

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043682**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.06.13

(21) Номер заявки

201900117

(22) Дата подачи заявки

2017.08.24(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)**(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИНА И СПОСОБ ЕЁ ПРОИЗВОДСТВА (ВАРИАНТЫ)**(31) **201621029037**(32) **2016.08.26**(33) **IN**(43) **2019.09.30**(86) **PCT/IB2017/055100**(87) **WO 2018/037365 2018.03.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**СЕРУМ ИНСТИТЮТ ОФ
ИНДИЯ ПРАЙВИТ ЛИМИТИД
(IN); СОЕДИНЕННЫЕ
ШТАТЫ АМЕРИКИ В ЛИЦЕ
СЕКРЕТАРЯ МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СОЦИАЛЬНОГО ОБСЛУЖИВАНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:

**Дхири Раджив Мхаласакант, Пизал
Самбхаджи Шанкар, Зади Джагдиш
Камаладжи, Сабали Раджендра
Нараян, Кадам Равинда Бапурао,
Камбли Абхайджит Санджив (IN),
Цзан Баомин, Гласс Роджер (US)**

(74) Представитель:

Шерстин А.Ю. (RU)(56) **WO-A2-2012093406**

WO-A1-2016063291

WO-A1-2008028956

BAOMING JIANG ET AL.: "Does a monovalent inactivated human rotavirus vaccine induce heterotypic immunity? : Evidence from animal studies", HUMAN VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, vol. 9, no. 8, 8 August 2013 (2013-08-08), pages 1634-1637, XP055430376, US ISSN: 2164-5515, DOI: 10.4161/hv.24958 abstract, page 1635, left-hand column, paragraph 2

ANDREASEN LARS VIBE ET AL.: "Aluminium hydroxide potentiates a protective Th1 biased immune response against polio virus that allows for dose sparing in mice and rats", VACCINE, vol. 33, no. 15, 17 February 2015 (2015-02-17), pages 1873-1879, XP029213345, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2015.02.011 abstract, page 1875-page 1877

WANG Y ET AL.: "Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 28, no. 33, 26 July 2010 (2010-07-26), pages 5432-5436, XP027171070, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-06-15] the whole document

WESTDIJK JANNY ET AL.: "Antigen sparing with adjuvanted inactivated polio vaccine based on Sabin strains", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 31, no. 9, 9 January 2013 (2013-01-09), pages 1298-1304, XP028970802, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2012.12.076, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к стабильной, иммуногенной комбинированной вакцине (вакцинам), содержащей смесь антигенов для предотвращения и профилактики инфекций, вызываемых ротавирусом, вирусом полиомиелита, Haemophilus influenzae, Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, Bordetella pertussis и вирусом гепатита В. В частности, в соответствии с настоящим изобретением предлагается поливалентная комбинированная вакцина, содержащая i) существенно пониженную дозу антигенов Солка ИПВ или Sabin ИПВ (ИПВ), полученных с использованием усовершенствованных методов инактивации путем воздействия формальдегида и адсорбции на гидроксиде алюминия, что приводит к максимальному извлечению D-антигена, и ii) пригодный для инъекционного введения инактивированный нагреванием ротавирусный антиген (антигены), полученный из штаммов ротавируса (CDC-9), который обеспечивает широкий перекрестный иммунитет к штаммам человеческого ротавируса, iii) конъюгат Хиб ПРФ-белок-носитель, имеющий повышенную стабильность и иммуногенность, при этом указанный конъюгат белка Хиб ПРФ-белок-носитель первоначально получают с использованием нового процесса конъюгации и затем смешивают при низкой температуре в присутствии стабилизатора для сведения к минимуму высвобождения свободного ПРФ, iv) цельноклеточный коклюшный антиген с повышенной иммуногенностью и стабильностью, полученный путем добавления цельноклеточного коклюшного антигена в смесь на более

B1**043682****043682****B1**

поздней стадии, что обеспечивает сведение к минимуму деградации путем гидролиза, v) гомогенные фракции дифтерийного анатоксина и столбнячного анатоксина, полученные путем удаления нежелательных агрегатов с использованием гель-проникающей хроматографии. Также в изобретении раскрывается способ изготовления такой стабильной и иммуногенной вакцины путем i) индивидуальной адсорбции антигенов ИПВ, ИРВ с пониженной дозой на гидроксиде алюминия и поддержания другого антигена (антигенов) в неадсорбированном состоянии, либо в адсорбированном на фосфате алюминия, гидроксиде алюминия, либо комбинации гидроксида алюминия и фосфата алюминия состоянии и ii) использования определенного порядка добавления антигенов во время смешивания.

043682 B1

043682 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к стабильной комбинированной вакцине (вакцинам), содержащей смесь антигенов для предотвращения и профилактики инфекций, вызываемых ротавирусом, вирусом полиомиелита, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* (цельноклеточный компонент) и вирусом гепатита В. В частности, настоящее изобретение относится к стабильной поливалентной комбинированной вакцине, содержащей существенно пониженную дозу антигенов Salk ИПВ или Sabin ИПВ (ИПВ) и пригодный для инъекционного введения инактивированный нагреванием ротавирусный антиген (антигены), полученный из штаммов ротавируса (CDC-9).

Предпосылки создания изобретения

Полиовирус проникает в нервную систему и может вызвать необратимый паралич в течение нескольких часов. В мире существует три типа полиовируса, т.е. Тип 1, Тип 2 и Тип 3.

Распространенность полиовируса была значительно снижена за счет применения оральной полиомиелитной вакцины (ОПВ) на основе живых ослабленных штаммов полиовируса Sabin. Однако ОПВ имеет ограничения для эпохи после искоренения заболевания. ОПВ содержит циркулирующие вакцинные полиовирусы (сVDPV), которые являются трансмиссивными и могут стать нейровирулентными (подобно диким полиовирусам), что приводит к паралитическому полиомиелиту, связанному с вакциной. Такие штаммы потенциально могут привести к повторному распространению полиовирусов по всему миру и свести на нет достижения в искоренении заболевания. Чтобы предотвратить появление циркулирующих вакцинных полиовирусов (сVDPV), Стратегическая консультативная группа экспертов ВОЗ (SAGE) рекомендовала введение, по меньшей мере, одной дозы инактивированной полиомиелитной вакцины (ИПВ) вместе с оральной полиомиелитной вакциной (ОПВ) в странах, которые в настоящее время используют ОПВ (см. World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, November 2012 - conclusions and recommendations. Wkly Epidemiol Rec 2013; 88:1-16; PMID:23311010).

В настоящее время ИПВ производят с использованием штамма дикого полиовируса типа, т.е. штамма Salk и более новых штаммов Sabin, которые получают из тех же аттенуированных штаммов Sabin, которые используют для производства живой аттенуированной вакцины ОПВ. Утвержденная стандартная доза вакцин против полиомиелита, вводимых внутримышечно (в/м) или глубоко подкожно (п/к), содержит антигены D в виде 40 единиц инактивированного полиовируса типа 1 (Mahoney), 8 единиц инактивированного полиовируса типа 2 (MEF-I) и 32 единиц инактивированного полиовируса типа 3 (Saukett) (например, Инфанрикс-ИПВ™). Однако ИПВ характеризуется высокой себестоимостью по сравнению с ОПВ, в основном из-за потребности в большем количестве вирусов на дозу; дополнительной последующей обработки (т.е. концентрирование, очистка и инактивация) и соответствующих испытаний контроля качества; потери антигена или низкого извлечения на последующих этапах обработки; а также сдерживания.

Согласно имеющимся оценкам, себестоимость ИПВ в настоящее время приблизительно в 20 раз превышает себестоимость ОПВ. В будущем во всем мире спрос на ИПВ после искоренения полиовирусов может возрасти с нынешнего уровня в 80 миллионов доз до 450 миллионов доз в год. Поэтому, для снижения конечной стоимости ИПВ, предпринимаются усилия в направлении уменьшения количества антигенных компонентов, т.е. делаются попытки производить вакцинные препараты с пониженной дозой ИПВ.

Во всем мире ротавирус является основной причиной тяжелой острой диареи, и вакцина является перспективным решением для снижения бремени болезни. Согласно оценкам, число смертей от ротавирусной инфекции в мире сократилось с 528000 до 215000 в течение тринадцати лет, с 2000 по 2013 год, поскольку вакцина против ротавируса была внедрена более чем в 60 странах. Из этого количества в 2013 году в Индии произошло 47100 (22%) смертей от ротавирусной инфекции. Индия, Нигерия, Пакистан и Демократическая Республика Конго - на эти четыре страны пришлось примерно половина (49%) всех случаев смерти от ротавирусной инфекции в 2013 году.

В недавних исследованиях, проведенных по всему миру, было показано, что 4 серотипа ротавируса, т.е. серотипы G1, G2, G3 и G4, представляют более 88% штаммов, проанализированных во всем мире. Серотип G1 ротавируса А является одной из наиболее распространенных форм вируса, которая вызывает заболевания по всему миру, тогда как вирусы серотипа G9 появились с конца 1990-х годов и в настоящее время представляют приблизительно 4% глобальных изолятов. Вакцинация против ротавирусной инфекции является одной из стратегий решения этой серьезной проблемы здравоохранения. Две зарегистрированные в настоящее время оральные ротавирусные вакцины, РотаТек и Ротарикс, которые очень эффективны в снижении частоты случаев тяжелой диареи среди детей в развитых странах и странах со средним уровнем дохода, являются гораздо менее действенными (~50%) в странах с низким уровнем дохода в Африке и Азии. (См. Tate JE et al. "Sustained decline in rotavirus detections in the United States following the introduction of rotavirus vaccine in 2006. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:S30-4; и Yen C et al. "Decline in rotavirus hospitalizations and health care visits for childhood diarrhea following rotavirus vaccination in El Salvador". *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:S6-10.) Кроме того, две существующие в настоящее время ротавирусные вакцины были связаны с риском инвагинации у вакцинированных детей. (См. Patel MM et al. "Intussusception risk and health benefits of rotavirus vaccination in Mexico and Brazil. *N Engl J Med* 2011; 364:2283-92 и But-

tery JP et al. "PAEDS/APSU Study Group. Intussusception following rotavirus vaccine administration: post-marketing surveillance in the National Immunization Program in Australia". *Vaccine* 2011; 29:3061-6.)

Одна из кандидатных ротавирусных вакцин компании Бхарат Биотек Интернешнл основана на штамме ротавируса 116E, G9P [11], который является природным реассортантом, содержащим один ген ротавируса крупного рогатого скота Р [11] и десять генов ротавируса человека. Защита, обеспечиваемая этой вакциной в течение первых 2 лет жизни, направлена против ряда циркулирующих генотипов, включая G1P [8], G2P [4], G12P [6], G12P [8] и G9P [4]. Таким образом, она не в состоянии обеспечить перекрестную защиту от других штаммов, таких как G3, G4, G5, G6, G8, G10, G11, G13 и G14. Помимо этого, эффективность вакцины, основанной на ротавирусе 116E, в первые 2 года жизни была умеренной (от 48 до 55%), как и для других зарегистрированных вакцин. (См. Nita Bhandari et al. "Efficacy of a monovalent human-bovine (116E) rotavirus vaccine in Indian children in the second year of life"; *Vaccine*. 2014 Aug 11;32 Suppl 1:A110-6.) Кроме того, доклинические испытания нескольких других предназначенных для внутримышечного введения кандидатных ИПВ, основанных на штаммах G1, G3 или G6, продемонстрировали только частичную защиту.

