-валентна), одинадцять пневмококових полісахаридів (11-валентна), дванадцять пневмококових полісахаридів (12-валентна), тринадцять пневмококових полісахаридів (13-валентна), чотирнадцять пневмококових полісахаридів (14-валентна), п'ятнадцять пневмококових полісахаридів (15-валентна), шістнадцять пневмококових полісахаридів (16-валентна), сімнадцять пневмококових полісахаридів (17-валентна), вісімнадцять пневмококових полісахаридів (18-валентна), дев'ятнадцять пневмококових полісахаридів (19-валентна), двадцять пневмококових полісахаридів (20-валентна), двадцять один пневмококовий полісахарид (21-валентна), двадцять два пневмококові полісахариди (22-валентна), двадцять три пневмококові полісахариди (23-валентна), двадцять чотири пневмококові полісахариди (24-валентна), двадцять п'ять пневмококових полісахаридів (25-валентна), двадцять шість пневмококових полісахаридів (26-валентна), двадцять сім пневмококових полісахаридів (27-валентна), двадцять вісім пневмококових полісахаридів (28-валентна), двадцять дев'ять пневмококових полісахаридів (29-валентна) або тридцять пневмококових полісахаридів (30-валентна). В інших варіантах здійснення композиція пневмококової вакцини являє собою композицію 10-валентної, 14-валентної, 15-валентної, 17-валентної, 18-валентної, 19-валентної, 20-валентної, 22-валентної, 23-валентної, 24-валентної або 25-валентної пневмококової вакцини.

Неочікувано виявлено, що композиції полівалентних пневмококових кон'югованих вакцин згідно із даним винаходом дають поліпшену імунну відповідь у порівнянні з полівалентними пневмококовими вакцинами, що містять пневмококові полісахариди, не кон'юговані з білками-носіями. Більш конкретно, композиції полівалентних пневмококових кон'югованих вакцин за даним винаходом, на диво, виявилися найбільш ефективними, коли пневмококові полісахариди з одного або більше серотипів *Streptococcus pneumoniae* були кон'юговані з PsaA і/або CRM₁₉₇.

Білки-носії являють собою нетоксичні і не реактогенні білки, які можуть бути отримані в достатній кількості і з достатнім ступенем чистоти. У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до композиції пневмококової кон'югованої вакцини, що містить один або більше білків-носіїв, кон'югованих з одним або декількома полісахаридами *S.pneumoniae* (які в даному винаході називаються "пневмококовим полісахаридом"). Шляхом кон'югування пневмококового полісахариду з білком-носієм збільшується імуногенність цього пневмококового полісахариду в порівнянні з некон'югованим пневмококовим полісахаридом. Підходящі для даного винаходу білки-носії повинні бути придатні для стандартних методик кон'югування.

Білок CRM₁₉₇ являє собою варіант дифтерійного токсину і є нетоксичним для використання у вакцинах. Можна виділяти CRM₁₉₇ з культури штаму C7 (β197) *Corynebacterium diphtheriae*, вирощеної в середовищі на основі казамінокислот і дріжджового екстракту. Можна одержувати CRM₁₉₇С допомогою рекомбінантної технології відповідно до способів, описаних в патенті США № 5614382. Як альтернатива, CRM₁₉₇ можуть бути отримані рекомбінантно відповідно до відомих у літературі способів, або відповідно до способів, описаних в опублікованій заявці РСТ WO 2016/079755. Можна виконувати очищення CRM₁₉₇ шляхом ультрафільтрації, преципітації сульфатом амонію, іонообмінної хроматографії або іншими способами, добре відомими в даній галузі.

У деяких варіантах здійснення пневмококові полісахариди згідно із даним винаходом кон'юговані з одним або декількома білками-носіями. Наприклад, кожний окремо пневмококовий полісахарид кон'югований з білком-носієм. В інших варіантах здійснення пневмококовий полісахарид, у кількості більше одного, кон'югований з білком-носієм. Наприклад, два пневмококові полісахариди, три пневмококові полісахариди, чотири пневмококові полісахариди, п'ять пневмококових полісахаридів, шість пневмококових полісахаридів, сім пневмококових полісахаридів, вісім пневмококових полісахаридів, дев'ять пневмококових полісахаридів або десять пневмококових полісахаридів кон'юговані з білком-носієм. У деяких варіантах здійснення пневмококовий полісахарид кон'югований більш ніж з одним білком-носієм. Наприклад, пневмококовий полісахарид кон'югований з одним білком-носієм, двома білками-носіями, трьома білками-носіями і/або чотирма білками-носіями.

У деяких варіантах здійснення винаходу білок-носії являє собою PsaA. У додаткових варіантах здійснення використовується комбінація білків-носіїв, яка включає два або більше білків-носіїв, таких як PsaA і CRM₁₉₇, кожний з яких окремо кон'югований з кожним із пневмококових полісахаридів. В інших варіантах здійснення білком-носієм є два білки-носія, що

5 включають PsaA і CRM₁₉₇.

У деяких варіантах здійснення білок-носії вибраний з одного або більше наступних білків-носіїв: PsaA, CRM₁₉₇, інактивовані бактеріальні токсини, такі як правцевий анатоксин, коклюшний анатоксин, холерний анатоксин, екзотоксин А із синьогнійної палички, бактеріальні білки зовнішньої мембрани, такі як білковий комплекс зовнішньої мембрани (ОМРС), порини,

10 трансферин-зв'язувальні білки, пневмолізін, PspA, пептидаза С5а зі стрептокока групи А або групи В, або білок D з Haemophilus influenzae, овальбумін, гемоціанін, (гемоціанін лімфи равлика KLH), бичачий сироватковий альбумін (БСА) і очищений білковий дериват туберкуліну (PPD).

Крім того, один або більше кон'югатів може включати нативні білки-носії (наприклад, дикого

15 типу), і/або один або більше кон'югатів може включати білки-носії, модифіковані з їх нативної форми в ненативну форму (наприклад, білки, позбавлені однієї або декількох амінокислот генно-інженерним способом). У деяких варіантах здійснення білки-носії можна конструювати з видаленням одного або більше білкових доменів, таких як лідерний пептид, або з видаленням інших доменів, які можуть мати небажані для кон'югатів згідно із даним винаходом властивості.

Наприклад, PsaA може являти собою білок-носії з 290 амінокислот, сконструйований з

20 відсутністю гідрофобного N-кінцевого лідерного пептиду, що має індекс гідропатії 2,052.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до вакцинної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 6С, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11,

25 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 16F, 17F, 18С, 19F, 19А, 20А, 20В, 22F, 23А, 23В, 23F, 24В, 24F, 31, 33F, 34, 35В, 35F, 38, 39 і 45. Кожний з вибраних пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з білком-носієм PsaA, або перша частина з вибраних пневмококових полісахаридів кон'югована з PsaA, і друга частина з вибраних пневмококових полісахаридів кон'югована з CRM₁₉₇. У будь-якому із цих варіантів здійснення вакцинна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок являє собою імуногенну полівалентну композицію з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, таку як 10-валентна, 13-валентна, 14-валентна, 15-валентна, 17-валентна, 18-валентна, 19-валентна, 20-валентна, 22-валентна, 23-валентна, 24-валентна або 25-

30 валентна імуногенна полівалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до вакцинної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 6С, 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11,

35 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 16F, 17F, 18С, 19F, 19А, 20А, 20В, 22F, 23А, 23В, 23F, 24В, 24F, 31, 33F, 34, 35В, 35F, 38, 39 і 45. Кожний з вибраних пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з білком-носієм PsaA. В інших варіантах здійснення перша частина з вибраних пневмококових полісахаридів кон'югована з PsaA, і друга частина з вибраних пневмококових полісахаридів кон'югована з CRM₁₉₇. У будь-якому із цих варіантів здійснення вакцинна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок являє собою імуногенну полівалентну композицію з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, таку як 10-валентна, 13-валентна, 14-валентна, 15-валентна, 17-валентна, 18-валентна, 19-валентна, 20-валентна, 22-валентна, 23-валентна,

40 24-валентна або 25-валентна імуногенна полівалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

Ще в одному варіанті здійснення даний винахід належить до вакцинної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6А, 6В, 6С,

50 7F, 8, 9N, 9V, 10А, 11, 12F, 14, 15А, 15В, 15С, 16F, 17F, 18С, 19F, 19А, 20А, 20В, 22F, 23А, 23В, 23F, 24В, 24F, 31, 33F, 34, 35В, 35F, 38, 39 і 45. У цих варіантах здійснення щонайменше три з вибраних пневмококових полісахаридів окремо кон'юговані з білком-носієм PsaA, і кожний з додаткових пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з білком-носієм CRM₁₉₇. У будь-якому із цих варіантів здійснення вакцинна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок являє собою імуногенну полівалентну композицію з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, таку як 10-валентна, 13-валентна, 14-валентна, 15-валентна, 17-валентна, 18-валентна, 19-валентна, 20-валентна, 22-валентна, 23-валентна, 24-валентна або 25-

55 валентна імуногенна полівалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

Ще в одному варіанті здійснення даний винахід належить до вакцинної композиції з

60 кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди

(наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45. У цих варіантах здійснення щонайменше перші п'ять із вибраних пневмококових полісахаридів, кожний окремо, кон'юговані з білком-носієм PsaA, і щонайменше другі п'ять полісахаридів, кожний окремо, кон'юговані з білком-носієм CRM₁₉₇. Перші п'ять із вибраних пневмококових полісахаридів вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, і другі п'ять полісахаридів вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45. В інших варіантах здійснення перша частина з вибраних пневмококових полісахаридів кон'югована з PsaA, і друга частина з вибраних пневмококових полісахаридів кон'югована з CRM₁₉₇. У будь-якому із цих варіантів здійснення вакцинна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок являє собою імуногенну полівалентну композицію з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, таку як 10-валентна, 14-валентна, 15-валентна, 17-валентна, 18-валентна, 19-валентна, 20-валентна, 22-валентна, 23-валентна, 24-валентна або 25-валентна імуногенна полівалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

Ще в одному варіанті здійснення даний винахід належить до композиції 14-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить щонайменше три пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з PsaA. Крім того, композиція 14-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок додатково містить щонайменше п'ять пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з CRM₁₉₇.

Ще в одному варіанті здійснення даний винахід належить до композиції 15-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить щонайменше три пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з PsaA. Крім того, композиція 15-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок додатково містить щонайменше п'ять пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з CRM₁₉₇.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до композиції 17-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить щонайменше три пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з PsaA. Крім того, композиція 17-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок додатково містить щонайменше п'ять пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з CRM₁₉₇.

В інших варіантах здійснення даний винахід належить до композиції 20-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить щонайменше три пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з PsaA. Крім того, композиція 20-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок додатково містить щонайменше п'ять пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з CRM₁₉₇.

У додаткових варіантах здійснення даний винахід належить до композиції 22-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить щонайменше п'ять пневмококових полісахаридів (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, які кон'юговані з CRM₁₉₇.

