

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045827**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.28

(21) Номер заявки
202190914

(22) Дата подачи заявки
2019.11.04

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/05 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ(31) **18204691.2**(32) **2018.11.06**(33) **EP**(43) **2021.08.03**(86) **PCT/EP2019/080120**(87) **WO 2020/094580 2020.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС СА (BE)**

(72) Изобретатель:
**Конторни Марио, Пицца
Марияграция, Сеуберт Аня (IT)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2014155294**

RENÉ H.M. RAEVEN ET AL.
"Immunoproteomic Profiling of Bordetella pertussis
Outer Membrane Vesicle Vaccine Reveals
Broad and Balanced Humoral Immunogenicity",
JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol.
14, no. 7, 2 June 2015 (2015-06-02), pages
2929-2942, XP055536638, ISSN: 1535-3893,
DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00258 materials and
methods - Vaccines; page 2930
EP-A2-2258387

NICOLE GUIISO: "Bordetella Adenylate
Cyclase-Hemolysin Toxins", TOXINS, vol. 9, no.
9, 11 September 2017 (2017-09-11), page 277,
XP55651017, DOI: 10.3390/toxins9090277, page 8

ANJA SEUBERT ET AL. "Genetically
detoxified pertussis toxin (PT-9K/129G): implications
for immunization and vaccines", EXPERT
REVIEW OF VACCINES, vol. 13, no. 10, 4
October 2014 (2014-10-04), pages 1191-1204,
XP055500811, GB ISSN: 1476-0584, DOI:
10.1586/14760584.2014.942641, page 1198, right-
hand column

Gianmarco Gasperini: "Approaches to
new generation vaccines against pertussis
and identification of new virulence
factors", DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
Ciclo XXIX, 1 December 2017
(2017-12-01), XP055650997, Retrieved from
the Internet: URL:<http://amsdottorato.unibo.it/8029/1/Gasperini%20-%20PhD%20thesis.pdf>, [retrieved on
2019-12-09], page 51, last paragraph, page 17

(57) Согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая везикулы наружной мембраны (OMV) и (а) бесклеточный коклюшный антиген, (б) столбнячный анатоксин и (в) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от *Bordetella pertussis*. Согласно изобретению также предложены композиции для использования в способе индуцирования иммунного ответа у пациента, включающем стадию введения пациенту композиции по изобретению.

B1**045827****045827 B1**

Область изобретения

Изобретение представляет собой изобретение в области комбинированных вакцин, то есть вакцин, содержащих смесь иммуногенов из более чем одного патогена, так что введение вакцины позволяет проводить одновременную иммунизацию субъекта против более чем одного патогена. Более конкретно, изобретение относится к бустерным вакцинам от дифтерии, столбняка и коклюша.

Предшествующий уровень техники

Вакцины, содержащие антигены из более чем одного патогенного микроорганизма в одной дозе, известны как "мультивалентные" или "комбинированные" вакцины. Комбинированные вакцины позволяют проводить пациентам меньшее количество инъекций, результатом чего может стать клиническое преимущество в форме большей приверженности к их применению (например, см. главу 29 источника информации [1]). Для применения у человека в ЕС и США одобрены различные комбинированные вакцины, включая тривалентные вакцины для защиты от дифтерии, столбняка и коклюша. Такие вакцины могут быть названы DТaP и TdaP. Несмотря на то, что DТaP и TdaP обе являются комбинированными вакцинами от дифтерии, столбняка и коклюша, DТaP-вакцины используют для первичной иммунизации, в то время как TdaP-вакцины используют для последующих бустерных вакцинаций. Первичные и бустерные вакцинные композиции различаются по дозе. Более конкретно, применительно к бустерным вакцинам, эти вакцины обычно содержат меньшие дозы некоторых антигенных компонентов, например, в BOOSTRIX содержание дифтерийного анатоксина в 10 раз меньше, чем в INFANRIX. На это указывает строчная буква "d", используемая для обозначения меньшего количества дифтерийного анатоксина.

Возможно также изменение соотношения антигенных компонентов. Например, соотношение дифтерийного и столбнячного анатоксинов составляет 2,5:1 в INFANRIX, но 1:2 в BOOSTRIX. Таким образом, доза дифтерийного анатоксина в этих бустерных вакцинах существенно снижена, как в абсолютных количествах, так и относительно содержания столбнячного анатоксина.

Тем не менее, в последние годы отмечен рост числа случаев заболевания, вызываемого *Bordetella pertussis*, даже в странах с широким охватом вакцинацией. Несмотря на то, что точные причины этого роста не ясны, они могут включать ослабление иммунитета и эпидемиологические изменения циркулирующих штаммов.