Также было показано, что инактивация ротавируса с помощью бета-пропиолактона (БПЛ), агента, широко используемого для инактивации многих вирусов, вызывает серьезные повреждения целостности и биохимического состава частиц ротавируса. Помимо этого, ротавирус, обработанный БПЛ, продемонстрировал пониженную гемагглютинирующую вирусную активность, внутримышечная инъекция такого материала мышам вызывала меньшее образование нейтрализующих антител, по сравнению с иммунизацией живым вирусом. (См. Offit PA et al "Noninfectious rotavirus (strain RRV) induces an immune response in mice which protects against rotavirus challenge". *J Clin Microbiol* 1989; 27:885-8.)

Во многих регионах мира иммунизация с применением ИПВ уже заменила иммунизацию с применением ОПВ, так что через несколько лет ротавирусная вакцина будет единственной вакциной, вводимой перорально, что увеличивает стоимость доставки. Таким образом, ряд эксплуатационных и логистических соображений говорит в пользу применения ИПВ как в развивающихся, так и в развитых странах.

Появление димеров в D/T, по-видимому, является следствием процесса детоксикации под действием формалина. Существование димеров может повлиять на эффективность процесса конъюгации - предположительно, за счет стерических препятствий на поверхности белка - что приводит к потере активности, поэтому считается желательным, чтобы уровень мономеров не опускался ниже 80%. Ранее сообщалось, что T, содержащий не менее 60% мономера, может быть получен с использованием хроматографии гидрофобных взаимодействий (ХГВ) с последующим ионным обменом; T с содержанием мономера 73% можно получить, используя только ХГВ-фенилсефарозу, T с содержанием мономера 55% можно получить, используя только сульфат аммония. Следовательно, необходим альтернативный одноэтапный метод для получения D/T с содержанием не менее 80% мономера.

Комбинированные вакцины создают следующим образом: берут две или более вакцины, которые можно вводить индивидуально, и объединяют их в одну композицию. Вакцины обеспечивают такую же защиту, какую они обеспечивали бы при введении в виде отдельных вакцин, но при меньшем количестве прививок. Таким образом, комбинированная вакцина обеспечивает иммуногенность против большего числа заболеваний и всегда является предпочтительной по сравнению с одновалентными вакцинами, так как соблюдение плана иммунизации увеличивается за счет сокращения количества отдельных прививок.

Компания Бхарат Биотек Интернешнл разрабатывает семивалентную комбинированную вакцину, которая включает D, T, бесклеточный коклюшный компонент, Sabin ИПВ (тип 1: 40 DU, тип 2: 8 DU, тип 3: 32DU), один штамм инактивированного ротавируса (штамм G9, т.е. штамм 116E), конъюгированную вакцину против *Haemophilus influenzae* типа b, конъюгат ПРФ со столбнячным анатоксином и рекомбинантную вакцину для профилактики гепатита В. Как обсуждалось ранее, такая семивалентная комбинированная вакцина, включающая в себя вакцину на основе 116E, не сможет обеспечить перекрестную защиту от других штаммов, таких как G3, G4, G5, G6, G8, G10, G11, G13 и G14. Помимо этого, эффективность указанного ИПВ-компонента комбинированной вакцины в первые 2 года жизни будет умеренной (от 48 до 55%), как и для других зарегистрированных вакцин.

Другая комбинированная вакцина, Нехуон® (также называемая Нехасима® и Нехахим®) компании Санофи Пастер, содержит аК. Эта вакцина, вероятно, будет предназначена для рынков частных покупателей в Европе и во всем мире. Еще одна шестивалентная комбинированная вакцина с антигеном аК в настоящее время находится в фазе III клинических исследований и является совместной разработкой компаний Мерк и Санофи Пастер.

В настоящее время вакцина Инфанрикс Гекса® компании ГСК является единственной на мировом рынке шестивалентной педиатрической комбинированной вакциной, содержащей ИПВ. Эта вакцина содержит ацеллюлярный коклюшный компонент (аК) и выпускается в форме "шприц плюс флакон с лиофилизатом" из-за нестабильности компонента Хиб. Основными препятствиями для использования вакцины Инфанрикс Гекса® (ГСК) в условиях развивающихся стран являются цена вакцинного препарата, требования к восстановлению лиофилизированной формы и сомнения по поводу эффективности вакцины аК в развивающихся странах. С точки зрения стоимости, стоимость антигенов аК исторически пре-

вышла стоимость антигенов цК в 10-30 раз из-за производственных различий и роялти. Таким образом, использование цельноклеточного коклюша (цК) в поливалентных комбинированных вакцинах, предназначенных для развивающихся стран, стало важным как из-за стоимости, так и из-за возникающих опасений относительно долгосрочной эффективности вакцин аК, особенно в условиях развивающихся стран.

Несколько поливалентных комбинированных вакцин, содержащих цК и ИПВ, находятся в стадии разработки. Однако антигены ИПВ не совместимы с обычным вакцинным консервантом тимеросалом, ртутьсодержащим соединением с антибактериальной активностью, которое приводит к тому, что капсид полиовируса теряет свою антигенность. Тимеросал используют многие производители вакцин для инактивации живых микроорганизмов *V. pertussis* для изготовления вакцинного материала цК, который переносится в готовый продукт, но также приводит к снижению антигенности ИПВ, поэтому ИПВ, может быть необходимо выпускать в отдельном флаконе, отдельно от тиомерсал-содержащего цК, для сохранения его активности с течением времени.

Имеется информация о том, что проходит несколько ранних клинических исследований цельноклеточной комбинированной вакцины компании ГСК (цКДС-ИПВ-ВГВ//Хиб). Однако иммуногенность полиовирусного компонента этого вакцинного препарата была не такой высокой, как у вакцины сравнения, также было обнаружено, что необходимая доза ИПВ будет, как минимум, такой же, как текущая стандартная доза вакцины ИПВ, или, возможно, ее потребуется увеличить.

Эффективные вакцинные препараты с уменьшенной дозой, которые обеспечивают защиту от инфекции с использованием более низкой дозы антигена ИПВ, желательны в ситуациях, когда поставки обычной вакцины являются недостаточными для удовлетворения глобальных потребностей, или когда стоимость производства обычной вакцины препятствует продаже вакцины по цене, которая доступна для развивающихся стран. Также воздействие более низкой дозы ИПВ, по сравнению с существующими на рынке вакцинными препаратами, может быть более безопасным.

Поливалентная комбинированная вакцина может упростить сложные графики плановой иммунизации детей, улучшить соблюдение графиков иммунизации и снизить расходы на доставку. Однако поливалентные вакцины, содержащие ИПВ, были технической проблемой для производителей вакцин с тех пор, как в начале 1990-х годов они начали работу по комбинированию детских вакцин.

Нестабильность антигена Хиб в присутствии алюминиевого адьюванта, а именно, алюминия гидроксида, является серьезной технической проблемой. Таким образом, техническая задача, которую производитель должен решить, заключается в том, чтобы избежать использования различных алюминиевых адьювантов, если вакцинный материал, который планируется использовать в комбинации, уже основан на различных соединениях алюминия. Таким образом, последовательность добавления антигенов становится важным фактором, поскольку смешивание несовместимых антигенов или адьювантов может привести к нежелательным физическим характеристикам конечного продукта (например, к образованию избыточного осадка и трудностям при ресуспендировании) [См. Malecker et al 1996, "Factors affecting the ability of experimental vaccines to protect guinea pigs against lethal challenge with Diphtheria Toxin"; presented at WHO/IABS/NIBSC International meeting on the control and standardization of Acellular pertussis Vaccines, UK, Sep 26-27 1996].

Известные и доступные в настоящее время комбинированные вакцины могут не содержать подходящих составов соответствующих антигенов в подходящих иммуногенных формах, достаточных для достижения желаемых уровней эффективности и иммуногенности в восприимчивой группе людей, для нескольких заболеваний в одной прививке. Что наиболее важно, отсутствуют доступные на коммерческой основе поливалентные комбинации с пониженной дозой ИПВ (ИПВ), обеспечивающим обширную перекрестную защиту ИПВ и цельноклеточным коклюшным компонентом (цК). Учитывая обсуждаемый выше сценарий в отношении комбинированных вакцин, остается явная потребность в доступной жидкой поливалентной комбинированной вакцине (вакцинах), подходящей для развивающихся стран, обеспечивающей эквивалентную или улучшенную серопротекцию для отдельных антигенов, без негативного взаимовлияния антигенов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к стабильной, иммуногенной комбинированной вакцине (вакцинам), содержащей смесь антигенов для предотвращения и профилактики инфекций, вызываемых ротавирусом, вирусом полиомиелита, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* и вирусом гепатита В. В частности, в соответствии с настоящим изобретением предлагается поливалентная комбинированная вакцина, содержащая i) существенно пониженную дозу антигенов Salk ИПВ или Sabin ИПВ (ИПВ), полученных с использованием усовершенствованных методов инактивации путем воздействия формальдегида и адсорбции на гидроксиде алюминия, что приводит к максимальному извлечению D-антигена, и ii) пригодный для инъекционного введения инактивированный нагреванием ротавирусный антиген (антигены), полученный из штаммов ротавируса (CDC-9), который обеспечивает широкий перекрестный иммунитет к штаммам человеческого ротавируса, iii) конъюгат Хиб ПРФ-белок-носитель, имеющий повышенную стабильность и иммуногенность, при этом указанный конъюгат белка Хиб ПРФ-белок-носитель первоначально получают с использованием нового процесса конъюгации и затем смешивают при низкой температуре в присутствии стабилизатора для сведения к

минимуму высвобождения свободного ПРФ, iv) цельноклеточный коклюшный антиген с повышенной иммуногенностью и стабильностью, полученный путем добавления цельноклеточного коклюшного антигена в смесь на более поздней стадии, что обеспечивает сведение к минимуму деградации путем гидролиза, v) гомогенные фракции дифтерийного анатоксина и столбнячного анатоксина, полученные путем удаления нежелательных агрегатов с использованием гель-проникающей хроматографии. Также в изобретении раскрывается способ изготовления такой стабильной и иммуногенной вакцины путем i) индивидуальной адсорбции антигенов ИПВ, ИРВ с пониженной дозой на гидроксиде алюминия и поддержания другого антигена (антигенов), либо в неадсорбированном состоянии, либо в адсорбированном на фосфате алюминия или гидроксиде алюминия, либо комбинации обоих веществ, состоянии и ii) использования определенного порядка добавления антигенов во время смешивания. Помимо этого, в соответствии с настоящим изобретением предлагается доступная комбинированная вакцина (вакцины), подходящая для развивающихся стран, обеспечивающая эквивалентную или улучшенную серопротекцию для отдельных антигенов, без негативного взаимовлияния антигенов.