В інших варіантах здійснення даних винахід належить до композиції 22-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38. Серотипи 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A 15B, 22F, 34, 35 і 38 з вибраних серотипів кон'юговані з PsaA, і кожний із серотипів 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19, 19F, 23F і 33F кон'югований з CRM₁₉₇.

В інших варіантах здійснення даних винахід належить до композиції 24-валентної вакцини з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди (наприклад, капсульні пневмококові полісахариди), вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38. Серотипи 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A 15B, 16F, 22F, 34, 35 і 38 з вибраних серотипів кон'юговані з PsaA, і кожний із серотипів 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F і 33F кон'югований з CRM₁₉₇.

Композиції кон'югатів пневмококовий полісахарид-білок за даним винаходом додатково містять одну або декілька з наступних речовин: фармацевтично прийнятний носій, фармацевтично прийнятний розріджувач, буфер, консервант, стабілізатор, ад'ювант і/або ліофілізувальний ексципієнт. Наприклад, композиції кон'югатів пневмококовий полісахарид-білок за даним винаходом можуть містити фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах здійснення композиції кон'югатів пневмококовий полісахарид-білок за даним винаходом містять щонайменше 10 пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45. Кожний з вибраних серотипів окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇, і з фармацевтично прийнятним носієм.

У деяких варіантах здійснення пневмококові полісахариди, використовувані в композиціях за даним винаходом, можуть бути виділені з одного або більше мікроорганізмів (наприклад, із пневмококів) відповідно до загальноприйнятих способів. Наприклад, пневмококові полісахариди можуть бути отримані відповідно до відомих методик. Крім того, очищення пневмококових полісахаридів можна виконувати відповідно до описаного в публікації PCT WO 2016/174683 A1 способом.

Виділені пневмококові полісахариди можуть бути очищені відповідно до загальноприйнятих способів і можуть бути використані у своїй нативній формі. В інших варіантах здійснення виділені і очищені пневмококові полісахариди можуть бути фрагментовані для одержання одного або більше фрагментів пневмококових полісахаридів, і середня молекулярна маса кожного із фрагментів пневмококового полісахариду менша, ніж середня молекулярна маса виділених і очищених пневмококових полісахаридів.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди, і розмір молекул кожного із пневмококових полісахаридів перебуває в діапазоні від приблизно 150 кДа до 450 кДа.

В іншому варіанті здійснення даних винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить один або більше серотипів капсульних пневмококових полісахаридів, кожний з яких окремо кон'югований з білком-носієм, наприклад, у вигляді кон'югату полісахарид-білок, при цьому кожний кон'югат полісахарид-білок має молекулярну масу від приблизно 1500 кДа до приблизно 15000 кДа.

В інших варіантах здійснення виділені і очищені пневмококові полісахариди перед кон'югуванням з одним або декількома білками-носіями можуть бути активовані. Наприклад, виділені і очищені пневмококові полісахариди можуть бути активовані (наприклад, шляхом хімічної реакції) перед кон'югуванням з одним або декількома білками-носіями. Кожний з активованих пневмококових полісахаридів може бути окремо кон'югований з білком-носієм, з утворенням кон'югату полісахарид-білок (наприклад, глікокон'югату). В інших варіантах здійснення один або більше із активованих пневмококових полісахаридів можуть бути кон'юговані з окремим білком-носієм, і/або активований пневмококовий полісахарид може бути кон'югований з окремим білком-носієм. Кон'югати можуть бути отримані відомими способами.

У деяких варіантах здійснення пневмококові полісахариди можуть бути активовані хімічним способом, а потім кон'юговані з білками-носіями відповідно до відомих способів, наприклад, способами, описаними в патентах США №№ 4365170, 4673574 і 4902506. Наприклад, пневмококові полісахариди можуть бути активовані шляхом окиснення кінцевої гідроксильної групи до альдегіду за допомогою окиснювача, такого як періодат (наприклад, періодат натрію, періодат калію або періодична кислота), шляхом випадкового окисного розщеплення однієї або декількох віцинальних гідроксильних груп вуглеводів і утворення однієї або декількох реактогенних альдегідних груп.

Пневмококові полісахариди можуть бути також активовані за допомогою CDAP (1-ціано-4-диметиламіно-пирідиній тетрафторборату), з наступним кон'югуванням з одним або декількома білками-носіями, такими як PsaA, CRM₁₉₇, PspA або з їх комбінацією. В інших варіантах здійснення пневмококові полісахариди, активовані за допомогою CDAP для утворення

5 ціанатного ефіру, можуть бути прямо кон'юговані з одним або декількома білками-носіями, або кон'юговані за допомогою спейсеру (наприклад, лінкеру). Спейсер може приєднуватися до аміногрупи на білку-носії. У деяких варіантах здійснення спейсером можуть бути цистамін або цистеамін, які утворюють тіолований полісахарид, здатний з'єднуватися з білком-носієм за допомогою зв'язку з малеїмід-активованим білком-носієм (наприклад, за допомогою GMBS (N-(g-малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімідний ефір) або з гало-ацетильованим білком-носієм

10 (наприклад, з використанням йодацетіміду, етил-йодацетимаду HC1, SIAB (N-сукцинімідил-(4-йодацетат)-амінобензоат), SIA (N-сукцинімідил-N-йодацетат), SBAP(N-сукцинімідил-3-(бромацетатамідо)пропіонат) і/або N-сукцинімідил-бромацетату. В інших варіантах здійснення ціанатний ефір приєднується за допомогою гександіаміну або дигідразиду адипінової кислоти

15 (ADH), і аміно-дериватизований сахарид кон'югується з білком-носієм за допомогою хімічної реакції з карбодіімідом (наприклад, EDAC або EDC) через карбоксильну групу на білку-носії. Такі кон'югати описані в опублікованій міжнародній патентній заявці № WO 93/15760, опублікованій міжнародній патентній заявці № WO 95/08348, опублікованій міжнародній патентній заявці № WO 96/29094 і в літературі, див. Chu et al., 1983, Infect. Immunity 40:245-256.

20 Інші підходящі способи активації і/або приєднання, призначені для використання з полісахарид-білковими кон'югатами і вакцинними композиціями за винаходом, включають способи з використанням карбодіімідів, гідразидів, активних складних ефірів, норборану, р-нітробензойної кислоти, N-гідроксисукциніміду, S-NHS, EDC, TSTU і інші способи, описані в опублікованій міжнародній патентній заявці WO 98/42721. Наприклад, для кон'югування можна задіяти карбонільний лінкер, який може бути отриманий шляхом реакції вільної гідроксильної

25 групи сахариду з GDI (1,1'-карбонілдіімідазол) (див. Bethell et al. J. Biol. Chem. 1979, 254: 2572-4; Hearn et al. J. Chromatogr. 1981, 218: 509-18) і наступної взаємодії з білком з утворенням карбаматного зв'язку. У деяких варіантах здійснення можна застосовувати відновлення аномерного кінця до первинної гідроксильної групи, необов'язково введення захисту/зняття захисту первинної гідроксильної групи, взаємодія первинної гідроксильної групи з CDI з утворенням CDI-карбаматної проміжної сполуки і приєднання CDI-карбаматної проміжної сполуки до аміногрупи на білку.

Наприклад, інші підходящі способи активації і/або приєднання, використовувані для вакцинних композицій з полісахаридно-білковими кон'югатами за винаходом, включають

35 наступний спосіб: сортовані за розміром пневмококові полісахариди (наприклад, приблизно 6 мл сортованих за розміром полісахаридів у концентрації приблизно 10 мг/мл) і CDAP (наприклад, приблизно 100 мг/мл в ацетонітрилі (вага/об'єм)) можна змішувати в скляній пробірці в співвідношенні приблизно 1 приблизно до 1 (наприклад, збовтуванням протягом приблизно 1 хвилини). При необхідності можна регулювати рівень рН розчину полісахариду

40 (наприклад, до приблизно 9,25 за допомогою приблизно 0,2 М триетиламіну, зі збовтуванням протягом 3 хвилин при кімнатній температурі). Додатково, до активованих пневмококових полісахаридів можна повільно додавати PsaA (наприклад, приблизно 4 мл розчину в концентрації приблизно 15 мг/мл) (наприклад, у співвідношенні приблизно 1 приблизно до 1 (полісахарид: білок-носії)). Можна регулювати рівень рН реакції (наприклад, до приблизно 9,05 за допомогою 0,2 М триметиламіну), і можна продовжувати реакцію (наприклад, шляхом збовтування протягом 5 годин при кімнатній температурі). Реакцію суміші можна пригнічувати (наприклад, шляхом додавання гліцину в надлишковій концентрації).

У деяких варіантах здійснення реакційну суміш можна піддавати діафільтрації з використанням мембрани (наприклад, мембрани 100 ДО MWCO з відсіканням за молекулярною масою), і можна очищати способом гель-хроматографії. Після діафільтрації і очищення можна аналізувати фракції шляхом ексклюзійної хроматографії з детекцією багатокутового лазерного розсіювання (SEC-MALLS) і способом з використанням антрону. Після аналізу фракції, що містять кон'югати, можна поєднувати і фільтрувати в стерильних умовах (наприклад, за допомогою 0,2 мкм фільтрів).

55 Після кон'югування пневмококових полісахаридів з одним або декількома білками-носіями кон'югати полісахарид-білок можна піддавати очищенню різними способами (наприклад, збагачувати в плані кількості кон'югату полісахарид-білок). Ці способи включають без обмеження методики концентрації/діафільтрації, осадження/елюювання, колонкову хроматографію і глибинну фільтрацію. Наприклад, після очищення кон'югатів із цих кон'югатів

можна складати композиції кон'югованих пневмококових полісахаридів і білків за винаходом, які можна застосовувати як вакцини.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання кон'югату полісахарид-білок для композиції пневмококової вакцини, описаної у винаході, і зазначений спосіб додатково включає введення кон'югату пневмококовий полісахарид-білок до складу вакцинної композиції, що включає ад'ювант, буфер і ексципієнт.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання кон'югату полісахарид-білок для композиції пневмококової вакцини, описаної у винаході, при цьому ад'ювант являє собою фосфат алюмінію.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу лікування пацієнта, що потребує цього, і зазначений спосіб включає введення описаної у винаході композиції пневмококової вакцини пацієнтові, що потребує цього.

У деяких варіантах здійснення пацієнт має захворювання, обумовлене streptococcus pneumoniae, наприклад, інвазивну пневмококову інфекцію (IPD).

В одному варіанті здійснення пацієнтом є людина, наприклад, немовля (у віці приблизно менше 1 року), дитина раннього віку (від приблизно 12 місяців до приблизно 24 місяців), дитина молодшого дошкільного віку (від приблизно 2-х років до приблизно 5 років), дитина старшого дошкільного і молодшого шкільного віку (від приблизно 5 років до приблизно 13 років), підліток (від приблизно 13 років до приблизно 18 років), доросла людина (від приблизно 18 років до приблизно 65 років) або людина старшого віку (старше 65 років).