Таким образом, задача данного изобретения заключается в том, чтобы предложить дополнительные и улучшенные комбинированные вакцины для защиты от *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* и *Bordetella pertussis*. Задача данного изобретения также заключается в том, чтобы предложить дополнительные и улучшенные TdaP-вакцины, подходящие для применения у человека в качестве бустерных вакцин для взрослых людей, подростков и детей в возрасте четырех лет и старше, которым ранее проводили иммунизацию, предназначенную для детей.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретение основано на исследованиях комбинированных вакцин, содержащих везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*. Авторы изобретения обнаружили, что эти комбинированные вакцины приводят к титрам специфических антител к соответствующим антигенам при незначительном иммунологическом взаимодействии различных антигенов или без такого взаимодействия. Присутствие OMV *Bordetella pertussis* обеспечивает улучшенный гуморальный иммунный ответ против *Bordetella* и, неожиданно, также улучшает гуморальный иммунный ответ против других антигенов композиции.

Таким образом, в первом аспекте предложена иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от *Bordetella pertussis*. В частности, OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин. Более конкретно, OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Таким образом, согласно изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин, в частности генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Согласно изобретению также предложена иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, содержащие генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин, в частности PT-9K/129G, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Согласно изобретению также предложена иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, содержащие генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин, в частности PT-9K/129G, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G содержит две аминокислотные замены в субъединице S1, конкретно, R9K и E129G (см., например, EP096964). Таким образом,

еще более конкретно, OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G. Еще более конкретно, 100% коклюшного анатоксина в везикулах наружной мембраны представляют собой генетически детоксифицированный PT, в частности PT-9K/129G.

В некоторых воплощениях OMV *Bordetella pertussis*, используемые в изобретении, имеют модифицированную структуру липида А без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры. В некоторых воплощениях штамм *Bordetella pertussis*, из которого получены OMV, содержит нокаут *ArnT*, в частности делецию гена, кодирующего *ArnT* (Δ *ArnT*). Таким образом, OMV, используемые в изобретении и имеющие происхождение от таких штаммов, могут иметь модифицированную структуру липида А без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры.

В частности, OMV, используемые в изобретении, не обрабатывают формальдегидом, формалином, глутаровым альдегидом, перекисью водорода или их комбинацией. Более конкретно, OMV, используемые в изобретении, не подвергают химической детоксификации посредством обработки формальдегидом, формалином, глутаровым альдегидом, перекисью водорода или их комбинацией.

Подходящие бесклеточные коклюшные антигены включают детоксифицированный коклюшный токсин (PT), филаментный гемагглютинин (FHA), пертактин (PRN), фимбриальный белок 2 (FIM2), фимбриальный белок 3 (FIM3) и их комбинации. В определенных воплощениях бесклеточный коклюшный антиген содержит по меньшей мере два, например по меньшей мере три, антигена, выбранные из группы, состоящей из детоксифицированного коклюшного токсина (PT), филаментного гемагглютинина (FHA), пертактина (PRN), фимбриального белка 2 (FIM2), фимбриального белка 3 (FIM3). Конкретные комбинации бесклеточных коклюшных антигенов для использования в изобретении включают: (1) PT, FHA и PRN; (2) PT, FHA, PRN, FIM2 и FIM3; (3) PT и FHA; и (4) PT, FHA, FIM2 и FIM3.

В частности, иммуногенная композиция представляет собой вакцину. Более конкретно, вакцина предназначена для введения человеку. Вакцина может быть предназначена для первичной иммунизации. Еще более конкретно, вакцина предназначена для применения в качестве бустерной вакцины, например, при вторичной иммунизации. Даже еще более конкретно, дифтерийный анатоксин присутствует в концентрации от приблизительно 4 Lf (единиц флоккуляции)/мл до приблизительно 8 Lf/мл. Более конкретно, дифтерийный анатоксин присутствует в концентрации приблизительно 2 Lf на дозу 0,5 мл, приблизительно 2,5 Lf на дозу 0,5 мл, приблизительно 3 Lf на дозу 0,5 мл, приблизительно 3,5 Lf на дозу 0,5 мл или приблизительно 4 Lf на дозу 0,5 мл. Столбнячный анатоксин может присутствовать в концентрации приблизительно 5 Lf на дозу 0,5 мл.

В частности, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин присутствуют в соотношении "столбнячный анатоксин : дифтерийный анатоксин" от 1,5:1 до 2,5:1 (при измерении в Lf-единицах), например приблизительно 2:1 (при измерении в Lf-единицах).

Иммуногенная композиция может содержать адъювант, в частности адъювант на основе соли алюминия.

Во втором аспекте изобретения предложена иммуногенная композиция для применения в способе индуцирования иммунного ответа у пациента, включающем стадию введения пациенту иммуногенной композиции по настоящему изобретению.

В третьем аспекте изобретения предложен способ изготовления иммуногенной композиции по настоящему изобретению, включающий смешивание первого компонента, содержащего везикулы наружной мембраны (OMV), и второго компонента, содержащего бесклеточный коклюшный антиген, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин. В определенных воплощениях третьего аспекта изобретения OMV первого компонента лиофилизированы, а второй компонент содержит антигены в водной форме. Таким образом, способ может дополнительно включать стадию восстановления лиофилизированных OMV первого компонента водными антигенами второго компонента.