Чертеж

На чертеже: очистка дифтерийного анатоксина - хроматограмма, полученная методом гель-фильтрационной хроматографии, Sephacryl S-300 HR, колонка ХК 26/70.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к поливалентной комбинированной вакцине (вакцинам), содержащей (i) характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус, выбираемый из штаммов sabin или salk; (ii) пригодные для инъекционного введения инактивированные штаммы ротавируса CDC-9; (iii) опционально, один или несколько антигенов, выбираемый из следующего списка: Д, С, цК, HBsAg, конъюгат Хиб ПРФ-белок-носитель, антиген(ы) *Neisseria meningitidis* А, антиген(ы) *Neisseria meningitidis* С, антиген(ы) *Neisseria meningitidis* W-135, антиген(ы) *Neisseria meningitidis* Y, антиген(ы) *Neisseria meningitidis* X, антиген(ы) *Streptococcus Pneumoniae*, мембранные пузырьки или очищенные антигены *Neisseria meningitidis* В, антиген(ы) *Staphylococcus*, сибирская язва, БЦЖ, антиген(ы) вируса гепатита А, антиген вируса гепатита В, вирус папилломы человека, антиген(ы) *Salmonella Typhi*, ацеллюлярный коклюш, модифицированная аденилатциклаза, антиген малярии (RTS,S), антигены возбудителей кори, эпидемического паротита, краснухи, вируса Денге, вируса Зика, вируса Эбола, вируса чикунгунья, японского энцефалита, диарейные антигены и т.д.

Компоненты, входящие в комбинированную вакцинную композицию

Инактивированный вирус полиомиелита.

Полиовирус (вирус полиомиелита) является высокоинфекционным вирусом. Полиовирус проникает в нервную систему и может вызвать необратимый паралич в течение нескольких часов. В мире существует три типа полиовируса, т.е. Тип 1, Тип 2 и Тип 3.

Первый вариант осуществления настоящего изобретения включает улучшенные способы инактивации полиовируса (штаммы salk или sabin) путем воздействия формальдегида в присутствии буфера ТРИС, которые приводят к максимальному извлечению D-антигена. Последующая адсорбция указанного ИПВ на гидроксиде алюминия обеспечивает существенное снижение дозы ИПВ в вакцинной композиции. В соответствии с настоящим изобретением предлагается улучшенный процесс инактивации под действием формалина и адсорбции на гидроксиде алюминия, в котором процент извлечения D-антигена после инактивации находится в диапазоне 50-80%, а процент адсорбции на гидроксиде алюминия находится в диапазоне 70-99%.

В соответствии с одним из аспектов первого варианта осуществления изобретения клетки CCL81-VERO (клетки почки обезьяны) использовали в качестве клеток-хозяев для выращивания полиовируса, т.е. штаммов sabin и salk. После заражения клеток-хозяев соответствующим штаммом полиовируса и инкубирования в течение 72 ч среду, содержащую вирус и клеточный дебрис, объединяли и собирали в один контейнер.

В соответствии со вторым аспектом первого варианта осуществления изобретения собранную среду подвергли серии фильтраций (фильтровальная установка с фильтрами с размером пор 6 мкм и 0,45 мкм); фильтрат был собран в стеклянный контейнер. Фильтрат подвергали фильтрации в тангенциальном потоке с использованием кассеты 100 кДа; диафильтрации с использованием фосфатного буфера и очистке с использованием анионообменной хроматографии.

В соответствии с третьим аспектом первого варианта осуществления изобретения очищенный пул вируса дополнительно подвергали буферному обмену из фосфатного буфера в Трис-буфер (от 30 до 50 мМ, pH 7-7,5) с использованием системы фильтрации в тангенциальном потоке (ФТП) (100 кДа, 0,1 м²) с последующим добавлением М-199 и 0,1-1,0% глицина.

В соответствии с четвертым аспектом первого варианта осуществления изобретения очищенный пул вируса в Трис-буфере подвергали инактивации под действием 0,01-1,0% формалина при непрерывном перемешивании вирусного материала и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 13 дней с промежуточной фильтрацией на 7 день. Далее инактивированный материал подвергали конечной фильтрации и затем хранили при температуре 2-8°C.

В соответствии с пятым аспектом первого варианта осуществления изобретения конечный очищен-

ный материал подвергали адсорбции на $Al(OH)_3$, при этом конечная концентрация алюминия (Al^{3+}) находилась в диапазоне 0,1-1,5 мг/доза, для доведения до необходимого объема был использован М-199+0,5% глицина, значение рН было установлено на уровне 6-7 с использованием 1 н. HCl/NaOH, с последующим перемешиванием в течение ночи при температуре 2-8°C.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что потеря D-антигена после инактивации формальдегидом была вызвана присутствием фосфатного буфера, который неожиданно вызывает нежелательную агрегацию полиовирусов. В соответствии с настоящим изобретением предлагается усовершенствованный процесс инактивации формальдегидом в присутствии буфера ТРИС, что обеспечивает минимальные эпитопные модификации и, следовательно, сводит к минимуму потерю D-антигена.

Инактивированный ротавирус.

Ротавирусы являются наиболее распространенной причиной тяжелых диарейных заболеваний у детей младшего возраста во всем мире. Оральные, живые, аттенуированные ротавирусные вакцины доступны по всему миру и считаются безопасными и эффективными в профилактике желудочно-кишечных заболеваний.

Второй вариант осуществления настоящего изобретения включает приготовление, очистку и рецептуру состава ротавирусного материала. Указанный способ получения пригодных для инъекционного введения инактивированных нагреванием ротавирусных антигенов, относящихся к новому штамму, т.е. CDC-9, предусматривает использование термической инактивации и адсорбции на адьюванте - гидроксиде алюминия.

В соответствии с первым аспектом второго варианта осуществления изобретения ротавирус культивировали с использованием клеток Vero (CCL-81) в качестве клеток-хозяев, собранный материал осветляли с использованием фильтровальной установки с фильтрами с размером пор 30 мкм и 2 мкм для удаления клеточного дебриса.

В соответствии со вторым аспектом второго варианта осуществления изобретения осветленный собранный материал обрабатывали бензоазой (2000-10000 ед./л) с инкубированием при температуре 37°C в течение 4 ч при непрерывным перемешиванием. В частности, используемая концентрация бензоазы составляла 5000 ед./л.

В соответствии с третьим аспектом второго варианта осуществления изобретения материал, обработанный бензоазой, подвергали концентрированию 10X и диафильтрации 4X с использованием буфера состава "HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса) +10% сорбита" и кассет 100 кДа.

В соответствии с четвертым аспектом второго варианта осуществления изобретения материал, полученный после диафильтрации, может быть опционально подвергнут диализу с использованием буфера для разведения и дополнительно очищен с использованием аффинной хроматографии, предпочтительно, с использованием целлуфина сульфата в качестве смолы для колоночной хроматографии.

В соответствии с пятым аспектом второго варианта осуществления изобретения был использован усовершенствованный способ термической инактивации ротавируса. Этот способ является быстрым, простым и позволяет поддерживать целостность и, таким образом, сохранять антигенность ротавирусных частиц. Температура, используемая для термической инактивации, находилась в диапазоне от 60°C до 70°C; время инкубирования находилось в диапазоне от приблизительно 10 мин до 24 ч включительно. Предпочтительно, время инкубирования находилось в диапазоне от приблизительно 30 мин до 10 ч. Более предпочтительно, инактивацию очищенного CDC-9 проводили с использованием нагревания при температуре 60°C в течение 5 ч с одной сменой контейнера через 2 ч. Инактивированный материал CDC-9 хранили при температуре -80°C до момента дальнейшего использования.

В соответствии с шестым аспектом второго варианта осуществления изобретения адсорбцию инактивированного ротавирусного антигена проводили на гидроксиде алюминия, при этом конечная концентрация алюминия (Al^{+++}) составляла от 0,2 мг/доза до 0,8 мг/доза.

Конъюгат *Haemophilus influenzae* b ПРФ-белок.

Haemophilus influenzae типа b является грамтрицательной бактерией, вызывающей менингит и острые респираторные инфекции, преимущественно у детей. Внешняя оболочка *H. influenzae* типа b состоит из полирибозил-рибитол-фосфата (ПРФ), полисахарида, который отвечает за вирулентность и иммунитет. ПРФ представляет собой гаптен, который считается слабо иммуногенным по природе, поэтому ПРФ ковалентно связан с белком-носителем для образования высокоиммуногенного антигена Хиб. Этот способ заменяет полисахарид с Т-независимого на Т-зависимый антиген и значительно повышает иммуногенность, особенно у маленьких детей.

Третий вариант осуществления настоящего изобретения включает приготовление конъюгата Хиб ПРФ-белок. Можно отметить, что белки-носители, используемые для конъюгации с антигеном Хиб, выбирают из группы, включающей следующие варианты: CRM₁₉₇ (перекрестно-реактивный материал 197, генетически детоксифицированная форма дифтерийного анатоксина), дифтерийный анатоксин, комплекс белков наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, фрагмент С столбнячного анатоксина, коклюшный анатоксин, белок *D. H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST, и эндотоксин *A. Pseudomonas aeruginosa*, комплекс белков наружной мембраны с (ОМРС), порины, белки, связывающиеся с трансферрином, пневмолизин,

пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis* и детоксифицированный фактор отека (EF) и фактор летальности (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин фиссуреллы (KLH), человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин (БСА) очищенное белковое производное туберкулина (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, коклюшные белки, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, включая множественные человеческие CD4+ Т-клеточные эпитопы из различных антигенов патогенов, такие как N 19, белки, захватывающие железо, токсин А или В *S. difficile* и белки *S. agalactiae* или их эквиваленты. Предпочтительно, белок-носитель, входящий в состав конъюгата, выбирают из СА или CRM₁₉₇.

В соответствии с первым аспектом третьего варианта осуществления изобретения антиген Хиб получают из капсульного полисахарида штамма *Haemophilus influenzae* типа b. Для получения полисахарида ПРФ бактерии *H. Influenzae* типа b выращивали в полусинтетической среде при определенных условиях температуры, перемешивания, оптической плотности и т.д. ПРФ представляет собой внешний мембранно-связанный полисахарид, который высвобождается в среду во время культивирования в условиях перемешивания. Отделенный от биомассы культуральный бульон содержит неочищенный ПРФ, который был подвергнут очистке путем осаждения с использованием поверхностно-активного вещества N,N,N-триметил-1-гексадеканаминия бромид, с последующим осаждением в градиенте этанола и фильтрацией. Готовый очищенный полисахарид ПРФ был подвергнут испытаниям на соответствие спецификациям, таким как содержание эндотоксинов, нуклеиновых кислот и белка, в соответствии с требованиями ВОЗ, Британской фармакопеи, Европейской фармакопеи, Индийской фармакопеи и т.д.

В соответствии со вторым аспектом третьего варианта осуществления изобретения был приготовлен конъюгат полисахарид-белок путем соединения полисахарида (ПРФ) с белком-носителем. Хиб ПРФ был конъюгирован с белком-носителем с использованием процесса конъюгации, состоящего из этапов, включая следующие: деполимеризация ПРФ с использованием щелочного буферного раствора для получения ПРФ с уменьшенным размером молекул; обработка цианилирующим агентом, таким как ЦДАП (1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат) для получения цианатного эфира; соединение активированного цианилированного полисахарида с аминок группой белка-носителя; очистка готового конъюгата с использованием ультрафильтрации.

Более предпочтительно, в качестве оптимального соотношения реагентов для реакции конъюгации, т.е. ПРФ, ЦДАП и CRM₁₉₇ было выбрано соотношение 1:1.5:1. Во время конъюгации очищенный полисахарид ПРФ был деполимеризован с использованием щелочного буферного раствора (0,4 М карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, pH 10,5±0,1) для получения ПРФ с уменьшенным размером молекул. ПРФ с уменьшенным размером молекул был обработан веществом ЦДАП (1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат) для цианилирования, с образованием цианатного эфира. Активированный цианилированный полисахарид был напрямую соединен с аминок группой белка-носителя CRM₁₉₇. Степень преобразования конъюгата Хиб подтверждали путем испытаний отбираемых образцов методом ВЭЖХ. Реакция конъюгации была остановлена после достижения необходимого уровня преобразования конъюгата, соответствующего спецификации "преобразование конъюгата Хиб не менее 65%", после достижения этого значения реакция конъюгации была остановлена путем прибавления глицина (2 М). Конъюгат Хиб ПРФ-CRM₁₉₇ был подвергнут дополнительной очистке путем ультрафильтрации через мембранные фильтры (300 кДа и 100 кДа) для удаления непрореагировавших реагентов и побочных продуктов. Готовый конъюгированный материал фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм и помещают на хранение при температуре 2-8°C.