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу індукції імунної відповіді на капсульний полісахаридний кон'югат S. pneumoniae, і зазначений спосіб включає введення пацієнтові імунологічно ефективної кількості композиції пневмококової вакцини, описаної у винаході.

В одному варіанті здійснення спосіб індукції імунної відповіді на капсульний полісахаридний кон'югат S. pneumoniae включає введення пацієнтові описаної у винаході композиції пневмококової вакцини системним, підшкірним шляхом і/або введення в слизову оболонку.

У деяких варіантах здійснення кількість кожного кон'югату в дозі вакцинних композицій за винаходом являє собою кількість, якої досить для індукції імунопротективної відповіді, а саме, імунопротективної відповіді без значних небажаних ефектів. Кількість кожного кон'югату можна варіювати залежно від пневмококового серотипу, разом з тим, кожна доза вакцинних композицій може містити від приблизно 0,1 мкг до приблизно 50 мкг кожного із пневмококових полісахаридів, від приблизно 0,1 мкг до приблизно 10 мкг, або від приблизно 1 мкг до приблизно 5 мкг кожного із пневмококових полісахаридів, кон'югованих з кожним білком-носієм, і містити білок-носії у кількості від приблизно 1,5 мкг до приблизно 5 мкг.

В іншому варіанті здійснення даний винахід належить до композиції пневмококової вакцини, що містить пневмококові полісахариди і білки-носії, і в такій композиції пневмококової вакцини процентне відношення білка до полісахариду (білок/ПС) становить від приблизно 0,5 до приблизно 2,0, і переважне співвідношення білок/ПС становить від 0,7 до 1,2.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до вакцинних композицій з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, які містять пневмококові полісахариди з молекулярною масою в діапазоні від приблизно 100 кДа до приблизно 400 кДа, від приблизно 125 кДа до приблизно 425 кДа, від приблизно 150 кДа до приблизно 450 кДа, від приблизно 175 кДа до приблизно 475 кДа, від приблизно 200 кДа до приблизно 500 кДа, від приблизно 250 кДа до приблизно 550 кДа або від приблизно 300 кДа до приблизно 600 кДа.

В інших варіантах здійснення даний винахід належить до вакцинних композицій з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, що містять один або більше кон'югатів полісахарид-білок, молекулярна маса яких перебуває в діапазоні від приблизно 1000 кДа до приблизно 10000 кДа, від приблизно 1500 кДа до приблизно 15000 кДа, від приблизно 2000 кДа до приблизно 20000 кДа, від приблизно 2500 кДа до приблизно 25000 кДа або від приблизно 3000 кДа до приблизно 30000 кДа.

Вакцинні композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок згідно із даним винаходом можуть бути виготовлені за допомогою відомих способів. Так, наприклад, можна робити вакцинні композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, наприклад, з водою або фізіологічним розчином. Додатково, вакцинні композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок можуть додатково містити одну або декілька з наступних речовин: буфер, консервант або стабілізатор, полісорбат, ад'ювант, такий як сполуки алюмінію, наприклад, гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію або гідроксифосфат алюмінію, і/або ліофілізувальний ексципієнт. Можна робити вибір щодо включення будь-якої із зазначених вище сполук у вакцинні композиції з кон'югатом

пневмококовий полісахарид-білок за винаходом залежно від способу і шляху введення такої композиції пацієнтові, що потребує цього, і додатково, можна виходити зі стандартної фармацевтичної практики.

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання чотирнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3 і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM₁₉₇. Спосіб одержання чотирнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок включає наступні етапи:

(а) роздільне кон'югування одного або більше із чотирнадцяти пневмококових полісахаридів (наприклад, активованих за допомогою CDAP) з імуногенним білком-носієм, таким як PsaA і/або CRM₁₉₇,

(b) діяфільтрація і очищення кон'югатів за допомогою ексклюзивної хроматографії,

(с) аналіз очищених фракцій способом SEC-MALLS, об'єднання фракцій, що містять кожний із чотирнадцяти кон'югатів, і стерилізація за допомогою фільтрації моновалентних кон'югованих фракцій, і

(d) складання композиції із чотирнадцяти кон'югатів (у кількості кожного серотипу, наприклад, від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 10 мкг, і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 15 мкг до приблизно 36 мкг), ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), допоміжної речовини і буфера для одержання чотирнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

У деяких варіантах здійснення чотирнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок може проходити фільтрацію (наприклад, в асептичних умовах).

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання чотирнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, і зазначена композиція містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3 і 6A кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM₁₉₇. Спосіб одержання чотирнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок включає наступні етапи:

(а) роздільне кон'югування одного або більше із чотирнадцяти пневмококових полісахаридів (наприклад, активованих за допомогою CDAP) з імуногенним білком-носієм, таким як PsaA і/або CRM₁₉₇,

(b) діяфільтрація і очищення кон'югатів за допомогою ексклюзивної хроматографії,

(с) аналіз очищених фракцій способом SEC-MALLS, об'єднання фракцій, що містять кожний із чотирнадцяти кон'югатів, і стерилізація за допомогою фільтрації моновалентних кон'югованих фракцій, і

(d) складання композиції із чотирнадцяти кон'югатів (у кількості кожного серотипу, наприклад, від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 10 мкг, і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 15 мкг до приблизно 36 мкг), ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), допоміжної речовини і буфера для одержання чотирнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

У деяких варіантах здійснення чотирнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок може проходити фільтрацію (наприклад, в асептичних умовах).

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання п'ятнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM₁₉₇. Спосіб одержання п'ятнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок включає наступні етапи:

(а) роздільне кон'югування одного або більше із п'ятнадцяти пневмококових полісахаридів (наприклад, активованих за допомогою CDAP) з імуногенним білком-носієм, таким як PsaA і/або CRM₁₉₇,

(b) діяфільтрація і очищення кон'югатів за допомогою ексклюзивної хроматографії,

(c) аналіз очищених фракцій способом SEC-MALLS, об'єднання фракцій, що містять кожний з п'ятнадцяти кон'югатів, і стерилізація за допомогою фільтрації моновалентних кон'югованих фракцій, і

5 (d) складання композиції з п'ятнадцяти кон'югатів (у кількості кожного серотипу, наприклад, від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг), ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), допоміжної речовини і буфера для одержання п'ятнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

10 У деяких варіантах здійснення п'ятнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок може проходити фільтрацію (наприклад, в асептичних умовах).

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання сімнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або 15 більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B кон'юговані з CRM₁₉₇. Спосіб одержання сімнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок включає наступні етапи:

20 (a) роздільне кон'югування одного або більше із сімнадцяти пневмококових полісахаридів (наприклад, активованих за допомогою CDAP) з імуногенним білком-носієм, таким як PsaA і/або CRM₁₉₇,

(b) діафільтрація і очищення кон'югатів за допомогою ексклюзивної хроматографії,

(c) аналіз очищених фракцій способом SEC-MALLS, об'єднання фракцій, що містять кожний із сімнадцяти кон'югатів, і стерилізація за допомогою фільтрації моновалентних кон'югованих фракцій, і

25 (d) складання композиції із сімнадцяти кон'югатів (у кількості кожного серотипу, наприклад, від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг), ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), допоміжної речовини і буфера для одержання сімнадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

30 У деяких варіантах здійснення сімнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок може проходити фільтрацію (наприклад, в асептичних умовах).

У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання двадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45 кон'юговані з CRM₁₉₇. Спосіб одержання двадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок включає наступні етапи:

40 (a) роздільне кон'югування одного або більше із двадцяти пневмококових полісахаридів (наприклад, активованих за допомогою CDAP) з імуногенним білком-носієм, таким як PsaA і/або CRM₁₉₇,

(b) діафільтрація і очищення кон'югатів за допомогою ексклюзивної хроматографії,

45 (c) аналіз очищених фракцій способом SEC-MALLS, об'єднання фракцій, що містять кожний із двадцяти кон'югатів, і стерилізація за допомогою фільтрації моновалентних кон'югованих фракцій, і

50 (d) складання композиції із двадцяти кон'югатів (у кількості кожного серотипу, наприклад, від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг), ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), допоміжної речовини і буфера для одержання двадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

У деяких варіантах здійснення двадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок може проходити фільтрацію (наприклад, в асептичних умовах).

55 У деяких варіантах здійснення даний винахід належить до способу одержання двадцятидвох валентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яка містить один або більше пневмококових полісахаридів, вибраних із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'юговані з CRM₁₉₇. Спосіб одержання двадцятидвох валентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок включає наступні етапи:

(а) роздільне кон'югування одного або більше із двадцяти двох пневмококових полісахаридів (наприклад, активованих за допомогою CDAP) з імуногенним білком-носієм, таким як PsaA і/або CRM₁₉₇,

(b) діафільтрація і очищення кон'югатів за допомогою ексклюзійної хроматографії,

5 (c) аналіз очищених фракцій способом SEC-MALLS, об'єднання фракцій, що містять кожний із двадцяти двох кон'югатів, і стерилізація за допомогою фільтрації моновалентних кон'югованих фракцій, і

(d) складання композиції із двадцяти двох кон'югатів (у кількості кожного серотипу, наприклад, від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг), ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), допоміжної речовини і буфера для одержання двадцятивалентної композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок.

10 У деяких варіантах здійснення двадцятидвох валентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок може проходити фільтрацію (наприклад, в асептичних умовах).

15 Композиції за даним винаходом можуть бути представлені у вигляді одиничної дози, наприклад, у флаконі з одиничною дозою, у вигляді багаторазової дози, наприклад, у флаконі з множиною доз, або у вигляді попередньо заповненого шприца. Композиції за даним винаходом можуть додатково містити один або більше консервантів, вибраних з тіомерсалу, 2-феноксіетанолу тощо, у кількості, яка може становити від приблизно 4 мг/мл до приблизно 20 мг/мл.

20 У деяких варіантах здійснення даних винахід також належить до імуногенної композиції (наприклад, до вакцини), наприклад, до композиції з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і роблять таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із двох або більше серотипів у кількості від приблизно 2,2 до 4,4 мкг, від приблизно 1 мкг приблизно 10 мкг PsaA на кожний серотип, від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мкг CRM₁₉₇ на кожний серотип, від приблизно 0,2 мг до приблизно 1 мг ад'юванту (наприклад, фосфату алюмінію), і одна або декілька допоміжних речовин (наприклад, хлорид натрію і/або буфер).

25 В інших варіантах здійснення даних винахід також належить до тринадцятивалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як тринадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇.

30 Додатково, композицію тринадцятивалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний із тринадцяти серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 25 мкг до приблизно 30 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту (наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

35 У деяких варіантах здійснення даних винахід також належить до чотирнадцятивалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як чотирнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇.

40 У деяких варіантах здійснення даних винахід також належить до чотирнадцятивалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як чотирнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM₁₉₇.

45 Додатково, композицію чотирнадцятивалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний із чотирнадцяти серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 35 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту

(наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

В інших варіантах здійснення даних винахід також належить до п'ятнадцятивалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як п'ятнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кожний з яких окремо кон'югований з CRM₁₉₇.