В четвертом аспекте изобретения предложен набор для приготовления иммуногенной композиции по настоящему изобретению, содержащей первый компонент, содержащий OMV, и второй компонент, содержащий бесклеточный коклюшный антиген, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин, где эти два компонента находятся в отдельных контейнерах. В определенных воплощениях четвертого аспекта изобретения OMV первого компонента лиофилизированы, а второй компонент содержит антигены в водной форме.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Реактогенность вакцинных штаммов W28 9K/129G Δ *ArnT* в сравнении с W28 9K/129G *in vitro*. Фиг. 1(a) получена в результате анализа с репортерным геном люциферазы на предмет активации hTLR4 под действием W28 9K/129G (Bp WT) и W28 9K/129G *arnTKO* (Bp Δ *ArnT*). Для стимуляции клеток HEK293 использовали различные концентрации бактерий, показана кратность индуцирования в сравнении с PBS. Фиг. 1(b): ELISA для выявления IL-6 в супернатантах человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) после стимуляции различными концентрациями бактерий.

Фиг. 2: OMV, полученные из вакцинных штаммов, содержат ФНА, 69К и бесклеточные коклюшные антигены РТ. Вестерн-блоты титрованных стандартов очищенных ФНА, 69К и субъединиц бесклеточного коклюшного антигена РТ, внесенных в указанных количествах вместе с 1 мкг OMV из штаммов W28 РТ 9К/129G (WT) и W28 РТ 9К/129G arnТКО (Δ arnТ), полученные иммунным окрашиванием антисыворотками против ФНА, против 69К и против РТ.

Фиг. 3: Иммунизация с использованием OMV приводит к низким уровням антител против aP-антигена у мышей. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно с использованием 2,5 мкг OMV из W28 РТ 9К/129G (BP-OMV (WT)) и W28 РТ 9К/129G arnТКО (BP-OMV (Δ Arnt)) 3 раза с интервалом 3 недели. Несмотря на то, что после 1-й иммунизации удалось выявить только антитела против 69К, низкие уровни всех 3 антигенов (ФНА, 69К и РТ) поддавались выявлению после второй и третьей дозы с использованием анализа Luminex. Фиг. 3(a): титры IgG против ФНА. Фиг. 3(b): титры IgG против 69К. Фиг. 3(c): титры IgG против РТ.

Фиг. 4: Иммунизация TdaP в комбинации с OMV приводит к значимо более высоким уровням антител против большинства вакцинных антигенов по сравнению с TdaP самой по себе.

Мышей иммунизировали внутримышечно с использованием TdaP (1/5 дозы, применяемой у человека) в комбинации или без комбинации с 2,5 мкг OMV из штамма W28 РТ 9К/129G arnТКО, и после двух иммунизаций собирали и анализировали сыворотки для измерения уровней антител к каждому из антигенов TdaP с использованием анализа Luminex. ***р менее 0,001, **р менее 0,01, *р менее 0,05.

Фиг. 5: OMV приводят к выработке антител, ингибирующих адгезию *V. pertussis* на эпителиальных клетках *in vitro*, аналогично wP-вакцине. Сыворотки, полученные от 10 мышей каждой группы, иммунизированных с использованием OMV (от W28 9К/129G arnТКО), целых бактерий (W28 9К/129G arnТКО) TdaP-вакцины или гидроксида алюминия в качестве контроля (Nil), объединяли, проводили их серийное разведение в инфекционной среде и инкубировали с мечеными *V. pertussis* BP536 дикого типа в течение 1 ч. Клетки A549 затем инфицировали смесями бактерий/сывороток в течение 1 ч и после обильных промывок для удаления несвязанных бактерий проводили количественный анализ бактерий, связанных с клетками, посредством считывания флуоресценции при Ex/Em 485/535 нм. Результаты представлены как среднее плюс/минус SD одного репрезентативного из трех независимых экспериментов, каждый из которых проводили в трех повторах.

Фиг. 6: OMV приводят к сильному защитному ответу, сходному с wP-вакцинным стандартом, на интракраниальное контрольное заражение *V. pertussis* в тесте Кендрик. Мышей иммунизировали однократно внутрибрюшинно цельноклеточной вакциной или OMV-композициями и через 2 недели после иммунизации проводили контрольное заражение суспензией штамма *V. pertussis* 18323, вводимой интракраниально. Приведена выживаемость мышей через 2 недели после заражения согласно тесту Кендрик на эффективность с интракраниальным контрольным заражением. Вакцинные композиции включают цельноклеточную коклюшную wP-вакцину (стандарт) в дозе 1/10, 1/50 и 1/250 дозы, применяемой у человека, и OMV из штамма W28 9К/129G (OMV) в указанных дозах.