В соответствии с третьим аспектом третьего варианта осуществления изобретения Хиб ПРФ конъюгирован с белком-носителем, при этом соотношение сахарид:белок (масса/масса) находится в диапазоне от 0,4 до 1; и содержание свободного ПРФ в готовом конъюгате Хиб ПРФ-белок составляет не более 5%, более предпочтительно, менее 2%.

Дифтерийный анатоксин (Д).

Дифтерия представляет собой инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Corynebacterium diphtheria*, которая поражает главным образом горло и верхние дыхательные пути и производит токсин, поражающий другие органы. Дифтерийный токсин является экзотоксином, секретлируемым *Corynebacterium diphtheria*, обладает антигенными свойствами и токсичен по своей природе. Для уменьшения токсичности токсин преобразуют в неактивный анатоксин, подвергая его инактивации. Способ инактивации может быть выбран из следующего списка: одна или нескольких обработок нагреванием, УФ, формалином/формальдегидом, ацетилэтиленимином и т.д. Для увеличения иммуногенности анатоксин адсорбируют на адьюванте. Таким образом, формируется анатоксин, способный индуцировать образование антител к токсину *C. diphtheria*. Присутствие димеров может привести к нежелательным реакциям.

В соответствии с четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения был приготовлен дифтерийный анатоксин.

В соответствии с первым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения дифтерийный

токсин (экзотоксин) был получен из *Corynebacterium diphtheria* и подвергнут детоксикации с использованием подходящего инактивирующего агента.

Примером подходящего инактивирующего агента является формальдегид.

В соответствии со вторым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения полученный дифтерийный анатоксин был очищен с использованием гель-фильтрационной хроматографии с использованием Sephacryl S-300 HR в качестве смолы с линейной скоростью потока 2-5 мл/мин. Полученный таким образом очищенный материал Д представляет собой гомогенную фракцию, не содержащую нежелательных агрегатов (см. чертеж) с содержанием мономерного дифтерийного анатоксина по меньшей мере 80-90%, в дальнейшем используемую для приготовления поливалентной вакцины (вакцин). Помимо этого, PLgel, Sephacryl S-200HR, Sephadex, Bio-Gel (поперечно-сшитый полиакриламид), агарозный гель и/или Styragel также могут быть использованы для очистки с использованием гель-проникающей хроматографии.

В соответствии с третьим аспектом четвертого варианта осуществления изобретения дифтерийный анатоксин адсорбировали на одной или нескольких солях алюминия, включая гидроксид алюминия и фосфат алюминия, предпочтительно, на фосфате алюминия.

Столбнячный анатоксин (С).

Столбняк представляет собой острое инфекционное заболевание, вызываемое токсигенными штаммами бактерии *Clostridium tetani* (*C. tetani*), грамположительной, спорообразующей, строго анаэробной бактерией. Столбнячный токсин является экзотоксином, секретируемым *Clostridium tetani*, обладает антигенными свойствами и токсичен по своей природе. Для уменьшения токсичности токсин преобразуют в неактивный анатоксин, подвергая его инактивации. Способ инактивации может быть выбран из следующего списка: одна или нескольких обработок нагреванием, УФ, формалином/формальдегидом, ацетилэтиленимином и т.д. Для увеличения иммуногенности анатоксин адсорбируют на адъюванте. Таким образом, формируется анатоксин, способный индуцировать образование антител к токсину *Clostridium tetani*. Присутствие димеров может привести к нежелательным реакциям.

В соответствии с пятым вариантом осуществления настоящего изобретения был приготовлен столбнячный анатоксин.

В соответствии с первым аспектом пятого варианта осуществления изобретения столбнячный токсин был получен из *Clostridium tetani* и подвергнут детоксикации с использованием подходящего инактивирующего агента. Примером подходящего инактивирующего агента является формальдегид.

В соответствии со вторым аспектом пятого варианта осуществления изобретения полученный столбнячный анатоксин был очищен с использованием гель-фильтрационной хроматографии с использованием Sephacryl S-300 HR в качестве смолы с линейной скоростью потока 2-5 мл/мин. Полученный таким образом очищенный материал С представлял собой гомогенную фракцию, не содержащую нежелательных агрегатов, с содержанием мономерного столбнячного анатоксина по меньшей мере 80-90%, в дальнейшем используемую для приготовления поливалентной вакцины. Помимо этого, PLgel, Sephacryl S-200HR, Sephadex, Bio-Gel (поперечно-сшитый полиакриламид), агарозный гель и Styragel также могут быть использованы для очистки с использованием гель-проникающей хроматографии.

В соответствии с третьим аспектом четвертого варианта осуществления изобретения столбнячный анатоксин адсорбировали на одной или нескольких солях алюминия, включая гидроксид алюминия и фосфат алюминия, предпочтительно, на фосфате алюминия.

Коклюшный антиген.

Коклюш (судорожный кашель) вызывается *Bordetella pertussis*, небольшой грамотрицательной кокобациллой, которая поражает слизистые оболочки дыхательных путей человека. Используются две формы вакцины: цельноклеточная коклюшная вакцина (цК) и ацеллюлярная коклюшная вакцина (аК). Цельноклеточные коклюшные вакцины представляют собой суспензии цельных микроорганизмов *B. pertussis*, которые были инактивированы, обычно с помощью формалина. Иммунизация вакциной цК является относительно недорогой и высокоэффективной. Кроме того, присутствие цК в комбинированных вакцинах действует как адъювант для многих других антигенных компонентов.

Ацеллюлярные коклюшные вакцины (аК) содержат очищенные компоненты *B. pertussis*, такие как инактивированный коклюшный токсин, отдельно или в сочетании с другими компонентами *B. pertussis*, такими как филаментозный гемагглютинин, фимбриальные антигены, пертактин и модифицированная аденилатциклаза. Ацеллюлярная коклюшная вакцина дает меньше нежелательных реакций, по сравнению с вакциной цК.

В соответствии с шестым вариантом осуществления настоящего изобретения вакцина против коклюша представляет собой коклюшный антиген, выбранный из одного или нескольких антигенов цельноклеточного коклюша или ацеллюлярного коклюша.

В соответствии с первым аспектом шестого варианта осуществления изобретения вакцина против коклюша представляет собой ацеллюлярный коклюшный антиген (один или несколько), выбранный из следующего списка: филаментозный гемагглютинин, фимбриальные антигены, пертактин и модифицированная аденилатциклаза. Ацеллюлярные коклюшные антигены могут быть экспрессированы в культуре подходящих клеток-хозяев использованием технологии рекомбинантной ДНК.

В соответствии со вторым аспектом шестого варианта осуществления изобретения вакцина против коклюша представляет собой цельноклеточный коклюшный антиген, состоящий из штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в определенном соотношении и впоследствии инактивированный с использованием улучшенных методов инаktivации без применения тимеросала; что приводит к снижению реактогенности и увеличению активности. Предпочтительно, антиген цК получают из штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229, смешанных в соотношении 1:1:0,25:0,25.

В соответствии с третьим аспектом шестого варианта осуществления изобретения способ инаktivации цК включает инаktivацию нагреванием при температуре $56 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида; при этом материал цК остается не комковатой и легко гомогенизируется, что приводит к снижению реактогенности и обеспечивает лучшую активность цК в течение более длительного периода времени.

Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg).

Гепатит В является потенциально опасной для жизни инфекцией печени, вызываемой вирусом гепатита В (ВГВ). Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) представляет собой поверхностный белок, который также действует в качестве иммуногена в высокоэффективных вакцинах для профилактики инфекции ВГВ. Белок HBsAg может быть рекомбинантно экспрессирован в подходящем микроорганизме-хозяине; или может быть выделен из плазмы крови пациента с хроническим гепатитом В/носителя.

В соответствии с седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения был приготовлен поверхностный антиген гепатита В (HBsAg).

В соответствии с первым аспектом седьмого варианта осуществления изобретения HBsAg экспрессировали в клетках дрожжей *Hansenula polymorpha* с использованием технологии рекомбинантной ДНК. В качестве клетки-хозяина для рекомбинантной экспрессии HBsAg также могут быть использованы другие дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae*.

В соответствии со вторым аспектом седьмого варианта осуществления изобретения антиген гепатита В (HBsAg) адсорбировали на одной или нескольких солях алюминия, включая гидроксид алюминия и фосфат алюминия, предпочтительно, на фосфате алюминия.

Двухвалентная комбинированная вакцинная композиция и способ ее приготовления

В соответствии с восьмым вариантом осуществления настоящего изобретения поливалентная вакцина представляет собой полностью жидкую двухвалентную комбинированную вакцину. Двухвалентная комбинированная вакцина включает инаktivированный полиовирус типа I, II и III; инаktivированный ротавирус (ИРВ).

В соответствии с первым аспектом восьмого варианта осуществления изобретения инаktivированный полиовирус выбирают из группы, включающей в себя штаммы Salk и Sabin; а концентрации отдельных ИПВ, основанных на штаммах Sabin Типа 1, Типа 2 или Типа 3, не превышают 20 единиц антигена D.

В соответствии со вторым аспектом восьмого варианта осуществления изобретения инаktivированный полиовирус представляет собой штамм Salk, концентрации отдельных ИПВ, основанных на штаммах Salk Типа 1, Типа 2 или Типа 3 выбирают из группы композиций доз включающей следующие варианты: 7,5-16-10, 8-2-5, 10-2-5, 10-2-10, 10-2-12, 10-2-16, 7,5-16-10, 5-2-5 единиц антигена D; более конкретно, концентрации отдельных ИПВ, основанных на штаммах Salk Типа 1, Типа 2 или Типа 3 выбирают из группы, включающей следующие варианты: 8-2-5 и 10-2-10 единиц антигена D.

В соответствии с третьим аспектом восьмого варианта осуществления изобретения инаktivированный полиовирус представляет собой штамм Sabin, концентрации отдельных ИПВ, основанных на штаммах Sabin Типа 1, Типа 2 и Типа 3 выбирают из группы композиций доз включающей следующие варианты: 5-16-10, 2,5-8-5, 5-8-10 единиц антигена D; более конкретно, концентрации отдельных ИПВ, основанных на штаммах Sabin Типа 1, Типа 2 и Типа 3 составляют 5-16-10 единиц антигена D.

В соответствии с четвертым аспектом восьмого варианта осуществления изобретения пригодный для инъекционного введения инаktivированный нагреванием ротавирус (ИРВ) представляет собой ротавирусный штамм CDC-9 или CDC-66, а концентрация ИРВ находится в диапазоне 5-50 мкг/доза, более конкретно, концентрация ИРВ составляет 10 мкг/доза.