Додатково, композицію п'ятнадцятивалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний з п'ятнадцяти серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту (наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

У додаткових варіантах здійснення даних винахід також належить до сімнадцятивалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як сімнадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B, кожний з яких окремо кон'югований з CRM₁₉₇.

Додатково, композицію сімнадцятивалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний із сімнадцяти серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту (наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

У деяких варіантах здійснення даних винахід також належить до двадцятивалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як двадцятивалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, при цьому щонайменше кожний із серотипів 3 6A і 6B окремо кон'югований з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 11, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, кожний окремо, кон'югований з CRM₁₉₇.

Додатково, композицію двадцятивалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний із двадцяти серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту (наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

У деяких варіантах здійснення даних винахід також належить до двадцятидвохвалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як двадцятидвохвалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше кожний із серотипів 3 6A і 6B окремо кон'югований з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, кожний окремо, кон'югований з CRM₁₉₇.

Додатково, композицію двадцятидвохвалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний із двадцяти двох серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту (наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

У деяких варіантах здійснення даних винахід також належить до двадцяти чотирьохвалентної імуногенної композиції (наприклад, до вакцини) у стерильній рідкій композиції, такої як двадцяти чотирьохвалентна композиція з кон'югатом пневмококовий полісахарид-білок, яку вводять у вигляді однократної дози приблизно 0,5 мл і готують таким чином, щоб у ній містилося щонайменше наступне: пневмококові полісахариди із серотипів 1, 3

4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше кожний із серотипів 3, 6A і 6B окремо кон'югований з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, кожний окремо, кон'югований з CRM₁₉₇.

5 Додатково, композицію двадцяти чотирьохвалентної вакцини можна робити у вигляді однієї або декількох доз об'ємом приблизно 0,5 мл на дозу, при цьому в кожній дозі 0,5 мл міститься кожний із двадцяти чотирьох серотипів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM₁₉₇ у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг, приблизно 0,125 мг ад'юванту (наприклад, елементарного алюмінію, тобто, приблизно 0,5 мг фосфату алюмінію), хлорид натрію і L-гістидиновий буфер.

10 Композицію за даним винаходом можна вводити пацієнтам, що потребує цього за допомогою будь-якого числа загальноприйнятих шляхів введення, застосовуваних в галузі вакцинації. Наприклад, композиції за даним винаходом можна вводити системно, наприклад, парентерально (наприклад, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньошкірно і/або внутрішньовенно), або через слизову оболонку (наприклад, перорально і/або інтраназально).

15 У деяких варіантах здійснення даний винахід також належить до способів індукції імунної відповіді в пацієнта, що потребує цього, на один або більше капсульних полісахаридів *S. pneumoniae*, кон'югованих з одним або декількома білками-носіями. Способи індукції імунної відповіді включають введення пацієнтам, що потребує цього, імунологічно ефективної кількості композицій, описаних у винаході.

20 Відповідно до способів даного винаходу, пацієнтом, для якого призначені описані у винаході композиції, є людина, наприклад, немовля (у віці приблизно менше 1 року), дитина раннього віку (від приблизно 12 місяців до приблизно 24 місяців), дитина молодшого дошкільного віку (від приблизно 2-х років до приблизно 5 років), дитина старшого дошкільного і молодшого шкільного віку (від приблизно 5 років до приблизно 13 років), підліток (від приблизно 13 років до приблизно 18 років), доросла людина (від приблизно 18 років до приблизно 65 років) або людина старшого віку (старше 65 років).

25 Згідно з винаходом, "ефективна кількість" описаних композицій належить до кількості, необхідної для індукції імунної відповіді в пацієнта, якому вводять цю композицію. Імунна відповідь характеризується наявністю в організмі-хазяїні одного або більше антитіл, специфічних до антигену *S. pneumoniae*, що значно зменшує ймовірність інфікування або ступінь тяжкості інфекції *S. pneumoniae* під час наступного зараження.

ПРИКЛАДИ

30 Наступні приклади наведені для ілюстрації розкриття і призначені винятково для ілюстративної мети, і не повинні вважатися обмеженням об'єму винаходу.

Приклад 1: Кон'югування окремих пневмококових полісахаридів з білком-носієм з утворенням кон'югатів полісахарид-PsaA

А) Приготування PsaA:

40 Виконували ПЛР-ампліфікацію гена PsaA із пневмокока серотипу 4 з вилученої гідрофобної лідерної пептидної послідовності. Послідовність гена верифікували і для підвищення експресії клонували в *E. coli* за допомогою вектора, сконструйованого авторами (pBE66).

45 Гліцеринову стокову культуру, що кодує ген PsaA, обновляли на 20 мл середовища LB, що містить 1 мл стокового гліцерину в конічній колбі об'ємом 150 мл. Культуру інкубували протягом приблизно 6 годин при температурі 37 °C при 200 оборотах на хвилину до кінцевої оптичної густини 3,5 OD при OD 600 nm. Оновлену культуру переносили від посівної культури в конічній колбі об'ємом 5 л. Культуру вирощували протягом приблизно 10 годин при 37 °C при 200 оборотах на хвилину до кінцевої OD 3 при 600 nm.

50 Культуру для посіву переносили асептично в 20-літровий ферментер, що містить середовища з наступних компонентів: NuPERTone 6 г/л, дріжджовий екстракт 12 г/л, дикалій гідроортофосфат 13,5 г/л, двохосновний фосфат амонію 4 г/л, лимонна кислота 1,7 г/л, MgSO₄·7H₂O 1,2 г/л, глюкоза 4 г/л, тіаміну гідрохлорид 10 мг/л, а також мікроелементи 1 мл/л (наприклад, мікроелементи для 100 мл композиції: FeCl₃ 2,7 г, ZnCl₂ 0,2 г, COCl₂·6H₂O 0,2 г, Na₂MoO₄·2H₂O 0,2 г, CuSO₄·5H₂O 0,1 г, борна кислота 0,05 г, CaCl₂·2H₂O 0,1 г, конц. HCl 10 мл). Первісна ферментація починалася при оптичній густині 0,2 при OD 600 nm. Показники pH підтримували на рівні 7±0,2 протягом ферментації шляхом додавання 20 % ортофосфорної кислоти і 12,5 % гідроксиду амонію.

55 При падінні рівня глюкози нижче 0,5 г/л починали періодичну ферментацію з підживленням з постійною швидкістю 3-4 г/л на годину, і протягом ферментації вміст розчиненого кисню %DO підтримували на рівні > 20 % з кисневим збагаченням.

Клітини вирощували у ферментері і осад клітин збирали центрифугуванням. Клітини лізували за допомогою пристрою для руйнування клітин (Panda). Лізат центрифугували при 10000 g і прозорий супернатант піддавали очищенню.

5 Очищення PsaA проводили аналогічно процедурі, описаній авторами Larentis et. al, 2011 (Protein expression and Purification 78 (2011) 38). Очищення додатково оптимізували за допомогою хроматографії зі змішаним режимом (керамічний гідроксіапатит типу LL) після діетиламіноетилцелюлози (DEAE) для досягнення більш високої чистоти PsaA.

10 Аніонообмінна хроматографія: 30 мл смоли DEAE сефарози(GE) вносили в колонку XK16/20. Смолу промивали стерильною дистильованою водою в об'ємі 5 колонок, а потім 20 мМ Трис, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0 (буфер, що врівноважує) в об'ємі 10 колонок. 30 мл супернатанту розводили до 100 мл буфера, що врівноважує, наносили на колонку і збирали проточну фракцію. Колонку промивали 5 об'ємами буфера, що врівноважує. PsaA елюювали за допомогою 12 об'ємів лінійного градієнта (0-100 % буфер В). (Буфер А містить 20 мМ Трис, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0; буфер В містить 20 мМ Трис, 1 мМ ЕДТА, 250 мМ NaCl, рН 8,0). Потім виконували промивання колонки 20 мМ Трис, 1 мМ ЕДТА, 1 М NaCl, рН 8,0.

15 Хроматографія зі змішаним режимом: 25 мл керамічного гідроксіапатиту (типу II СНТ-II) вносили в колонку. Смолу промивали об'ємами стерильної дистильованої води, а потім 10 об'ємами 20 мМ Трис, рН 6,8. Елюйовані фракції зі смоли DEAE, які показали чітку основну видиму смугу приблизно 37 кДа гарної концентрації PsaA в SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію) поєднували і наносили на смолу СНТ-II. Проточну фракцію збирали і колонку промивали буфером, що врівноважує, в об'ємі 5 колонок. Білок елюювали за допомогою лінійних градієнтів в об'ємі 5 колонок (15 % В, 20 % В, 50 % В і 20 100 % В). Буфер А містить 20 мМ Трис, рН 6,8, а буфер В містить 250 мМ фосфатного буфера, рН 6,8.

25 Усі елюйовані фракції, що показують чисту смугу передбачуваного розміру PsaA, поєднували, концентрували на касеті 10 кДа MWCO і піддавали діафільтрації проти 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,5. Очищений білок наносили на SDS-PAGE гель для оцінки чистоти.

В) Активація і кон'югування пневмококового полісахариду із серотипу 3 з PsaA

30 Полісахарид із серотипу 3 зі зменшеним розміром (у концентрації 5 мг/мл) і 1,5 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонітрилі (вага/об'єм)) змішували в скляному посуді в співвідношенні 1: 0,5 (ПС:СОАР) і збовтували протягом 1 хвилини. Рівень рН розчину полісахариду доводили до 9,0 за допомогою 3,5 мл 0,2 М триетиламіну і збовтували протягом 1 хвилини при кімнатній температурі (КТ). PsaA у кількості 210 мг (14,0 мл у концентрації 15,0 мг/мл) повільно додавали до активованого полісахариду в співвідношенні 1: 0,7 (ПС: білок-носії).

35 Значення рН реакційної суміші доводили до приблизно 9,01 за допомогою 0,7 мл 0,2М триетиламіну, і продовжували реакцію при збовтуванні протягом 5 годин при кімнатній температурі з наступною зупинкою реакції шляхом додавання гліцину (100 мМ) у надлишковій концентрації. Кінетику реакцій кон'югування контролювали за допомогою ексклюзивної високоєфективної рідинної хроматографії (SEC-HPLC) у кожен годину реакції.

40 Потім реакційну суміш піддавали діафільтрації і концентрували за допомогою мембрани 100 кДа MWCO TFF. Концентрат очищали за допомогою ексклюзивної хроматографії. Фракції аналізували за допомогою SEC-MALLS і способу з використанням антрону, і фракції, що містять кон'югати, поєднували і стерилізували шляхом фільтрації за допомогою 0,2 мкм фільтрів.

С) Активація і кон'югування пневмококового полісахариду із серотипу 6А з PsaA

45 Полісахарид тип 6А зі зменшеним розміром (у концентрації 14,6 мг/мл) і 400 мкл CDAP (100 мг/мл в ацетонітрилі (вага/об'єм)) змішували в скляному посуді в співвідношенні 1:1 (ПС: CDAP) і збовтували протягом 1 хвилини.