Фиг. 7: Титры ФНА-специфичных общего IgG (фиг. 7(a)) и IgG2c (фиг. 7(b)) в сыворотке пропорциональны дозе OMV-вакцины. ФНА-специфичные антитела, присутствовавшие в сыворотке иммунизированных мышей на сутки заражения, анализировали посредством ELISA. ***р менее 0,001, **р менее 0,01, *р менее 0,05, n.s. - незначимо. Фиг. 7(c): Однократная иммунизация с использованием OMV стимулирует Th1/Th17-ответы, специфичные в отношении *V. pertussis*. Клетки селезенки (2×10^6 /мл) от вакцинированных мышей C57BL6 культивировали в присутствии обработанных ультразвуком *V. pertussis* (SBP, 5 мкг/мл). Через 72 часа концентрацию IFN γ (Th1-индикатор), IL-13 (Th2-индикатор) и IL-17 (Th17-индикатор) в супернатантах анализировали посредством ELISA. ***р менее 0,001.

Фиг. 8: Скорость клиренса *V. pertussis* из легких прямо пропорциональна дозе OMV-вакцины. Мышей C57BL6 иммунизировали с использованием PBS, wP, OMV 0,4, OMV 2 или OMV 10 за 3 недели до заражения. Затем мышей инфицировали вирулентным штаммом *V. pertussis* (Bp338) и количество бактерий в легких оценивали путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) в серийно разведенных легочных гомогенатах в указанных временных точках. Прерывистой линией показан предел обнаружения. ***р менее 0,001, wP против OMV 0,4; ### р менее 0,001, # р менее 0,05, wP против OMV 10; ◆◆ р менее 0,001, ◆р менее 0,05, wP против OMV 2.

Фиг. 9: aP, включенный в композицию с OMV, стимулирует ФНА-специфичные IgG2c в сыворотке. ФНА-специфичные антитела, присутствовавшие в сыворотке иммунизированных мышей на сутки заражения, анализировали посредством ELISA. ***р менее 0,001, *р менее 0,05.

Фиг. 10: Иммунизация с использованием wP, aP, aP с OMV и OMV самих по себе обеспечивает защиту от заражения *V. pertussis*. Мышей C57BL6 иммунизировали с использованием PBS, wP, aP, aP с OMV и OMV самих по себе за 3 недели до заражения. Затем мышей инфицировали вирулентным штаммом *V. pertussis* (Bp338) и количество бактерий в легких оценивали путем подсчета КОЕ в серийно разведенных легочных гомогенатах в указанных временных точках. ***р менее 0,001, **р менее 0,01, *р менее 0,05.

Фиг. 11: Добавление OMV к aP-вакцине способствует благоприятному Th1-ответу. Клетки селезен-

ки (2×10^6 /мл) от вакцинированных мышей C57BL6 культивировали в присутствии обработанных ультразвуком *B. pertussis* (SBP, 5 мкг/мл). Через 72 часа концентрацию IFN γ в супернатантах анализировали посредством ELISA. **р менее 0,01, ***р менее 0,001.

Фиг. 12: Бустер "aP плюс OMV" способствует антигенспецифичной выработке IFN γ у aP-примированных мышей.

Клетки селезенки (2×10^6 /мл) от вакцинированных мышей C57BL6 культивировали в присутствии FHA (2 мкг/мл), PRN (2 мкг/мл), обработанных ультразвуком *B. pertussis* (SBP, 5 мкг/мл) или среды самой по себе. Через 72 часа концентрацию IFN γ , IL-17 и IL-13 в супернатантах анализировали посредством ELISA. *р менее 0,05, **р менее 0,01, ***р менее 0,001.

Подробное описание изобретения

Изобретение основано на исследованиях композиций, содержащих везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*. Авторы изобретения обнаружили, что иммуногенные композиции, содержащие как OMV, так и антигены, такие как бесклеточные коклюшные антигены, способны индуцировать более сильный иммунный ответ, чем наблюдаемый после иммунизации OMV самими по себе или бесклеточными коклюшными антигенами самими по себе. Кроме того, OMV также повышают иммунный ответ на другие антигены, не являющиеся антигенами *Bordetella*, такие как столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин. Использование термина "имеющие происхождение от" относится к источнику OMV как происходящих от *Bordetella pertussis*, то есть к бактериальному штамму, из которого эти OMV получены или происходят. По существу, согласно настоящему изобретению предложена иммуногенная композиция, содержащая (а) OMV *Bordetella pertussis*, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