В соответствии с пятым аспектом восьмого варианта осуществления изобретения двухвалентная композиция была приготовлена путем индивидуальной адсорбции материала ИПВ (штамм Sabin/Salk) и материала ИРВ на одной или нескольких солях алюминия, включая гидроксид алюминия и фосфат алюминия, предпочтительно, на гидроксиде алюминия. Затем индивидуальные одновалентные адсорбированные материалы ИПВ и ИРВ были смешаны друг с другом и помещены на качающуюся платформу при температуре $2-8^\circ\text{C}$ на 1-4 ч.

Шестивалентная комбинированная вакцинная композиция и способ ее приготовления

В соответствии с девятым вариантом осуществления настоящего изобретения полностью жидкая шестивалентная (цКДС-ИПВ-ИРВ-Хиб) вакцина была приготовлена следующим образом.

а) Была проведена индивидуальная адсорбция материала ИПВ (штамм Sabin/Salk) и материала ИРВ на гидроксиде алюминия, с последующим установлением значения pH на уровне 6,2-6,6.

b) Была проведена адсорбция Д на фосфате алюминия с последующим установлением значения рН на уровне 5,5-6,5 и добавлением С и смешивания путем перемешивания при комнатной температуре в течение 18-24 ч.

с) Растворы, полученные на этапе а и этапе b были смешаны, с последующим установлением значения рН на уровне 6,4 - 6,6 и перемешиванием при комнатной температуре в течение 60 мин.

d) К указанной выше смеси были добавлены цК и гистидин, с последующим перемешиванием в течение 60 мин и оставлением в статическом состоянии на ночь при температуре 2-8°C.

e) Конъюгат Хиб ПРФ и 2-феноксизтанол (2-ФЭ) были добавлены к смеси, полученной на этапе d, при температуре 2-8°C с последующим установлением значения рН на уровне 6,4-6,6.

f) NaCl и ВДИ (в достаточном количестве) были добавлены к смеси, полученной на этапе e, с последующим перемешиванием в течение 2 ч.

В соответствии с десятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую шестивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой шестивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *V. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса salk Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксизтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов десятого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов десятого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; СА присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве 10 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 2 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве 5 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с одиннадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую шестивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой шестивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *V. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса salk Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксизтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов одиннадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов одиннадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве 10 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве

2 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 или 16 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве 10 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с двенадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую шестивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой шестивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *B. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса sabin Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксиэтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов двенадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; алюминий (Al³⁺) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов двенадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве 5 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 16 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве 5 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с тринадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую шестивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой шестивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *B. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса sabin Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксиэтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов тринадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; алюминий (Al³⁺) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов тринадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве 5 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 16 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 5 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве 10 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

Семивалентная комбинированная вакцинная композиция и способ ее приготовления

В соответствии с четырнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения полностью жидкая семивалентная (цКДС-НВsAg-ИПВ-ИРВ-Хиб) вакцина была приготовлена следующим образом.

а) Была проведена индивидуальная адсорбция материала ИПВ (штамм Sabin/Salk) и материала ИРВ

на гидроксиде алюминия, с последующим установлением значения рН на уровне 6,2-6,6.

b) Была проведена адсорбция HBsAg на фосфате алюминия, с последующим установлением значения рН на уровне 6,0-6,5.

c) Была проведена адсорбция Д на фосфате алюминия, с последующим установлением значения рН на уровне 5,5-6,5 и добавлением С.

d) Растворы, полученные на этапах b и c, были объединены, с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 18-24 ч.

e) Были добавлены указанные выше смеси (полученные на этапах a и d), с последующим установлением значения рН на уровне 6,4-6,6 и перемешиванием при комнатной температуре в течение 60 мин.

f) К указанной выше смеси были добавлены цК и гистидин, с последующим перемешиванием в течение 60 мин и оставлением в статическом состоянии на ночь при температуре 2-8°C.

g) Конъюгат Хиб ПРФ и 2-ФЭ были добавлены к смеси, полученной на этапе d, при температуре 2-8°C, с последующим установлением значения рН на уровне 6,4-6,6.

h) NaCl и ВДИ (в достаточном количестве) были добавлены к смеси, полученной на этапе g, с последующим перемешиванием в течение 2 ч.

В соответствии с пятнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую семивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой семивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *V. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса salk Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксиэтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов пятнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 5-30 мкг; алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов пятнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве 10 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 2 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 или 16 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве 5 мкг, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве 12,5 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с шестнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую семивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой семивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *V. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса salk Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксиэтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов шестнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве,

находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 5-30 мкг; алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов шестнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма Salk Типа 1 присутствует в количестве 10 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 2 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 или 16 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве 10 мкг содержания ПРФ, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве 12,5 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с семнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую семивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой семивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *V. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса sabin Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); а также конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксиэтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов семнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 5-30 мкг; алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов семнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве 5 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 16 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве 5 мкг содержания ПРФ, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве 12,5 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксиэтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с восемнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция поливалентной вакцины представляет собой полностью жидкую семивалентную комбинированную вакцину. В состав полностью жидкой семивалентной вакцины входят дифтерийный анатоксин (Д); столбнячный анатоксин (С); инактивированный цельноклеточный антиген *V. pertussis* (цК); инактивированные штаммы полиовируса sabin Типа I, II и III; инактивированный ротавирус (ИРВ); конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и другие вспомогательные вещества, такие как адъювант на основе алюминия (фосфат алюминия, гидроксид алюминия), 2-феноксиэтанол, L-гистидин и ВДИ.

В соответствии с одним из предпочтительных аспектов восемнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 5-30 мкг; алюминий (Al^{3+}) присутствует в количе-

стве, находящемся в диапазоне 0,4-1,5 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

В соответствии с одним из наиболее предпочтительных аспектов восемнадцатого варианта осуществления изобретения поливалентная вакцинная композиция представляет собой семивалентную вакцинную композицию, в которой Д присутствует в количестве 22,5 Lf; С присутствует в количестве 7,5 Lf; цК присутствует в количестве 15 IOU; характеризующийся пониженной дозой инактивированный полиовирус штамма sabin Типа 1 присутствует в количестве 5 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве 16 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве 10 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM197 присутствует в количестве 10 мкг содержания ПРФ, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве 12,5 мкг; алюминий присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве 1,55 мг и ВДИ.

В соответствии с девятнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/состав комбинированной вакцины содержит один или более консервантов, выбираемых из группы, включающей бензетония хлорид (Фемерол), тиомерсал, фенол и 2-феноксизтанол (2-ФЭ). Более предпочтительно, композиция/состав комбинированной вакцины содержит 2-феноксизтанол (2-ФЭ) в качестве консерванта.

В соответствии с двадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/состав комбинированной вакцины содержит одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, выбираемых из группы, включающей сахара и полиолы, поверхностно-активные вещества, полимеры, соли, аминокислоты, модификаторы pH и т.д.

В соответствии с первым аспектом двадцатого варианта осуществления изобретения сахара и полиолы включают сахарозу, трегалозу, лактозу, мальтозу, галактозу, маннитол, сорбитол, глицерол и т.д. В соответствии со вторым аспектом двадцатого варианта осуществления изобретения поверхностно-активные вещества включают неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и т.д. В соответствии с третьим аспектом двадцатого варианта осуществления изобретения полимеры включают декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и т.д. Примеры солей могут включать NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂ и т.д. В соответствии с четвертым аспектом двадцатого варианта осуществления изобретения аминокислоты включают аргинин, глицин, гистидин и т.д. В соответствии с пятым аспектом двадцатого варианта осуществления изобретения модификаторы pH включают натрия, гидроксид, хлористоводородную кислоту и т.д.

В соответствии с двадцать первым вариантом осуществления настоящего изобретения значение pH композиции/состава готовой комбинированной вакцины находится в диапазоне значений pH от 6,0 до pH 7,5; более предпочтительно, в диапазоне значений pH от 6,2 до pH 7,2; и наиболее предпочтительно, в диапазоне значений pH от 6,4 до pH 6,6.

Примеры

Пример 1. Приготовление характеризующегося пониженной дозой инактивированного антигена полиовируса (Salk/Sabin).

Компания Serum Institute of India разработала способ инактивации и адсорбции инактивированного полиовируса в соответствии со следующим протоколом.

Клетки CCL81-VERO (клетки почки обезьяны) использовали в качестве клеток-хозяев для выращивания полиовируса, т.е. штаммов sabin и salk.

Очистка ИПВ.

Пул осветленной собранной культуральной жидкости подвергали концентрированию 10X с использованием системы фильтрации в тангенциальном потоке с кассетами 100 кДа (0,5 м²), и затем трехкратной диафильтрации с фосфатным буфером (40 mM, pH 7,0).

Концентрат был очищен методом ионообменной хроматографии (ИОХ) 10X концентрат после ФТП пропускали через смолу DEAE Sepharose для быстрого потока (слабая анионообменная смола), помещенную в колонку хк-26 с использованием системы Akta explorer (GE Healthcare). Отрицательно заряженные примеси связывались на колонке, тогда как полиовирус был собран в проходящем потоке с фосфатным буфером 40 mM.

Для сведения к минимуму потерь антигена в ходе весьма длительной процедуры инактивации (13 дней), очищенный пул вирусного материала подвергали буферному обмену из фосфатного буфера в ТРИС-буфер (40 mM, pH 7) с использованием системы ФТП [100 кДа, 0,1 м²]. Очищенный пул вирусного материала подвергали обмену с тремя объемами Трис-буфера.

Инактивация ИПВ.

К концентрированному 10X М-199 добавляли 0,5% раствор глицина для достижения итоговой концентрации 1X. К очищенному вирусному материалу был добавлен инактивирующий агент формалин (0,025%) при постоянном перемешивании. Инактивацию проводили при температуре 37°C при постоянном перемешивании в течение 13 дней, с проведением фильтрации через фильтр с размером пор 0,22 мкм на 7 и 13 день.

Результаты и выводы.

Когда методы инактивации формальдегидом проводили в присутствии фосфатного буфера, наблюдались существенные потери антигена D штаммов Sabin и Salk, однако было показано, что инактивация формальдегидом в присутствии Трис-буфера приводила к минимальным потерям антигена D.

	Содержание антигена D (40 мМ фосфатный буфер во время инактивации)	Содержание антигена D (40 мМ Трис-буфер во время инактивации)
Тип I	52,70 единиц антигена D/мл	408,19 единиц антигена D/мл
Тип II	22,63 единиц антигена D/мл	180,20 единиц антигена D/мл
Тип III	4,21 единиц антигена D/мл	21,50 единиц антигена D/мл

Пример 2. Приготовление пригодного для инъекционного введения инактивированного нагреванием ротавирусного антигена (IPV).

Был использован штамм ротавируса (CDC-9), раскрываемый в заявке на выдачу патента PCT № PCT/US 2010/034537, озаглавленной "Новые штаммы человеческого ротавируса и вакцины", поданной 12 мая 2010 года; и в заявке на выдачу патента PCT № PCT/US 2008/075239 озаглавленной "Термическая инактивация ротавируса", поданной 4 сентября 2008 года.

Центры контроля и профилактики заболеваний США (CDC) разработали метод инактивации ротавируса. CDC также разработали анализ для проведения испытаний на специфичные IgG к ротавирусу и нейтрализующие антитела.

Ротавирус (штамм CDC-9) культивировали с использованием клеток Vero (CCL-81) в качестве клеток-хозяев, собранный материал осветляли с использованием фильтровальной установки с фильтрами с размером пор 30+2 мкм для удаления клеточного дебриса.