50 Рівень рН розчину полісахариду доводили до 9,5 за допомогою 800 мкл 0,2М триетиламіну і збовтували протягом 1 хвилини при кімнатній температурі (КТ). PsaA у кількості 40 мг (3,78 мл у концентрації 11,0 мг/мл) повільно додавали до активованого полісахариду в співвідношенні 1:1 (ПС: білок-носії).

55 Значення рН реакційної суміші доводили до приблизно 9,01 за допомогою 0,7 мл 0,2 М триетиламіну і реакцію продовжували при збовтуванні протягом 5 годин при кімнатній температурі з наступною зупинкою реакції шляхом додавання гліцину (100 мМ) у надлишковій концентрації. Кінетику реакцій кон'югування контролювали за допомогою SEC-HPLC у кожен годину реакції.

60 Потім реакційну суміш піддавали діафільтрації і концентрували за допомогою мембрани 100 кДа MWCO TFF. Концентрат очищали за допомогою ексклюзивної хроматографії. Фракції аналізували шляхом SEC-MALLS і способу з використанням антрону, і фракції, що містять кон'югати, поєднували і стерилізували шляхом фільтрації через 0,2 мкм фільтри.

D) Активація і кон'югування пневмококового полісахариду із серотипу 6B з PsaA

Полісахарид типу 6B зі зменшеним розміром (у концентрації 14,97 мг/мл) і 4,0 мл CDAP (100 мг/мл в ацетонітрилі (вага/об'єм)) змішували в скляному посуді в співвідношенні 1: 2 (ПС: CDAP) і збовтували протягом 1 хвилини. Рівень рН розчину полісахариду доводили до 9,1 шляхом

5 додавання 8.0 мл 0,2М триетиламіну і збовтували протягом 1 хвилини при кімнатній температурі (КТ). PsaA у кількості 340 мг (22,66 мл у концентрації 15,0 мг/мл) повільно додавали до активованого полісахариду в співвідношенні 1: 10,7 (ПС: білок-носії).

Значення рН реакційної суміші доводили до приблизно 9.01 шляхом додавання 0,7 мл 0,2 М триетиламіну і реакцію продовжували при збовтуванні протягом 5 годин при кімнатній

10 температурі з наступною зупинкою реакції шляхом додавання гліцину (100 мМ) у надлишковій концентрації. Кінетику реакцій кон'югування контролювали за допомогою SEC-HPLC у кожну годину реакції.

Потім реакційну суміш піддавали діяфільтрації і концентрували з використанням мембрани 100 кДа MWCO TFF. Концентрат очищали за допомогою ексклюзивної хроматографії. Фракції

15 аналізували шляхом SEC-MALLS і способу з використанням антрону, і фракції, що містять кон'югати, поєднували і стерилізували шляхом фільтрації через 0,2 мкм фільтри.

Виконували SEC-BEPX для визначення кінетики реакції кон'югування серотипів 3 (D), 6A (E) і 6B (F). Для всіх трьох хроматограм використовували наступні символи: полісахарид (суцільна лінія), PsaA (пунктирна лінія), 3 або 5 годин реакції (крапкова лінія). Як показано на фігурі 2 для

20 всіх хроматограм, поглинання PsaA зазначене, виходячи зі скорочення або зникнення приналежного PsaA піка при часі втримання приблизно 19 хвилин. Кон'югування підтверджується за формуванням нового піка від приблизно 13,5 хвилин до приблизно 14 хвилин.

Кон'югати PsaA із пневмококовими полісахаридами із серотипів 5, 9V, 12F, 10A, 15B, 18C і

25 45 були отримані за допомогою аналогічної вищеописаної методики. Виконували ексклюзивну високоефективну рідинну хроматографію для визначення кінетики реакції кон'югування серотипів 5 (A), 9B (B) і 18C (C). Усі три хроматограми показані на фіг. 2: полісахарид (суцільна лінія), PsaA (пунктирна лінія), 3 або 5 годин реакції (крапкова лінія). У всіх хроматограмах поглинання PsaA зазначене, виходячи зі скорочення або зникнення приналежного PsaA піка при

30 часі втримання приблизно 19 хвилин. Кон'югування підтверджується за формуванням нового піка від приблизно 13,5 хвилин до приблизно 14 хвилин.

Приклад 2: Одержання кон'югатів пневмококового капсульного полісахариду і CRM₁₉₇

A) Активація полісахариду і кон'югування з білком-по сієм:

Сортовані за розміром полісахариди (6,0 мл ПС, концентрація 10 мг/мл) і CDAP (100 мг/мл в

35 ацетонітрилі (вага/об'єм)) змішували в скляній пробірці в співвідношенні 1:1 і перемішували протягом 1 хвилини. Рівень рН розчину полісахариду доводили до 9,25 за допомогою 0,2М триетиламіну і збовтували протягом 3 хвилин при кімнатній температурі (КТ). До активованого полісахариду повільно додавали CRM₁₉₇ (4,0 мл, у концентрації 15,0 мг/мл) у співвідношенні 1:1 (ПС: білок-носії).

Значення рН реакції доводили до приблизно 9,05 шляхом додавання 0,2М триетиламіну, і реакцію продовжували при збовтуванні протягом 5 годин при кімнатній температурі, і в підсумку

40 реакцію зупиняли шляхом додавання гліцину в надлишковій концентрації.

Потім реакційну суміш піддавали діяфільтрації з використанням мембрани 100 К MWCO і очищали шляхом ексклюзивної хроматографії. Фракції аналізували за допомогою SEC-MALLS, способом з антроном, і фракції, що містять кон'югати, поєднували і стерилізували шляхом

45 фільтрації через 0,2 мкм фільтри. Цей матеріал називається одновалентним нерозфасованим кон'югатом.

На фігурі 1 показана кінетика реакції кон'югатів, отриманих із серотипів 7F (A), 14 (B) і 19F (C) з CRM₁₉₇. На всіх трьох хроматограмах використані наступні позначення: полісахарид (суцільна лінія), CRM₁₉₇ (пунктирна лінія), 5 годин реакції (крапкова лінія). У всіх хроматограмах поглинання CRM₁₉₇ зазначене, виходячи зі скорочення або зникнення приналежного CRM₁₉₇ піка

50 при часі втримання приблизно 19 хвилин. Кон'югування підтверджується за формуванням нового піка від приблизно 13,5 хвилин до приблизно 14 хвилин.

На фігурі 1 показана кінетика реакції кон'югатів, отриманих із серотипів 3 (D), 6A (E) і 6B (F) з CRM₁₉₇. На всіх трьох хроматограмах використані наступні позначення: полісахарид (суцільна лінія), CRM₁₉₇ (пунктирна лінія), 5 годин реакції (крапкова лінія). У всіх хроматограмах поглинання CRM₁₉₇ зазначене, виходячи зі скорочення або зникнення приналежного CRM₁₉₇ піка

55 при часі втримання приблизно 19 хвилин. Кон'югування підтверджується за формуванням нового піка від приблизно 13,5 хвилин до приблизно 14 хвилин.

Приклад 3: Приготування кон'югованої вакцини із пневмококового капсульного полісахариду і білка

Композиція 15-валентної кон'югованої вакцини була отримана у вигляді 0,5 мл дози, що містить 2,2 мкг кожного із пневмококових полісахаридів серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кон'югованих з білком CRM₁₉₇ у кількості приблизно 28 мкг, і 2,2 мкг кожного полісахариду із серотипів 3, 6A і 6B, кон'югованих з білком PsaA у кількості приблизно 7 мкг. Усі кон'югати були адсорбовані на гелі фосфату алюмінію в кількості, еквівалентній 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. Як розріджувач і носій використовували 9 % вага/об'єм фізіологічний розчин, і рівень рН кінцевої композиції доводили до рН 6 за допомогою 1N хлористоводневої кислоти. Для ефективної адсорбції після регулювання рН склад перемішували протягом 2 годин при постійному збовтуванні. Через 2 години змішування сформованою сумішшю асептично заповнювали стерильні несиликонізовані 3 мл флакони в кількості 0,58 мл на флакон, закривали стерильними гумовими пробками 13 мм і герметично впаковували 13 мм стерильним обтискним алюмінієвим ковпачком рожевого кольору, з наступним оптичним контролем і маркуванням заповнених флаконів. Декілька флаконів з партії випадковим чином вибирали і відправляли для аналізу за наступними показниками: зовнішній вигляд, рівень рН, осмоляльність, загальний вміст полісахариду і білка (мкг / SHD = безпечна людська доза), % адсорбції, вміст алюмінію (мг / SHD).

Приклад 4: Приготування кон'югованої вакцини із пневмококового капсульного полісахариду і білка

Композиція 15-валентної кон'югованої вакцини була отримана у вигляді 0,5 мл дози, що містить 2,2 мкг кожного полісахариду із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кон'югованих з білком PsaA у кількості приблизно 14 мкг. Усі кон'югати були адсорбовані на гелі фосфату алюмінію в кількості, еквівалентній 0,5 мг Al³⁺ на дозу 0,5 мл. Як розріджувач і носій використовували 9 % вага/об'єм фізіологічний розчин, і рівень рН кінцевої композиції доводили до рН 6 за допомогою 1N хлористоводневої кислоти. Для ефективної адсорбції після регулювання рН склад перемішували протягом 2 годин при постійному збовтуванні. Через 2 години змішування сформованою сумішшю асептично заповнювали стерильні несиликонізовані 3 мл флакони в кількості 0,58 мл на флакон, закривали стерильними гумовими пробками 13 мм і герметично впаковували 13 мм стерильним обтискним алюмінієвим ковпачком рожевого кольору, з наступним оптичним контролем і маркуванням заповнених флаконів. Декілька флаконів з партії випадковим чином вибирали і відправляли для аналізу за наступними показниками: зовнішній вигляд, рівень рН, осмоляльність, загальний вміст полісахариду і білка (мкг / SHB = безпечна людська доза), % адсорбції, вміст алюмінію (мг / SHD).

А) Імунізація кроликів виготовленою вакциною

Здорові кролики вагою від 1,5 до 2 кг були виведені і вирощені в умовах без специфічних патогенів. Кроликів імунізували вищевказаним препаратом за наступною схемою.

Група 1 складалася з 7 кроликів, імунізованих 15-валентною кон'югованою вакциною (приклад 3). 15-валентна вакцина складається з 2 мкг кожного з полісахаридів *S.pneumoniae* із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, кон'югованих з CRM₁₉₇, і з 2,2 мкг кожного з полісахаридів *S. Pneumoniae* із серотипів 3, 6A і 6B, кон'югованих з PsaA. Кроликів імунізували в дні 1, 15 і 29; зразки крові збирали в дні 0, 15 і 36. Зі зразка крові відокремлювали сироватку і зберігали при - 80 °C.

Група 2 складалася з 7 кроликів, імунізованих 13-валентною кон'югованою вакциною Pnevna13®. Кроликів імунізували в дні 1, 15 і 29; зразки крові збирали в дні 0, 12, 26 і 40. Дані, отримані на 12-й день і 40-й день, були використані для графіка порівняння з дослідженням PsaA (фігура 4). Зі зразка крові відокремлювали сироватку і зберігали при - 80 °C.