В широком смысле, термин "иммуногенная композиция" относится к любой композиции, которая может быть введена для индуцирования иммунного ответа, такого как гуморальный или клеточный иммунный ответ, против антигена, присутствующего в композиции. Таким образом, композиции по изобретению являются иммуногенными. Когда иммуногенные композиции предотвращают, уменьшают степень выраженности, облегчают или устраняют заболевание у субъекта, такие композиции могут быть названы вакцинами. Предпочтительно, вакцины по изобретению являются профилактическими (то есть для предотвращения инфекции). Профилактические вакцины не обеспечивают полной защиты от заболевания, поскольку даже в случае выработки антител у пациента возможны запаздывание или задерживание перед тем, как иммунная система станет способной бороться с инфекцией. Таким образом, и во избежание сомнений, термин "профилактическая вакцина" может также относиться к вакцинам, уменьшающим степень выраженности эффектов будущей инфекции, например, посредством уменьшения тяжести или продолжительности такой инфекции. Термины "защита от инфекции" и/или "обеспечение защитного иммунитета" означают, что иммунная система субъекта была примирована (например, посредством вакцинации) для иницирования иммунного ответа и подавления инфекции. В частности, иницированный иммунный ответ способен подавлять инфекцию, вызываемую рядом патогенов, таких как различные штаммы бактерий. Таким образом, вакцинированный субъект может быть инфицирован, но обладает лучшей, по сравнению с контрольным субъектом, способностью к подавлению инфекции.

OMV

OMV хорошо известны в данной области техники и спонтанно высвобождаются бактериями в культуральную среду. OMV содержат компоненты, такие как белковые и липидные компоненты, наружной бактериальной мембраны культивированных бактерий. Все OMV, как "нативные OMV" ("nOMV" [2]), так и OMV, экстрагированные детергентами (dOMV), являются частью изобретения и обобщенно названы здесь OMV. Для обозначения OMV, полученных из мутантных бактерий, может также быть использован термин "генерализованный модуль мембранных антигенов" ("generalized module for membrane antigens"). В некоторых воплощениях изобретения OMV представляют собой нативные OMV.

OMV могут быть получены из культуры *Bordetella pertussis*. OMV получают из наружной мембраны культивированных бактерий. Везикулы могут быть получены при разрыве или естественном "пузырении" наружной мембраны бактерии с образованием пузырьков из нее.

Они могут быть получены из бактерий, выращенных в культуре с жидкой или твердой средой, например, путем отделения бактериальных клеток от культуральной среды (например, фильтрацией или низкоскоростным центрифугированием для осаждения клеток), лизирования клеток (без детергентов) и отделения наружной мембранной фракции от цитоплазматических молекул (например, фильтрацией, дифференциальной преципитацией или агрегацией наружных мембран и/или OMV, методами аффинного разделения с использованием лигандов, специфично распознающих молекулы наружной мембраны, или высокоскоростным центрифугированием, приводящим к осаждению наружных мембран и/или OMV).

OMV могут также быть получены из *Bordetella pertussis* искусственным образом, например, с использованием обработки детергентами (например дезоксихолом или саркозилом) или недетергентными методами (например, см. источник информации [3]). Методики искусственного получения OMV включают обработку бактерий детергентом на основе солей желчных кислот (например, солей литохолевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, урсодезоксихолевой кислоты, дезоксихолевой кислоты, холевой

кислоты, урсохолоевой кислоты и так далее, с дезоксихолатом натрия [4 и 5]) при рН, достаточно высоком, чтобы не осаждал детергент [6]. Другие методы могут быть осуществлены практически без детергентов [3] с использованием таких методик, как обработка ультразвуком, гомогенизация, микрофлюидизация, кавитация, осмотический шок, измельчение, пресс Френча, смешивание и так далее.

Полезный способ очистки ОМV описан в источнике информации [7] и включает ультрафильтрацию неочищенных ОМV вместо высокоскоростного центрифугирования. Способ может включать стадию ультрацентрифугирования по завершении ультрафильтрации.

Препараты ОМV, используемые в настоящем изобретении, будут обычно по существу свободны от целых бактерий, как живых, так и погибших. Размер везикул позволяет легко отделять их от целых бактерий посредством фильтрации, например, такой, которую обычно применяют для стерилизации фильтрованием.

ОМV способны вызывать иммунный ответ на *Bordetella pertussis* при их введении млекопитающему. Иммунный ответ может представлять собой клеточный или гуморальный иммунный ответ. В частности, иммунный ответ представляет собой гуморальный иммунный ответ. Еще более конкретно, иммунный ответ представляет собой Т-клеточный иммунный ответ, который может нейтрализовать инфекцию и/или вирулентность *Bordetella pertussis*. Иммунный ответ, вызываемый ОМV, может быть направлен на или против одного или более чем одного из белковых антигенов *B. pertussis*, присутствующих в ОМV.

Несмотря на то, что коклюшный токсин является секретиремым токсином, он присутствует в ОМV, например, коклюшный токсин, имеющий происхождение из периплазматического пространства. В результате, ОМV, используемые в данной области техники, обрабатывают химическими агентами, такими как формалин, для химической детоксификации любых РТ. Помимо проблем удаления остаточного формалина, химическая обработка может отрицательно влиять на иммуногенность ОМV, например, посредством поперечного сшивания белков.