Осветленный собранный материал обрабатывали бензоной (5000 ед./л) с инкубированием при температуре 37°C в течение 4 ч при непрерывном перемешивании.

Материал, обработанный бензоной, подвергали концентрированию 10X и диафильтрации 4X с использованием буфера состава "HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнкса) + 10% сорбита" и кассет 100 кДа.

Материал, полученный после диафильтрации, был подвергнут диализу с использованием буфера для разведения и дополнительно очищен с использованием аффинной хроматографии (со смолой целлуфина сульфат).

Инактивацию очищенного CDC-9 проводили с использованием нагревания при температуре 60°C в течение 5 ч с одной сменой контейнера через 2 ч. Инактивированный материал CDC-9 хранили при температуре -80°C до момента дальнейшего использования.

Пример 3. Очистка дифтерийного анатоксина.

Дифтерийный анатоксин был очищен с использованием гель-фильтрационной хроматографии с применением параметров процесса, указанных ниже.

Таблица 1

Параметры процесса

№	Параметр	Информация
1	Использованный нативный материал Д	--
2	Содержание (нативный материал Д) путем анализа	11 мг/мл

	Лоури	
3	LF/мл	3000
4	Метод очистки	Гель-фильтрационная хроматография (ГФХ)
5	Смола	Sephacryl S-300 HR
6	Использованная колонка	ХК 26/70 см
7	Высота слоя в колонке	~ 50 см
8	Линейная скорость потока	1 – 3 мл/мин.
9	Загрузка образца (Д)	4% от общего объема слоя в колонке
10	Сбор фракций	5 мл каждая (2 минуты)
11	Анализ	Анализ Лоури, определение LF, определение % мономера

Фракции с 6 по 11 были объединены и подвергнуты анализу для определения содержания мономера, (см. чертеж).

Результаты и интерпретация.

Было проведено множество циклов с использованием указанных выше параметров. Концентрат CRM₁₉₇ был использован в качестве маркера для сравнения % содержания мономера. Мономерный CRM₁₉₇ можно рассматривать как самую чистую форму ДА. Было показано, что процентное содержание мономера находилось в диапазоне 80-90%.

Таблица 2

% извлечения и содержание мономера для полученного очищенного ДА

№	Испытуемый образец	Концентрация белка (мг/мл)	% мономера	% извлечения
1	Нативный ДА	---	67,19	--
2	Нативный CRM	---	86,96	--

3	GFC DT FR 8	2,03	83,21	Вводимое количество ДА 120 мг
4	GFC DT FR 9	3,38	87,15	
5	GFC DT FR 10	4,08	87,24	
6	GFC DT FR 11	3,52	86,60	Полученное количество 75,1 мг (62,5%)
7	GFC DT FR 12	2,01	89,97	
8	GFC DT FR 10-11	3,83	86,03	31,6%
9	GFC DT FR 9-12	2,96	87,42	48,9%
10	GFC DT FR 7-13	2,19	86,24	63,3%

Пример 4. Очистка столбчатого анатоксина.

Столбчатый анатоксин был очищен с использованием гель-фильтрационной хроматографии / ХГВ (Phenyl Sepharose) с применением параметров процесса, указанных ниже.

Таблица 3

Параметры процесса

№	Параметр	Информация
1	Использованный нативный материал С	--
2	Содержание (нативный материал С) путем анализа Лоури	11 мг/мл
3	LF/мл	3000
4	Метод очистки	Гель-фильтрационная хроматография (ГФХ)
5	Смола	Sephacryl S-300 HR
6	Используемая колонка	ХК 26/70 см
7	Высота слоя в колонке	~ 50 см
8	Линейная скорость потока	1 – 3 мл/мин.
9	Загрузка образца (С)	4% от общего объема слоя в колонке
10	Сбор фракций	5 мл каждая (2 минуты)
11	Анализ	Анализ Лоури, определение LF, определение % мономера

Результаты.

Было проведено множество циклов с использованием указанных выше параметров. Было показано,

что процентное содержание мономера находилось в диапазоне 80-90%.

Пример 5. Приготовление конъюгата Хиб ПРФ-белок.

Полисахарид ПРФ был получен следующим образом.

Бактерии *H. influenzae* типа b выращивали в полусинтетической среде при определенных условиях температуры, перемешивания, оптической плотности и т.д. ПРФ представляет собой внешний мембранно-связанный полисахарид, который высвобождается в среду во время культивирования в условиях перемешивания. Отделенный от биомассы культуральный бульон содержит неочищенный ПРФ, который был подвергнут очистке путем осаждения с использованием поверхностно-активного вещества N,N,N-триметил-1-гексадеканаминия бромид, с последующим осаждением в градиенте этанола и фильтрацией. Готовый очищенный полисахарид ПРФ был подвергнут испытаниям на соответствие спецификациям, таким как содержание эндотоксинов, нуклеиновых кислот и белка, в соответствии с требованиями ВОЗ, Британской фармакопеи, Европейской фармакопеи, Индийской фармакопеи и т.д.

Конъюгат Хиб ПРФ-белок был приготовлен следующим образом.

Конъюгат полисахарида был приготовлен путем объединения полисахарида ПРФ с белком-носителем CRM₁₉₇. В качестве оптимального соотношения реагентов для реакции конъюгации, т.е. ПРФ, ЦДАП и CRM₁₉₇ было выбрано соотношение 1:1.5:1. Во время конъюгации очищенный полисахарид ПРФ был деполимеризован с использованием щелочного буферного раствора (0,4 М карбонатно-бикарбонатный буферный раствор, pH 10,5 0,1) для получения ПРФ с уменьшенным размером молекул. ПРФ с уменьшенным размером молекул был обработан веществом ЦДАП (1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат) для цианилирования, с образованием цианатного эфира. Активированный цианилированный полисахарид может, таким образом, быть напрямую соединен с аминок группой белка-носителя CRM₁₉₇. Степень преобразования конъюгата Хиб была подтверждена методом ВЭЖХ. Реакция конъюгации была остановлена после достижения необходимого уровня преобразования конъюгата, соответствующего спецификации "преобразование конъюгата Хиб не менее 65%", после достижения этого значения реакция конъюгации была остановлена путем прибавления глицина (2 М). Конъюгат Хиб ПРФ-CRM₁₉₇ был очищен путем ультрафильтрации через мембранные фильтры (300 кДа и 100 кДа) для удаления непрореагировавших реагентов и побочных продуктов. Готовый конъюгированный материал был профильтрован через фильтр с размером пор 0,22 мкм и помещен на хранение при температуре 2-8°C.

Были определены следующие характеристики качества антигенного конъюгата Хиб ПРФ-CRM₁₉₇:

содержание ПРФ (мг/мл): 1,49;

содержание белка (мг/мл): 2,98;

отношение (Ps : белок): 0,52;

свободный ПРФ (%): 1,77;

молекулярная масса белка (кДа): 983;

средняя молекулярная масса (кДа): 752.

Пример 6. Композиция двухвалентной (ИПВ-ИРВ) вакцины.

Компания Serum Institute of India разработала двухвалентную композицию, содержащую пониженную дозу инактивированного полиовируса и инактивированный ротавирус, в соответствии со следующим протоколом.

Композиция двухвалентной вакцины описана ниже.

Таблица 4

Композиция двухвалентной вакцины

Компоненты	Двухвалентная вакцина, состав I (Salk ИПВ + ИРВ)	Двухвалентная вакцина, состав II (Salk ИПВ + ИРВ)	Двухвалентная вакцина, состав III (Salk ИПВ + ИРВ)	Двухвалентная вакцина, состав IV (Sabin ИПВ + ИРВ)
Содержание антигена – ИПВ	Тип 1: ≥ 8 единиц антигена D/доза Тип 2: ≥ 2	Тип 1: ≥ 10 единиц антигена D/доза Тип 2: ≥ 2	Тип 1: ≥ 10 единиц антигена D/доза Тип 2: ≥ 2	Тип 1: ≥ 5 единиц антигена D/доза Тип 2: ≥ 16

	единиц антигена D/доза	единиц антигена D/доза	единиц антигена D/доза	единиц антигена D/доза
	Тип 3: ≥ 5 единиц антигена D/доза	Тип 3: ≥ 10 единиц антигена D/доза	Тип 3: ≥ 16 единиц антигена D/доза	Тип 3: ≥ 10 единиц антигена D/доза
Содержание антигена – ИРВ	Общий белок ≥ 10 мкг/доза	Общий белок ≥ 10 мкг/доза	Общий белок ≥ 10 мкг/доза	Общий белок ≥ 10 мкг/доза
Алюминий	0,8 мг/доза	0,8 мг/доза	0,8 мг/доза	0,8 мг/доза

Пример 7. Приготовление двухвалентной (ИПВ-ИРВ) вакцины.

Двухвалентная (ИПВ-ИРВ) вакцина была приготовлена в соответствии с процедурой, описанной ниже.

Адсорбция ИПВ.

Помещают необходимый объем $Al(OH)_3$ в резервуар.

Добавляют необходимый объем одновалентного материала ИПВ Salk/Sabin и дополняют разбавителем до достижения итогового объема.

Доводят значение pH готового состава до 6,5 с использованием 1 н. раствора NaOH/1 н. раствора HCl.

Помещают одновалентный материал в магнитную мешалку/на качающуюся платформу на ночь при температуре 2-8°C.

Адсорбция ИРВ.

Помещают необходимый объем $Al(OH)_3$ в резервуар.

Добавляют необходимый объем материала ИРВ и дополняют разбавителем до достижения итогового объема.

Доводят значение pH готового состава до 6,5 с использованием 1 н. раствора NaOH/1 н. раствора HCl.

Помещают одновалентный материал в магнитную мешалку/на качающуюся платформу на ночь при температуре 2-8°C.

Приготовление готового состава двухвалентной (ИПВ-ИРВ) вакцины.

Смешивают одновалентные материалы ИПВ и ИРВ.

Выдерживают при температуре 2-8°C на качающейся платформе в течение 2 ч.

Хранят готовый состав при температуре 2-8°C до момента дальнейшего использования.

Пример 8. Испытания эффективности двухвалентной вакцины.

Активность двухвалентной вакцины оценивали путем испытаний образцов сыворотки на содержание нейтрализующих антител к полиовирусу Sabin типа 1, 2 и 3, а также к ротавирусу штамма Wa с использованием анализов микронейтрализации. Титры нейтрализующих антител к полиовирусам указывают в формате Iog_2 . Титр нейтрализующих антител, равный 2,5 рассматривают как отрицательный. Для ротавируса титр нейтрализующих антител <20 рассматривают как отрицательный.