Група 3 складалася з 7 кроликів, імунізованих 15-валентною кон'югованою вакциною (приклад 4). 15-валентна вакцина складається з 2,2 мкг кожного з полісахаридів серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, кон'югованих з білком CRM₁₉₇ у кількості приблизно 28 мкг, і з 4,4 мкг кожного з полісахаридів серотипів 3, 6A і 6B, кон'югованих з білком PsaA у кількості приблизно 14 мкг. Кроликів імунізували в дні 1, 15 і 29; зразки крові збирали в дні 0, 15 і 36. Зі зразка крові відокремлювали сироватку і зберігали при - 80 °C. Отриману з імунізованих кроликів сироватку аналізували на серотип-специфічну імунну відповідь за допомогою імуноферментного аналізу ELISA.

Аналіз ELISA виконували відповідно до протоколу, запропонованого ВООЗ. Коротко, ELISA-планшети Maxisorp™ покривали пневмококовими полісахаридами заданого серотипу (1 мкг/50 мкл/ на лунку з використанням фосфатно-буферного розчину (ФБР); стерильні без ендотоксинів, з 0,02 % азидом натрію). Планшети поміщали в коробку зі зволженими

паперовими рушниками для зволоження повітря, і інкубували при $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 годин, після цього планшети зберігали при $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ до використання.

Досліджувані сироватки попередньо адсорбували на CWPS Mlti™ для усунення фонові реактивності, виробленою клітинною стінкою полісахариду. Для одержання 2 мкл досліджуваної сироватки і зразка для позитивного контролю сироватку розводили застосовуваним перед адсорбцією розчином 998 мкл ((1 мл-1 мкл CWPS Mlti™ в 999 мкл 10 % SuperBlock™ в фосфатно-сольовому буфері із твіном PBST) для досягнення кінцевого розведення 1:500. Розведені зразки інкубували при кімнатній температурі ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом 1 години при безперервному струшуванні. Незв'язані пневмококові полісахариди були вилучені поклацунням планшета і вільні ділянки в лунках блокували шляхом додавання 200 мкл блокувальної речовини (20 % SuperBlock™ у ФБР). Планшет інкубували при кімнатній температурі ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом 1 години без струшування.

В) Додавання досліджуваних і контрольних зразків

Додавали 50 мкл розріджувача (10 % SuperBlock™ в PBST) в усі лунки, крім лунок від A1 до A12. Слідом за цим у лунки A1-A10 додавали попередньо адсорбовані досліджувані зразки сироватки в об'ємі 100 мкл/на лунку, і в лунки A11 і A12 додавали контрольні зразки сироватки. Проводили дворазове серійне розведення досліджуваних зразків шляхом переносу 50 мкл із 1 в 2 лунку і так далі, тобто від A1 - A10 до H1-H10. Аналогічним чином проводили серійне розведення контрольних зразків (007SP) від A11 і 12 до E11 і E12. Лунки F11 і F12 до H11 і H12 без розведення були залишені як холоста проба.

Планшети інкубували при кімнатній температурі ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) протягом 2 годин без струшування. Після етапу інкубації вміст видаляли і планшети промивали тричі розчином PBST (приблизно 250 мкл/на лунку) вручну або за допомогою машини для мийки планшетів.

С) Додавання первинного антитіла

В усі лунки додавали 50 мкл/на лунку рекомбінантний білок A/G пероксидазу (розведений 1:20000 з використанням 10 % SuperBlock™ в PBST) і планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) без струшування. Після цього планшети тричі промивали PBST (250 мкл/на лунку) вручну або за допомогою машини для мийки планшетів.

Д) Продовження реакції і зчитування

Хромогенна реакція була продовжена шляхом додавання 50 мкл/на лунку ТМВ-субстрату і інкубацією протягом 15 хвилин при кімнатній температурі ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) без струшування. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл/на лунку 1,25 М сірчаної кислоти. Оптичну густину вимірювали при 450 нм.

Е) Оцінка Титру

Титр антитіл в імунізованих тварин розраховували, як зворотний коефіцієнт розведення. Найбільше розведення, яке показувало OD 450 нм у два рази вище, ніж титр перед імунізацією (приблизно 0,2), вказувалося, як титр. Титр сироваткових антитіл до кожного серотипу показували у вигляді діаграми і порівнювали з показниками в різних групах дослідження.

Результати імунної відповіді тварин із групи 1 показують дозозалежне підвищення серотип-специфічного підвищення титру антитіл у сироватці крові, тобто рівень титру антитіл у вакцинованих тварин зростає з кожною наступною дозою. Імунна відповідь на серотип 3 (фігура 5) склав приблизно 1:10000, коли тварини були імунізовані кон'югатами PsaA, що містять 4,4 мкг полісахариду (група 3). Додатково, титр сироваткових антитіл до серотипів 3, 6A і 6B був щонайменше у два рази вище в порівнянні з імунною відповіддю, отриманою від кроликів, імунізованих вакциною Pprevnar®13. Титр сироваткових IgG після першої імунізації в кроликів вакциною Pprevnar®13 не показує це підвищення тією самою мірою, як це виявлено при використанні 15-валентної композиції за даним винаходом (фігури 3 і 4). Навіть при тому, що концентрація полісахариду для серотипу 6B в вакцині

Pprevnar®13 у два рази більша (4,4 мкг), у порівнянні з концентрацією полісахариду серотипу 3, кон'югованого з PsaA (фігура 3), рівень відповіді IgG у два рази вищий. Титр антитіл серотипу 3 ледь досягає 8000 у композиціях, що містять 2,2 мкг серотипу 3, кон'югованого з CRM₁₉₇. Цей титр показує помітне поліпшення (16000) при кон'югуванні з 4,4 мкг PsaA. Це поліпшення імунної відповіді обумовлене кон'югуванням PsaA і полісахаридів із серотипів 3, 6A і 6B. Титри сироваткових антитіл до серотипу 14 у тварин, вакцинованих Pprevnar®13, були нижче в порівнянні з результатами композицій за даним винаходом. Відповідь IgG на інші серотипи у тварин, вакцинованих або вакцинними композиціями за винаходом, або вакциною Pprevnar®13, були подібними. Титри серотипів 3, 6A і 6B були поліпшені при кон'югуванні з PsaA навіть при концентрації 2,2 мкг.

Використовувані в даній заявці чисельні значення зазначені як наближення від мінімальних до максимальних значень у межах зазначених діапазонів, і їм передусе слово "приблизно", якщо

конкретно не зазначене інше. Розкриті у винаході діапазони слід вважати безперервними діапазонами, що включають кожне значення між зазначеними мінімальним і максимальним значеннями, а також будь-які діапазони, які можуть бути утворені з використанням цих значень. Чисельні значення, представлені в даній заявці, є різними варіантами здійснення даного винаходу.

Використовувані у винаході терміни в однині включають в себе множину, якщо з контексту явно не випливає інше. Аналогічним чином, якщо слово "або" явним чином обмежує позначення тільки єдиного елемента, ексклюзивно від інших елементів при посиланні на перелік із двох або більш елементів, то використання "або" у такому списку слід тлумачити як включення (а) будь-якого одного елемента з переліку, (b) усіх елементів з переліку або (c) будь-якої комбінації елементів у переліку. Додатково, терміни "що містить" і подібні, використовувані в даному винаході, означають включення щонайменше перерахованої ознаки (ознак) таким чином, що не виключається наявність будь-якої перевищуючої кількості тієї ж ознаки (тих же ознак) і/або одного або більше додаткових типів ознак. Вказівка на "один варіант здійснення", "варіант здійснення" або аналогічні формулювання означає, що конкретна ознака композиції, композиція, спосіб або характеристика, описані у зв'язку із цим варіантом здійснення, можуть бути включені щонайменше в один варіант здійснення даного рівня техніки. Таким чином, поява таких фраз або формулювань у даному документі не обов'язково належить до того самого варіанта здійснення. Крім того, можна поєднувати різні конкретні ознаки, композиції, способи або характеристики будь-яким підходящим чином в одному або декількох варіантах здійснення.

Даний винахід не є вичерпним або не призначений обмежувати даний рівень техніки описаними у винаході конкретними формами. В ілюстративних цілях у винаході описані конкретні варіанти здійснення, але разом з тим можливі різні еквівалентні модифікації без відходу від даного рівня техніки, що буде очевидно фахівцям у даній галузі. У деяких випадках не були показані і/або описані докладно загальновідомі елементи і дії, щоб уникнути зайвого обмеження опису варіантів здійснення даного рівня техніки. Незважаючи на певний порядок представлення в даному винаході етапів способів, в альтернативних варіантах здійснення етапи можуть мати інший підходящий порядок. Аналогічним чином, деякі варіанти здійснення даного рівня техніки, розкриті в контексті конкретних варіантів здійснення, можуть бути об'єднані або виключені в інших варіантах здійснення. Крім того, пов'язані з деякими варіантами здійснення переваги можуть бути описані в контексті цих варіантів здійснення, але разом з тим, інші варіанти здійснення можуть також демонструвати такі переваги, але не у всіх варіантах здійснення, що входять в об'єм рівня техніки, повинні обов'язково демонструватися такі переваги або інші переваги, розкриті в даному винаході. Таким чином, дане розкриття і пов'язані з ними рівні техніки можуть включати інші варіанти здійснення, не показані і/або не описані в даному винаході явним чином.

З вищевикладеного слід розуміти, що конкретні варіанти здійснення даного винаходу були описані в ілюстративних цілях, але при цьому можна робити різні модифікації без відхилення від об'єму винаходу. Таким чином, даний винахід не обмежений нічим, крім прикладеної формули винаходу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини, що містить капсульні пневмококові полісахариди двох або більше серотипів, кожний з яких окремо кон'югований із пневмококовим поверхневим білком А адгезії (PsaA) або з комбінацією PsaA і CRM197 як білками-носіями, де щонайменше капсульні пневмококові полісахариди двох серотипів кон'юговані з PsaA і кон'югати адсорбовані на гелі фосфату алюмінію.

2. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за п. 1, причому композиція пневмококової вакцини є 10-валентною, 13-валентною, 14-валентною, 15-валентною, 17-валентною, 18-валентною, 19-валентною, 20-валентною, 22-валентною, 23-валентною, 24-валентною або 25-валентною композицією пневмококової вакцини.

3. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за п. 1 або 2, у якій кожний із пневмококових капсульних полісахаридів належить до одного або більше серотипів, вибраних із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45.

4. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-3, у якій відсоткове відношення білка-носія до пневмококового капсульного полісахариду (білок/ПС) становить від приблизно 0,5 до приблизно 2,0.

5. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-4, причому композиція пневмококової вакцини додатково містить фармацевтично прийнятний носій.
6. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-5, у якій пневмококові полісахариди містять щонайменше 10 пневмококових полісахаридів, і кожний
- 5 пневмококовий полісахарид вибраний із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, і білки-носії містять PsaA або комбінацію білків PsaA і CRM197.
7. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-6, причому композиція пневмококової вакцини містить щонайменше 14 пневмококових полісахаридів.
- 10 8. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-7, причому композиція пневмококової вакцини містить щонайменше 17 пневмококових полісахаридів.
9. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-8, причому композиція пневмококової вакцини містить щонайменше 19 пневмококових полісахаридів.
- 15 10. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-9, причому композиція пневмококової вакцини містить щонайменше 20 пневмококових полісахаридів.
11. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-10, причому композиція пневмококової вакцини містить щонайменше 22 пневмококових полісахариди.
12. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-11, причому композиція пневмококової вакцини містить щонайменше 24 пневмококових полісахариди.
- 20 13. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-12, у якій кожний із пневмококових полісахаридів вибраний із серотипів 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 і 45, і білком-носієм є PsaA або комбінація PsaA і CRM197.
14. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-13, причому композиція пневмококової вакцини є 14-валентною композицією пневмококової вакцини, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3 і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM197.
- 25 15. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-14, причому композиція пневмококової вакцини є 14-валентною композицією пневмококової вакцини, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3 і 6A кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM197.
- 30 16. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-15, причому композиція пневмококової вакцини є 15-валентною композицією пневмококової вакцини, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM197.
- 35 17. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-16, причому композиція пневмококової вакцини є 17-валентною композицією пневмококової вакцини, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B кон'юговані з CRM197.
- 40 18. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-17, причому композиція пневмококової вакцини є 20-валентною композицією пневмококової вакцини, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45 кон'юговані з CRM197.
- 45 19. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-18, причому композиція пневмококової вакцини є 22-валентною пневмококовою вакциною, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, причому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'юговані з CRM197.
- 50 20. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-19, причому композиція пневмококової вакцини є 22-валентною пневмококовою вакциною, яка містить пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому серотипи 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A, 15B, 22F,
- 60

34, 35B, 38 кон'юговані з PsaA, і серотипи 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F і 33F кон'юговані з CRM197.

21. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-20, причому композиція пневмококової вакцини є 24-валентною пневмококовою вакциною, яка містить
5 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'юговані з CRM197.

22. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-21, причому композиція пневмококової вакцини є 24-валентною пневмококовою вакциною, яка містить
10 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому серотипи 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A 15B, 16F 22F, 34, 35B, 38 кон'юговані з PsaA, і серотипи 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F і 33F кон'юговані з CRM197.

23. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини, що містить білок-носій і пневмококові полісахариди двох або більше серотипів, у якій серотипи вибрано з 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 22F і 19A, і білок-носій являє собою PsaA, де кон'югати адсорбовані на гелі фосфату алюмінію.

24. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини, що містить білок-носій і пневмококові полісахариди двох або більше серотипів, у якій серотипи вибрано з 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19F, 19A, 22F, 23F, 33F, 34, 35, 38 і 45, і білок-носій являє собою PsaA, де кон'югати адсорбовані на гелі фосфату алюмінію.

25. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-24, причому композиція пневмококової вакцини складена в стандартну лікарську форму.

26. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-25, у якій стандартна лікарська форма містить від приблизно 0,1 мкг до приблизно 50 мкг кожного із пневмококових полісахаридів, від приблизно 0,1 мкг до приблизно 10 мкг, або від приблизно 1 мкг до приблизно 5 мкг кожного із пневмококових полісахаридів, при цьому кожний із пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з білком-носієм, і кількість білка-носія становить від приблизно 1,5 мкг до приблизно 5 мкг.

27. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-26, що додатково містить фармацевтично прийнятний розріджувач, буфер, консервант, стабілізатор, ад'ювант і/або ліофілізувальний ексципієнт.

28. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-27, стандартна лікарська форма якої представлена у вигляді флакона з разовою дозою, флакона з декількома дозами або попередньо заповненого шприца.

29. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-28, причому композиція пневмококової вакцини представлена у вигляді разової дози 0,5 мл, яка містить:

40 один або більше пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 до 4,4 мкг; PsaA у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мкг, кон'югований з кожним з одного або більше пневмококових полісахаридів;

CRM197 у кількості від приблизно 1 мкг до приблизно 10 мкг, кон'югований з кожним з одного або більше пневмококових полісахаридів;

45 ад'ювант фосфат алюмінію в кількості від приблизно 0,2 мг до приблизно 1 мг; і ексципієнт.

30. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-29, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 13-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:

50 пневмококовий полісахарид, вибраний із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F і 33F, і кожний із пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM197,

при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:

55 кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM197 у кількості від приблизно 25 мкг до приблизно 30 мкг,

приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,

хлорид натрію, і

L-гістидиновий буфер.

31. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-30, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 14-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:
 пневмококовий полісахарид, вибраний із серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, і кожний із пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM197,
 при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:
 кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 35 мкг, приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,
 хлорид натрію, і
 L-гістидиновий буфер.
32. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-31, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 14-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:
 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, і кожний із пневмококових полісахаридів окремо кон'югований з PsaA або з комбінацією PsaA і CRM197,
 при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:
 кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA і CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 35 мкг, приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,
 хлорид натрію, і
 L-гістидиновий буфер.
33. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-32, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 15-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:
 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше серотипів з 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F і 33F кон'юговані з CRM197,
 при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить: кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг,
 PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг,
 CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг,
 приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,
 хлорид натрію, і
 L-гістидиновий буфер.
34. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-33, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 17-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:
 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B кон'юговані з CRM197,
 при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:
 кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг,
 CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 40 мкг,
 приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,
 хлорид натрію, і
 L-гістидиновий буфер.

35. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-34, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 20-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:

5 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B і 45 кон'юговані з CRM197,

при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:

10 кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг, приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,

15 хлорид натрію, і L-гістидиновий буфер.

36. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-35, причому композиція пневмококової вакцини являє собою 22-валентну композицію пневмококової вакцини, яка містить:

20 пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38 кон'юговані з CRM197,

25 при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:

кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг,

30 приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,

хлорид натрію, і L-гістидиновий буфер.

37. Мультивалентна композиція пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-36, причому композиція пневмококової вакцини є 24-валентною композицією пневмококової вакцини, яка містить: пневмококові полісахариди, вибрані із серотипів 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B і 38, при цьому щонайменше серотипи 3, 6A і 6B кон'юговані з PsaA, і один або більше із серотипів 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F і 35B кон'юговані з CRM197,

40 при цьому доза пневмококової вакцинної композиції становить приблизно 0,5 мл у лікарській формі стерильної рідини, що містить:

кожний із пневмококових полісахаридів у кількості від приблизно 2,2 мкг до приблизно 4,4 мкг, PsaA у кількості від приблизно 5 мкг до приблизно 20 мкг, CRM197 у кількості від приблизно 20 мкг до приблизно 50 мкг,

45 приблизно 0,125 мг елементарного алюмінію у формі фосфату алюмінію в кількості приблизно 0,5 мг,

хлорид натрію, і L-гістидиновий буфер.

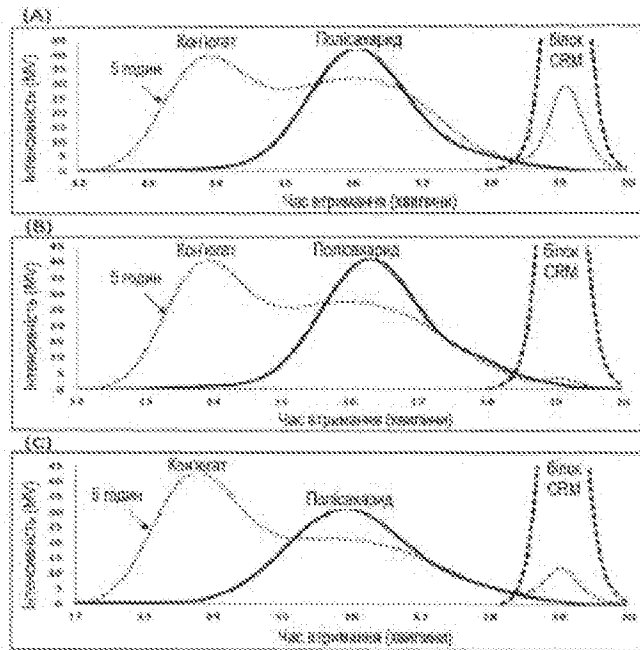
38. Спосіб лікування захворювання, обумовленого *Streptococcus pneumoniae*, у пацієнта, де зазначений спосіб включає введення пацієнтові композиції пневмококової вакцини за будь-яким із пп. 1-37, де захворювання є інвазивною пневмококовою інфекцією (IPD).

39. Спосіб за п. 38, у якому пацієнтом є людина.

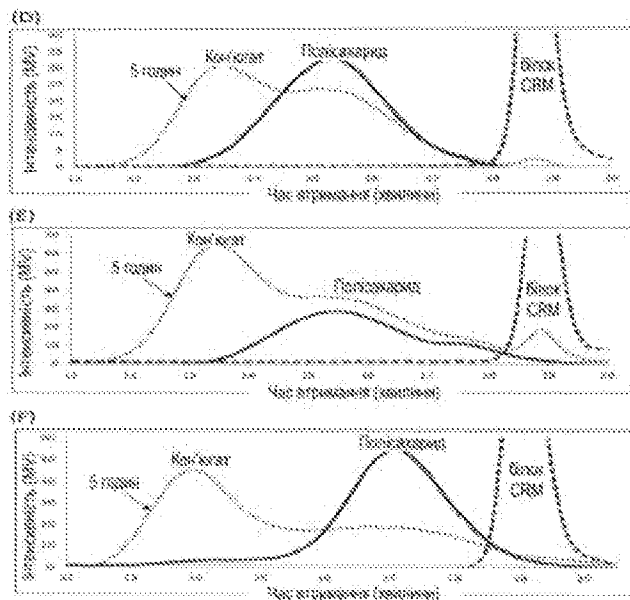
40. Спосіб за п. 39, у якому людиною є немовля (у віці приблизно менше 1 року), дитина раннього віку (від приблизно 12 місяців до приблизно 24 місяців), дитина молодшого дошкільного віку (від приблизно 2-х років до приблизно 5 років), дитина старшого дошкільного і 55 молодшого шкільного віку (від приблизно 5 років до приблизно 13 років), підліток (від приблизно 13 років до приблизно 18 років), доросла людина (від приблизно 18 років до приблизно 65 років) або людина старшого віку (старше приблизно 65 років).

41. Спосіб індукції імунної відповіді на кон'югат капсульного полісахариду *S. pneumoniae*, що включає введення пацієнтові імунологічно ефективної кількості композиції пневмококової 60 вакцини за будь-яким із пп. 1-37.