Таким образом, применение ОМV, имеющих происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин, обеспечивает преимущества и не было предложено в данной области техники ранее. В частности, преимуществами обладают ОМV, имеющие происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин РТ-9К/129G. В частности, для использования в настоящем изобретении авторы изобретения выделили ОМV из штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин РТ-9К/129G. Благодаря этому нет необходимости в химической детоксификации ОМV посредством обработки химическими веществами, такими как формальдегид, формалин, глутаровый альдегид, перекись водорода и их комбинации. В частности, ОМV по изобретению не являются химически детоксифицированными, более конкретно, ОМV по изобретению не являются химически детоксифицированными и/или обработанными формальдегидом, формалином, глутаровым альдегидом, перекисью водорода и их комбинациями.

Использование штаммов *Bordetella pertussis* с нокаутом или делецией гена *ArnT* также обеспечивает преимущества. ОМV, имеющие происхождение от таких штаммов, содержат липид А, имеющий модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры. В результате, эти ОМV демонстрируют сниженный уровень активации TLR4 по сравнению с ОМV, имеющими происхождение от штаммов с функциональным геном *ArnT*.

Иммуногенные композиции по изобретению содержат как ОМV-компонент (а), так и компонент бесклеточного коклюшного антигена (б). Компонент везикул наружной мембраны (а) содержит множество белков, ассоциированных с мембраной или присутствующих внутри ОМV, включая, например, небольшие количества РТ, FHA или пертактина. Тем не менее, эти компоненты, ассоциированные с ОМV, не следует рассматривать как компонент бесклеточного коклюшного антигена (б), описанный ниже, который будет обычно представлен отдельно от ОМV в очищенной форме, например, в виде выделенного(ых) рекомбинантного(ых) белкового(ых) антигена(ов).

В некоторых воплощениях изобретения композиции, содержащие ОМV, имеющие происхождение от *Bordetella parapertussis*, исключены из изобретения.

Дифтерийный анатоксин

Возбудителем дифтерии является *Corynebacterium diphtheriae*, грамположительная неспорообразующая бактерия. Этот микроорганизм экспрессирует АДФ-рибозилирующий экзотоксин, кодируемый фагом ("дифтерийный токсин"), который может быть обработан (например, с использованием формальдегида) с получением анатоксина, который более не является токсичным, но остается антигенным и способен стимулировать выработку специфических антител против токсина после инъекции. Дифтерийные анатоксины раскрыты более подробно в главе 13 источника информации [8]. Предпочтительны дифтерийные анатоксины, полученные обработкой формальдегидом. Дифтерийный анатоксин может быть получен выращиванием *C. diphtheriae* в питательной среде (например, среде Фентона (Fenton) или среде Линггауда-Фентона (Linggoud & Fenton)), которая может быть дополнена бычьим экстрактом, с последующей обработкой формальдегидом, ультрафильтрацией и преципитацией. Анатоксиновый материал может затем быть обработан с использованием методики, включающей стерильную фильтрацию и/или

диализ.

Количество дифтерийного анатоксина может быть выражено в международных единицах (МЕ). Например, NIBSC [9] поставляет "Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999 [Дифтерийный анатоксин, адсорбированный, третий международный стандарт, 1999]" [10, 11], содержащий по 160 МЕ в каждой ампуле. В качестве альтернативы системе МЕ, единицу "Lf" ("единицы флоккуляции" ("flocculating units")), "наименьшая флоккулирующая доза" или "предел флоккуляции") определяют как количество анатоксина, которое при смешивании с одной международной единицей антитоксина образует оптимально флоккулирующую смесь [12]. Например, NIBSC поставляет "Diphtheria Toxoid, Plain [Дифтерийный анатоксин, чистый]" [13], содержащий по 300 Lf в каждой ампуле, и "The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test [1-й международный эталонный реагент дифтерийного анатоксина для теста флоккуляции]" [14], содержащий по 900 Lf в каждой ампуле. Пересчет между системами МЕ и Lf зависит от конкретного препарата анатоксина.

В случае использования веществ бычьего происхождения при культивировании *C. diphtheriae*, они должны быть получены из источников, свободных от губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) или от других трансмиссивных губчатых энцефалопатии (TSE).

Дифтерийный анатоксин обычно присутствует в иммуногенных композициях по изобретению в количестве, способном вызывать иммунный ответ при его введении. В идеальном случае, дифтерийный анатоксин может вызывать защитный иммунный ответ. Количество дифтерийного анатоксина в иммуногенных композициях по изобретению обычно составляет 1-50 Lf на дозу. Бустерные вакцины для подростков и взрослых обычно содержат дифтерийный анатоксин в количестве от 4 Lf/мл до 8 Lf/мл, например 2,5 Lf, предпочтительно 4 Lf, на дозу 0,5 мл. Вакцины для детей обычно содержат дифтерийный анатоксин в количестве от 20 до 50 Lf/мл, например 10 Lf или 25 Lf на дозу 0,5 мл.