Таблица 5

	Идентификатор образца	Sabin 1		Sabin 2		Sabin 3		ИРВ (Wa)	
		Д0	Д42	Д0	Д42	Д0	Д42	Д0	Д42
Salk 8-2-5 + ИРВ 10 мкг	7А	2,5	6,17	2,5	10,5	2,5	7,83	< 20	320
	7В	2,5	4,5	2,5	7,17	2,5	2,5	< 20	1280
	8А	2,5	7,83	2,5	9,5	2,5	8,83	< 20	320
	8В	2,5	8,5	2,5	10,5	2,5	6,5	< 20	160
Salk 5-2-5 + ИРВ 10 мкг	9А	2,5	5,5	2,5	10,5	2,5	3,5	< 20	640
	9В	2,5	2,5	2,5	8,83	2,5	5,83	< 20	640
Sabin 5-16-10 + ИРВ 10 мкг	10А	2,5	7,5	2,5	9,5	2,5	6,5	< 20	640
	10В	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	10,5	< 20	320
	11А	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	10,5	< 20	640
	11В	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	9,17	< 20	640
Sabin 2,5-8-5 + ИРВ 10 мкг	12А	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	8,83	< 20	320
	12В	2,5	10,5	2,5	10,5	2,5	8,17	< 20	80
Живой ротавирус (Log 5,5 FFU)	15А	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	< 20	320
	15В	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	< 20	640
Отрицательно	17А	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	< 20	< 20
	17В	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	< 20	< 20
	контроль	6,5		4,83		4,17		< 20 (отрицательный контроль)	
		6,5		5,17		4,5		160 (положительный контроль 1)	
		6,17		5,5		4,5		1280 (положительный контроль 2)	
		5,83		4,5		5,5			

Числовые значения (например, 8-2-5) в столбце А обозначают единицы антигена D полиовируса Типов 1-2-3, соответственно. Каждая морская свинка (с 7А по 12В) получила три дозы комбинированной вакцины, содержащей ИРВ и 10 мкг антигена инактивированного ротавируса (ИРВ) в день 1, день 14 и день 28, образцы сыворотки были взяты в день 42. Морских свинок 15А и 15В, которые получили три дозы живого ротавируса (log 5,5 FFU или 10 мкг), рассматривали в качестве положительного контроля. В группе отрицательного контроля (17А и 17В) для иммунизации использовали только состав, содержащий алюминий без антигена.

Таблица 6

SNT для трехвалентной вакцины Salk+ротавирус доза 1 и доза 2											
Группа 7: Salk+ротавирус 8-2-5 (1 доза)				Группа 8: Salk+ротавирус 8-2-5 (2 доза)				Группа 9: Salk+ротавирус 5-2-5 (2 доза)			
Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	2	7	7	1	10	8	11	1	3	9	12
2	3	7	9	2	7	8	10	2	7	6	12
3	4	7	8	3	7	7	7	3	7	8	10
4	4	6	10	4	10	7	10	4	11	9	8
5	0	7	8	5	9	7	12	5	5	6	10
6	0	9	10	6	5	8	9	6	10	9	12
7	5	7	10	7	5	6	10	7	6	6	12
8	8	9	6	8	10	8	11	8	2	10	12
9	4	8	5	9	6	9	11	9	9	9	10
10	6	8	10	10	7	9	10	10	5	НЗ	НЗ

Таблица 7

SNT для трехвалентной вакцины Sabin+ротавирус доза 1 и доза 2											
Группа 10: Sabin+ротавирус 5-16-10 (1 доза)				Группа 11: Sabin+ротавирус 5-16-10 (2 доза)				Группа 12: Sabin+ротавирус 2,5-8-5 (2 доза)			
Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	7	4	11	1	8	7	12	1	5	4	11

2	10	5	11	2	5	7	НЗ	2	7	2	12
3	7	3	10	3	8	4	12	3	6	6	9
4	8	5	11	4	6	7	12	4	6	8	9
5	7	4	11	5	8	7	12	5	7	5	8
6	8	4	11	6	8	7	12	6	5	6	12
7	6	3	12	7	8	4	10	7	8	6	10
8	11	5	12	8	7	4	11	8	8	6	11
9	7	7	10	9	8	4	12	9	10	7	12
10	9	4	12	10	6	3	10	10	НЗ	НЗ	НЗ

Группа Коммерческий (доза 1)				Группа Коммерческий (доза 2)				Группа № 16			
13: Salk				14: Salk				Отрицательный контроль			
Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Крыс а №	Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	4	7	2	1	6	7	НЗ	1	0	0	0
2	0	4	6	2	3	8	11	2	0	0	0
3	0	6	5	3	1	7	8	3	0	0	0
4	4	8	9	4	7	8	9	4	0	0	0
5	0	7	3	5	2	5	7	5	0	0	0
6	3	6	3	6	7	8	10	6	0	0	0
7	3	6	6	7	7	6	9	7	0	0	0
8	0	4	6	8	12	7	9	8	0	0	0
9	5	8	5	9	10	9	11	9	0	0	0
10	0	4	5	10	5	8	7	10	0	0	0

Результаты и интерпретация.

1. Для двухвалентной вакцины (ИПВ+ИРВ) была получена значительно более высокая сероконверсия в день 42, по сравнению с днем 0.
2. Одинарная доза трехвалентного ИПВ Sabin, разработанного в СИЛ и содержащего 5:16:10 единиц антигена D с алюминием дает лучшую сероконверсию, по сравнению с коммерческим ИПВ.
3. Двойная доза трехвалентного ИПВ Sabin, разработанного в СИЛ и содержащего 2,5:8:5 единиц антигена D с алюминием дает превосходную сероконверсию, по сравнению с коммерческим ИПВ.
4. Одинарная доза трехвалентного ИПВ Salk, разработанного в СИЛ и содержащего 8:2:5 единиц антигена D с алюминием дает лучшую сероконверсию, по сравнению с коммерческим ИПВ.
5. Двойная доза трехвалентного ИПВ Sabin, разработанного в СИЛ и содержащего 5:2:5 единиц антигена D с алюминием дает превосходную сероконверсию, по сравнению с коммерческим ИПВ.

Пример 9. Композиции шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей пониженную дозу ИПВ, инактивированный ротавирус, Д, С, цК и конъюгат Хиб ПРФ-белок приведены ниже.

Таблица 8

Состав-1 шестивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Salk

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 1А	Состав 1В	Состав 1С	Состав 1D	Состав 1Е	Состав 1F	Состав 1G	Состав 1H
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf							
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf							
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU							
4	Инактивированный штамм Salk полиовируса								
	Тип I (единицы антигена D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Тип II (единицы антигена D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Тип III (единицы антигена D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг							
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> b ПРФ - CRM ₁₉₇	10 мкг содержания ПРФ							
7	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺							
8	2-феноксиэтанол	3,25 мг							
9	L-гистидин	1,55 мг							
10	ВДИ	В достаточном количестве							

Таблица 9

Состав-2 шестивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Salk

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 2А	Состав 2В	Состав 2С	Состав 2D	Состав 2Е	Состав 2F	Состав 2G	Состав 2H
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf							
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf							
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU							
4	Инактивированный штамм Salk полиовируса								
	Тип I (единицы антигена D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Тип II (единицы антигена D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Тип III (единицы антигена D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг							
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> б ПРФ-СА	5 мкг содержания ПРФ							
7	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺							
8	2-феноксиэтанол	3,25 мг							
9	L-гистидин	1,55 мг							
10	ВДИ	В достаточном количестве							

Таблица 10

Состав-3 шестивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Sabin

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 3А	Состав 3В	Состав 3С
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf		
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf		
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU		
4	Инактивированный штамм Sabin полиовируса			
	Тип I (единицы антигена D)	5	2,5	5
	Тип II (единицы антигена D)	16	8	8
	Тип III (единицы антигена D)	10	5	10
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг		
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> б ПРФ - CRM ₁₉₇	10 мкг содержания ПРФ		
7	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺		
8	2-феноксиэтанол	3,25 мг		
9	L-гистидин	1,55 мг		
10	ВДИ	В достаточном количестве		

Таблица 11

Состав-4 шестивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Sabin

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 4А	Состав 4В	Состав 4С
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf		
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf		
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU		
4	Инактивированный штамм Sabin полиовируса Тип I (единицы антигена D) Тип II (единицы антигена D) Тип III (единицы антигена D)			
		5	2,5	5
		16	8	8
		10	5	10
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг		
6	Конъюгат H. Influenzae b ПРФ-СА	5 мкг содержания ПРФ		
7	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺		
8	2-феноксизтанол	3,25 мг		
9	L-гистидин	1,55 мг		
10	ВДИ	В достаточном количестве		

Пример 10. Процесс приготовления композиций шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей пониженную дозу ИПВ, инактивированный ротавирус, Д, С, цК и конъюгат Хиб ПРФ-белок приведен ниже.

а) Была проведена индивидуальная адсорбция материала ИПВ (штамм Sabin/Salk) и материала ИРВ на гидроксиде алюминия, с последующим установлением значения рН на уровне 6,2-6,6.

б) Была проведена адсорбция Д на фосфате алюминия, с последующим установлением значения рН на уровне 5,5-6,5 и добавлением С и смешивания путем перемешивания при комнатной температуре в течение 18-24 ч.

в) Растворы, полученные на этапе а и этапе б, были смешаны, с последующим установлением значения рН на уровне 6,4-6,6 и перемешиванием при комнатной температуре в течение 60 мин.

г) К указанной выше смеси были добавлены цК и гистидин, с последующим перемешиванием в течение 60 мин и оставлением в статическом состоянии на ночь при температуре 2-8°C.

д) Конъюгат Хиб ПРФ и 2-ФЭ были добавлены к смеси, полученной на этапе г, при температуре 2-8°C, с последующим установлением значения рН на уровне 6,4-6,6.

е) NaCl и ВДИ (в достаточном количестве) были добавлены к смеси, полученной на этапе д, с последующим перемешиванием в течение 2 ч.

Конъюгат Хиб ПРФ-белок, приготовленный с использованием нового процесса конъюгирования и впоследствии подвергнутый смешиванию при низкой температуре в присутствии стабилизатора демонстрирует более высокую стабильность при минимальном высвобождении свободного ПРФ и повышенной иммуногенности. Помимо этого, добавление цельноклеточного коклюшного антигена в смесь на более поздней стадии обеспечивает сведение к минимуму дегградации путем гидролиза и обеспечивает получение стабильного и иммуногенного антигена цК.

Пример 11. Композиции шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей пониженную дозу ИПВ, инактивированный ротавирус, Д, С, цК, HBsAg и конъюгат Хиб ПРФ-белок приведены ниже.

Таблица 12

Состав-5 семивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Salk

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 5А	Состав 5В	Состав 5С	Состав 5D	Состав 5Е	Состав 5F	Состав 5G	Состав 5H
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf							
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf							
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU							
4	Инактивированный штамм Salk полиовируса								
	Тип I (единицы антигена D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Тип II (единицы антигена D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Тип III (единицы антигена D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг							
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> б ПРФ - CRM ₁₉₇	10 мкг содержания ПРФ							
7	Поверхностный антиген вируса гепатита В (HbsAg)	12,5 мкг							
8	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺							
9	2-феноксизтанол	3,25 мг							
10	L-гистидин	1,55 мг							
11	ВДИ	В достаточном количестве							

Таблица 7

Состав-6 семивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Salk

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 6А	Состав 6В	Состав 6С	Состав 6D	Состав 6Е	Состав 6F	Состав 6G	Состав 6H
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf							
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf							
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU							
4	Инактивированный штамм Salk полиовируса								
	Тип I (единицы антигена D)	10	7,5	8	10	10	7,5	5	10
	Тип II (единицы антигена D)	2	16	2	2	2	16	2	2
	Тип III (единицы антигена D)	10	10	5	5	12	10	5	16
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг							
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> б ПРФ-СА	5 мкг содержания ПРФ							
7	Поверхностный антиген вируса гепатита В (HbsAg)	12,5 мкг							
8	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺							
9	2-феноксизтанол	3,25 мг							
10	L-гистидин	1,55 мг							
11	ВДИ	В достаточном количестве							