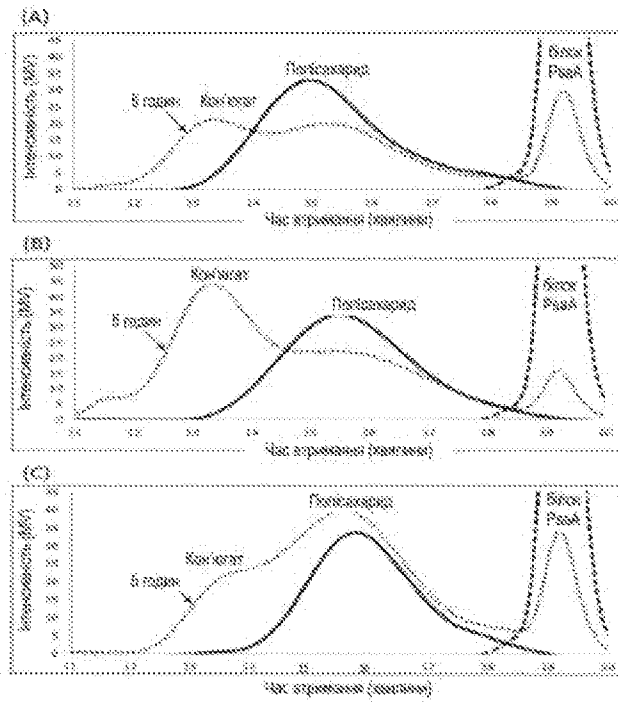
42. Спосіб за п. 41, що додатково включає складання кон'югата полісахарид-білок у композицію пневмококової вакцини, яка містить ад'ювант, ексципієнт і буфер.
43. Спосіб за п. 42, у якому ад'ювант являє собою фосфат алюмінію.



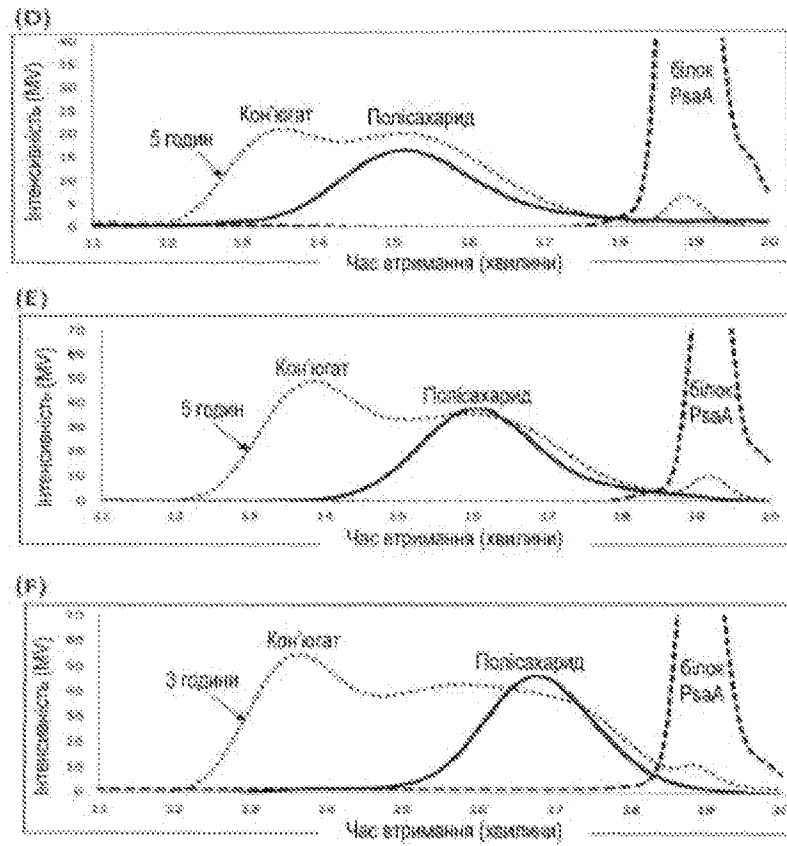
Фіг. 1



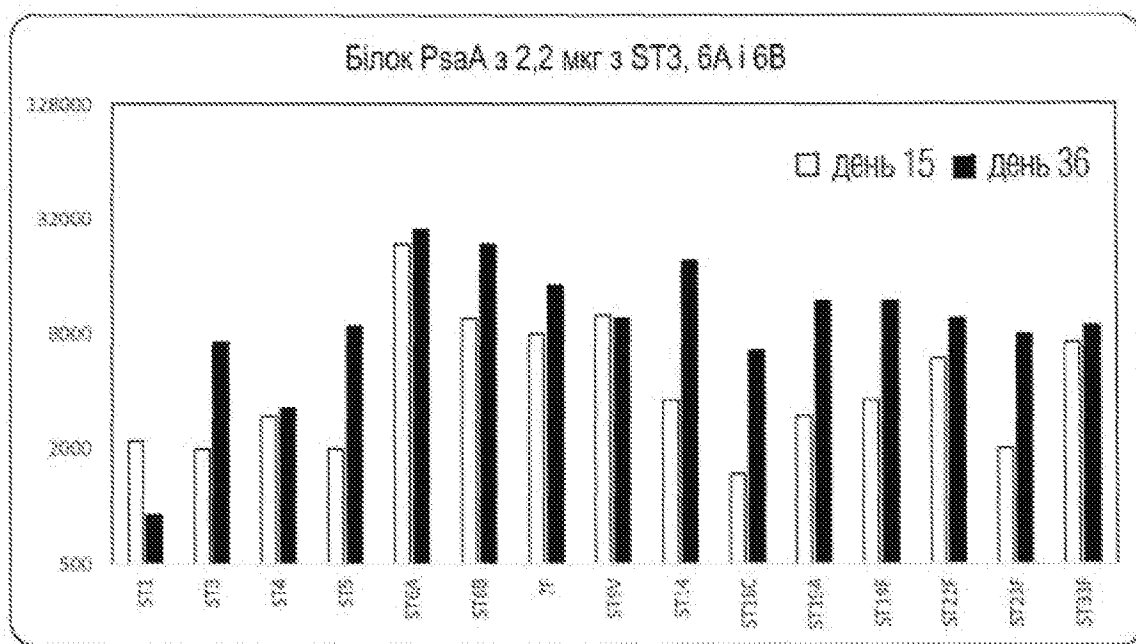
Фіг. 1 Продовження



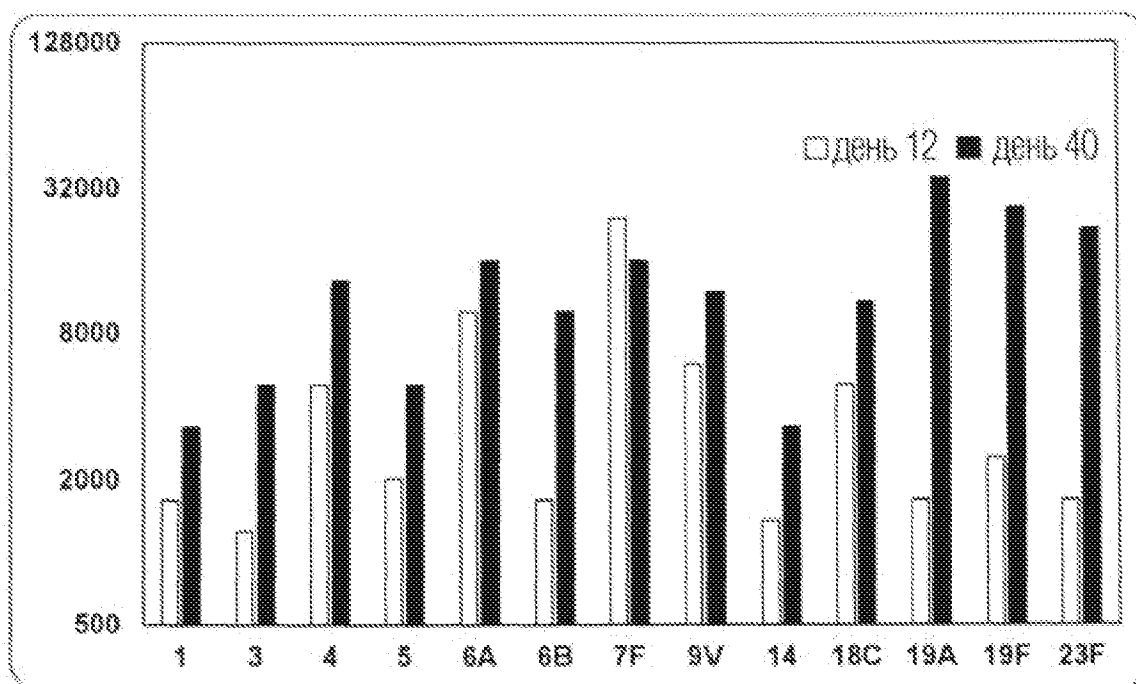
Фіг. 2



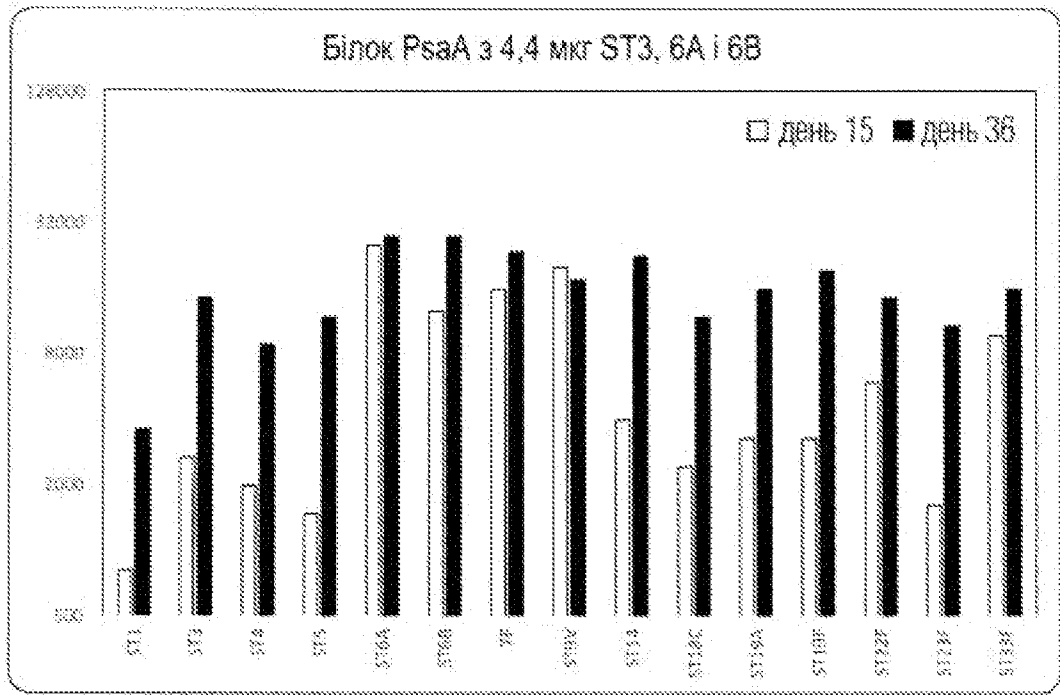
Фіг. 2 Продовження



Фиг. 3



Фиг. 4



Фіг. 5