В комбинированных вакцинах для детей соотношение "дифтерийный анатоксин : столбнячный анатоксин" обычно превышает 1 (то есть вакцины для детей обычно имеют избыток дифтерийного анатоксина) и обычно составляет от 2:1 до 3:1 (при измерении в Lf-единицах), например 2,5:1. В отличие от этого, бустерная вакцина, вводимая подросткам или взрослым (которые обычно уже получили по меньшей мере одну комбинированную вакцину для детей, содержащую дифтерийный анатоксин и столбнячный анатоксин), соотношение "столбнячный анатоксин : дифтерийный анатоксин" обычно превышает 1 (то есть бустерные вакцины обычно имеют избыток столбнячного анатоксина) и обычно составляет от 1,5:1 до 2,5:1, например 2:1. Дифтерийный анатоксин обычно не конъюгирован.

Общее количество дифтерийного анатоксина может быть эквивалентно 1-50 Lf на дозу, например, в бустерных вакцинах в концентрации от 4 Lf/мл до 8 Lf/мл, например, 2,5 Lf на дозу 0,5 мл или 4 Lf на дозу 0,5 мл, в вакцинах для детей в концентрации от 20 до 50 Lf/мл, например, 10 Lf на дозу 0,5 мл или 25 Lf на дозу 0,5 мл. В определенных воплощениях, где нет химически детоксицированного дифтерийного анатоксина, количество присутствующего генетически детоксицированного дифтерийного анатоксина, в частности CRM197, может быть эквивалентно 1-50 Lf на дозу, в концентрации, например, в бустерных вакцинах, от 4 Lf/мл до 8 Lf/мл, например, 2,5 Lf на дозу 0,5 мл или 4 Lf на дозу 0,5 мл, и в вакцинах для детей в концентрации от 20 до 50 Lf/мл, например, 10 Lf на дозу 0,5 мл или 25 Lf на дозу 0,5 мл.

Дифтерийный анатоксин может быть адсорбирован на адьюванте на основе гидроксида алюминия.

Обычно иммуногенная композиция, содержащая антиген дифтерийного анатоксина, практически свободна от любых ртутьсодержащих консервантов.

Столбнячный анатоксин

Возбудителем столбняка является *Clostridium tetani*, грамположительная спорообразующая бактерия. Этот микроорганизм экспрессирует эндопептидазу ("столбнячный токсин"), которая может быть обработана с получением анатоксина, который более не является токсичным, но остается антигенным и способен стимулировать выработку специфических антител против токсина после инъекции. Столбнячные анатоксины раскрыты более подробно в главе 27 источника информации [1]. Предпочтительны столбнячные анатоксины, полученные обработкой формальдегидом. Столбнячный анатоксин может быть получен выращиванием *C. tetani* в питательной среде (например, среде Лэтема (Latham), имеющей происхождение от бычьего казеина) с последующей обработкой формальдегидом, ультрафильтрацией и преципитацией. Полученный материал может затем быть обработан с использованием методики, включающей стерильную фильтрацию и/или диализ.

Количество столбнячного анатоксина может быть выражено в международных единицах (МЕ). Например, NIBSC [15] поставляет "Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000 [Столбнячный анатоксин, адсорбированный, третий международный стандарт, 2000]" [16, 17], содержащий по 469 МЕ в каждой ампуле. В качестве альтернативы системе МЕ, единицу "Lf" определяют как количество анатоксина, которое при смешивании с одной международной единицей антитоксина образует оптимально флоккулирующую смесь [18]. Например, NIBSC поставляет "The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test [1-й международный эталонный реагент столбнячного анатоксина для флоккуляционного теста]" [19], содержащий по 1000 Lf в каждой ампуле. Пересчет между системами МЕ и Lf зависит от конкретного препарата анатоксина.

В случае использования веществ бычьего происхождения при культивировании *S. tetani*, они должны быть получены из источников, свободных от губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) или от других трансмиссивных губчатых энцефалопатии (TSE).

Столбнячный анатоксин обычно присутствует в иммуногенных композициях по изобретению в количестве, способном вызывать иммунный ответ при его введении. В идеальном случае, столбнячный анатоксин может вызывать защитный иммунный ответ. Количество столбнячного анатоксина в иммуногенных композициях по изобретению обычно составляет 1-20 Lf на дозу. Бустерные вакцины для подростков и взрослых обычно содержат 5 Lf столбнячного анатоксина на дозу 0,5 мл. Вакцины для детей обычно содержат от 5 до 10 Lf столбнячного анатоксина на дозу 0,5 мл.