Таблица 8

Состав-7 семивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Sabin

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 7А	Состав 7В	Состав 7С
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf		
2	Столбнячный анатоксин (СА)	7,5 Lf		
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU		
4	Инактивированный штамм Sabin полиовируса Тип I (единицы антигена D) Тип II (единицы антигена D) Тип III (единицы антигена D)	5 16 10	2,5 8 5	5 8 10
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг		
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> b ПРФ - CRM ₁₉₇	10 мкг содержания ПРФ		
7	Поверхностный антиген вируса гепатита В (HbsAg)	12,5 мкг		
8	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺		
9	2-феноксизтанол	3,25 мг		
10	L-гистидин	1,55 мг		
11	ВДИ	В достаточном количестве		

Таблица 9

Состав-8 семивалентной вакцины с пониженной дозой ИПВ Sabin

№	КОМПОНЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ВАКЦИНЫ	Состав 8А	Состав 8В	Состав 8С
1	Дифтерийный анатоксин (Д)	22,5 Lf		
2	Столбнячный анатоксин (С)	7,5 Lf		
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (цК)	15 IOU		
4	Инактивированный штамм Sabin полиовируса Тип I (единицы антигена D) Тип II (единицы антигена D) Тип III (единицы антигена D)	5 16 10	2,5 8 5	5 8 10
5	Инактивированный ротавирус (ИРВ)	10 мкг		
6	Конъюгат <i>H. Influenzae</i> b ПРФ-СА	5 мкг содержания ПРФ		
7	Поверхностный антиген вируса гепатита В (HbsAg)	12,5 мкг		
8	Содержание алюминия	Не более 0,9 мг Al ³⁺		
9	2-феноксизтанол	3,25 мг		
10	L-гистидин	1,55 мг		
11	ВДИ	В достаточном количестве		

Пример 12. Процесс приготовления композиций семивалентной комбинированной вакцины, содержащей пониженную дозу ИПВ, инактивированный ротавирус, Д, С, цК, HBsAg и конъюгат Хиб ПРФ-белок приведен ниже.

а) Была проведена индивидуальная адсорбция материала ИПВ (штамм Sabin/Salk) и материала ИРВ на гидроксиде алюминия, с последующим установлением значения pH на уровне 6,2-6,6.

б) Была проведена адсорбция HBsAg на фосфате алюминия, с последующим установлением значения pH на уровне 6,0-6,5.

в) Была проведена адсорбция Д на фосфате алюминия, с последующим установлением значения pH на уровне 5,5-6,5 и добавлением С.

г) Растворы, полученные на этапах в и с, были объединены, с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 18-24 ч.

е) Были добавлены указанные выше смеси [полученные на этапах а б д], с последующим установлением значения pH на уровне 6,4-6,6 и перемешиванием при комнатной температуре в течение 60 мин.

f) К указанной выше смеси были добавлены цК и гистидин, с последующим перемешиванием в течение 60 мин и оставлением в статическом состоянии на ночь при температуре 2-8°C.

g) Конъюгат Хиб ПРФ и 2-ФЭ были добавлены к смеси, полученной на этапе d, при температуре 2-8°C, с последующим установлением значения pH на уровне 6,4-6,6.

h) NaCl и ВДИ (в достаточном количестве) были добавлены к смеси, полученной на этапе g, с последующим перемешиванием в течение 2 ч.

Конъюгат Хиб ПРФ-белок, приготовленный с использованием нового процесса конъюгирования и впоследствии подвергнутый смешиванию при низкой температуре в присутствии стабилизатора демонстрирует более высокую стабильность при минимальном высвобождении свободного ПРФ и повышенной иммуногенности. Помимо этого, добавление цельноклеточного коклюшного антигена в смесь на более поздней стадии обеспечивает сведение к минимуму деградации путем гидролиза и обеспечивает получение стабильного и иммуногенного антигена цК.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированная вакцинная композиция, содержащая:

i) инактивированный полиовирусный (ИПВ) антиген, выбранный из штаммов Солка или Сэбина;

ii) инактивированный ротавирусный (ИРВ) антиген; и

iii) адъювант гидроксида алюминия;

в которой указанный инактивированный полиовирусный (ИПВ) антиген выбран из группы, включающей:

i. комбинацию штаммов Сэбина Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 5:16:10 единиц антигенов D;

ii. комбинацию штаммов Сэбина Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 2,5:8:5 единиц антигенов D;

iii. комбинацию штаммов Сэбина Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 5:8:10 единиц антигенов D;

iv. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 7,5:16:10 единиц антигенов D;

v. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 8:2:5 единиц антигенов D;

vi. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 10:2:5 единиц антигенов D;

vii. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 10:2:10 единиц антигенов D;

viii. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 10:2:12 единиц антигенов D;

ix. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 10:2:16 единиц антигенов D;

x. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 7,5:16:10 единиц антигенов D;

xi. комбинацию штаммов Солка Типа 1, Типа 2, Типа 3 в соотношении 5:2:5 единиц антигенов D;

при этом указанный инактивированный полиовирусный (ИПВ) антиген адсорбирован на адъюванте гидроксида алюминия, содержащего Al^{3+} в общей концентрации в диапазоне 0,4-1 мг/0,5 мл/доза, и с процентом адсорбации в диапазоне 70-99 %,

причем указанный инактивированный ротавирусный (ИРВ) антиген представляет собой пригодный для инъекционного введения инактивированный нагреванием ротавирус штамма CDC-9 с концентрацией, равной 10 мкг/доза, и адсорбирован на адъюванте гидроксида алюминия, содержащего Al^{3+} в общей концентрации в диапазоне 0,4-1 мг/0,5 мл/доза и с процентом адсорбации в диапазоне 70-99 %;

при этом она представляет собой двухвалентную вакцинную композицию.

2. Композиция по п.1, в которой комбинированная вакцина содержит по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, включающей дифтерийный анатоксин (Д), столбнячный анатоксин (С), цельноклеточный коклюшный компонент (цК), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), конъюгат *H. influenzae* типа b (Хиб) ПРФ-белок носитель.

3. Композиция по п.2, в которой антигены дифтерийный анатоксин (Д) и столбнячный анатоксин (С) адсорбированы на адъюванте - фосфате алюминия.

4. Композиция по п.2, в которой Д и С очищены с использованием гель-проникающей хроматографии со сволой, выбранной из группы, включающей Sephacryl S-300 HR, PLgel, Sephacryl S-200HR, Sephadex, Bio-Gel (агарозный гель на основе поперечно-сшитого полиакриламида) и Styragel.

5. Композиция по п.2, в которой коклюшный антиген представляет собой инактивированный цельноклеточный коклюшный компонент (цК), содержащий по меньшей мере один штамм *Bordetella pertussis* из следующего списка: 134, 509, 25525 и 6229, смешанных в соотношении 1:1:0,25:0,25.

6. Композиция по п.2, в которой антиген Хиб представляет собой полисахарид Хиб ПРФ, конъюгированный с белком-носителем с использованием конъюгации на основе цианилирования, в которой указанный цианилирующий реактив представляет собой 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторборат (ЦДАП); а белок-носитель представляет собой CRM₁₉₇ и, фрагмент С столбнячного анатоксина.

7. Композиция по п.2, в которой антиген HBsAg представляет собой поверхностный антиген вируса гепатита В и индивидуально адсорбирован на фосфате алюминия.

8. Композиция по п.2, в которой комбинированная вакцина содержит 2-феноксиэтанол консервант.

9. Композиция по любому из пп.1-8, которая представляет собой шестивалентную вакцинную композицию, содержащую дифтерийный анатоксин (Д), столбнячный анатоксин (С), цельноклеточный коклюшный компонент (цК), конъюгат Хиб ПРФ-белок носитель (Хиб В), инактивированный полиовирус-

находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-белок присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 5-30 мкг; общий алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1 мг/0,5 мл/доза; 2-феноксизтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5-5 мг и ВДИ.

16. Композиция по п.15, в которой Д присутствует в количестве около 22,5 Lf; С присутствует в количестве около 7,5 Lf; цК присутствует в количестве около 15 IOU; инактивированный полиовирус штамма Солка Типа 1 присутствует в количестве около 10 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве около 2 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве около 10 или 16 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве около 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве около 5 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве около 12,5 мкг; общий алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве около 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве около 1,55 мг и ВДИ.

17. Композиция по п.15, в которой Д присутствует в количестве около 22,5 Lf; С присутствует в количестве около 7,5 Lf; цК присутствует в количестве около 15 IOU; инактивированный полиовирус штамма Солка Типа 1 присутствует в количестве около 10 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве около 2 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве около 10 или 16 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве около 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве около 10 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве около 12,5 мкг; общий алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве около 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве около 1,55 мг и ВДИ.

18. Композиция по любому из пп.1-8, которая представляет собой семивалентную вакцинную композицию, содержащую дифтерийный анатоксин (Д), столбнячный анатоксин (С), цельноклеточный коклюшный компонент (цК), конъюгат Хиб ПРФ-белок носитель (Хиб В), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), инактивированный полиовирусный (ИПВ) антиген и инактивированный ротавирусный (ИРВ) антиген, в которой Д присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-50 Lf; С присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 Lf; цК присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 10-50 IOU; инактивированный полиовирус штамма Сэбина Типа 1 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 2 в диапазоне 1-20 единиц антигена D, Типа 3 в диапазоне 1-20 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-белок присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-20 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 5-30 мкг; общий алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,4-1 мг/0,5 мл/доза; 2-феноксизтанол присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 2-6 мг; L-гистидин присутствует в количестве, находящемся в диапазоне 0,5 - 5 мг и ВДИ.

19. Композиция по п.18, в которой Д присутствует в количестве около 22,5 Lf; С присутствует в количестве около 7,5 Lf; цК присутствует в количестве около 15 IOU; инактивированный полиовирус штамма Сэбина Типа 1 присутствует в количестве около 5 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве около 16 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве около 10 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве около 10 мкг; конъюгат *H. influenzae* типа b ПРФ-СА присутствует в количестве около 5 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве около 12,5 мкг; общий алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве около 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве около 1,55 мг и ВДИ.

20. Композиция по п.18, в которой Д присутствует в количестве около 22,5 Lf; С присутствует в количестве около 7,5 Lf; цК присутствует в количестве около 15 IOU; инактивированный полиовирус штамма Сэбина Типа 1 присутствует в количестве около 5 единиц антигена D, Типа 2 присутствует в количестве около 16 единиц антигена D, Типа 3 присутствует в количестве около 10 единиц антигена D; ИРВ присутствует в количестве около 10 мкг; конъюгат *H. Influenzae* типа b ПРФ-CRM₁₉₇ присутствует в количестве около 10 мкг содержания ПРФ; поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) присутствует в количестве около 12,5 мкг; общий алюминий (Al^{3+}) присутствует в количестве не более 0,9 мг; 2-феноксизтанол присутствует в количестве около 3,25 мг; L-гистидин присутствует в количестве около 1,55 мг и ВДИ.

21. Композиция по любому из пп.1-8 и 9-20, в которой инактивированный полиовирусный (ИПВ) и инактивированный ротавирусный (ИРВ) антигены индивидуально адсорбированы на гидроксиде алюминия; а другие антиген(ы), выбранные из группы, включающей столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин, цельноклеточный коклюшный компонент, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), ПРФ конъюгат *H. influenzae* типа b (Хиб В), находятся либо в неадсорбированном состоянии,

либо в адсорбированном на фосфате алюминия или гидроксиде алюминия, либо комбинации обоих веществ состоянии.

Ось X: Объем (мл)
Ось Y: УФ при 280 нм (МЕОП)