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что в некоторых воплощениях столбнячный анатоксин может присутствовать как в свободной (неконъюгированной), так и в конъюгированной форме, или преимущественно в конъюгированной форме, то есть 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% столбнячного анатоксина присутствуют в конъюгированной форме. Таким образом, количество столбнячного анатоксина в иммуногенных композициях по изобретению может относиться только к неконъюгированному столбнячному анатоксину, только к конъюгированному столбнячному анатоксину или к сумме неконъюгированного и конъюгированного столбнячного анатоксина. Тем не менее, столбнячный анатоксин предпочтительно является свободным неконъюгированным. В предпочтительных воплощениях количество столбнячного анатоксина в иммуногенных композициях по изобретению относится только к неконъюгированному столбнячному анатоксину.

Столбнячный анатоксин может быть адсорбирован на адъюванте на основе гидроксида алюминия, но это не является необходимым (например, может быть использована адсорбция 0-10% всего столбнячного анатоксина).

Обычно иммуногенная композиция, содержащая столбнячный анатоксин, по существу свободна от любых ртути-содержащих консервантов.

Бесклеточный(е) коклюшный(е) антиген(ы)

Bordetella pertussis является грамотрицательной неспорообразующей аэробной бактерией и возбудителем коклюша. Как описано более подробно в главе 21 источника информации [1], вакцины от *B. pertussis* доступны уже много лет, и их делят на две категории: клеточные (wP) и бесклеточные (aP). Клеточные вакцины содержат целые клетки *B. pertussis*, которые были убиты или деактивированы (например, обработкой формалином и/или нагреванием), в то время как бесклеточные вакцины содержат очищенные специфические антигены *B. pertussis*, либо выделенные из нативных бактерий, либо выделенные после экспрессии в рекомбинантном хозяине.

В данном изобретении в одной вакцине может быть использован более чем один бесклеточный коклюшный (aP) антиген, например, по меньшей мере два или по меньшей мере три из следующих хорошо известных и хорошо охарактеризованных антигенов *B. pertussis*: (1) детоксифицированный коклюшный токсин (коклюшный анатоксин или "PT"); (2) филamentный гемагглютинин ("FHA"); (3) пертактин ("PRN", также известный как "белок наружной мембраны 69 кДа" или "69K"). Наиболее предпочтительно, следует использовать все три этих антигена. Эти три антигена предпочтительно получены выделением из культуры *B. pertussis*, например, выращенной в жидкой среде Стейнера-Шолте (Stainer-Scholte). PT и FHA могут быть выделены из жидкой ферментационной среды (например, адсорбцией на гидроксиапатитовом геле), в то время как пертактин может быть выделен из клеток нагреванием и флокуляцией (например, с использованием хлорида бария). Антигены могут быть очищены на последующих хроматографических и/или преципитационных стадиях. PT и FHA могут быть очищены гидрофобной хроматографией, аффинной хроматографией и гель-хроматографией. Пертактин может быть очищен ионообменной хроматографией, гидрофобной хроматографией и гель-хроматографией. Методы очистки PT, FHA и пертактина известны в данной области техники.

FHA и пертактин могут быть обработаны формальдегидом перед использованием согласно данному изобретению. PT может быть детоксифицирован обработкой формальдегидом и/или глутаровым альдегидом. В качестве альтернативы этой методике химической детоксификации, в предпочтительных воплощениях PT может представлять собой мутантный PT, ферментативная активность которого была снижена посредством мутагенеза [22] (например, двойной мутант 9K/129G). При включении генетически детоксифицированного PT можно использовать меньшее количество. Например, концентрация генетически детоксифицированного коклюшного анатоксина в композиции может быть меньше или равна 5 мкг/мл, например менее 4, менее 3, менее 2,5, менее 2, менее 1 мкг/мл и так далее. Таким образом, в типичном объеме стандартной дозы 0,5 мл количество генетически детоксифицированного коклюшного анатоксина составляет менее 2,5 мкг, например менее 2, менее 1,5, менее 1, менее 0,5 мкг, например, от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 2,5 мкг.

Другие бесклеточные коклюшные антигены, которые могут быть использованы, включают фимбрии (например, агглютиногены 2 и 3, также называемые FIM2 и FIM3).

aP-Антиген(ы) может(гут) быть использован(ы) в неадсорбированном состоянии, но их предпочтительно адсорбируют на один или более адъювантов на основе соли алюминия перед использованием. Предпочтительно, aP-антигены адсорбированы на адъюванте на основе гидроксида алюминия.

Обычно иммуногенные композиции, содержащие aP-антигены, практически свободны от ртути-содержащих консервантов (например тимеросала).

Бесклеточный коклюшный антиген обычно присутствует в иммуногенных композициях по изобретению в количестве, способном вызывать иммунный ответ при его введении. В идеальном случае, бесклеточный коклюшный антиген может вызывать защитный иммунный ответ. Количество бесклеточных коклюшных антигенов обычно выражают в микрограммах. Концентрация РТ в вакцине обычно составляет от 5 до 50 мкг/мл. Типичные концентрации РТ составляют 5 мкг/мл, 16 мкг/мл, 20 мкг/мл или 50 мкг/мл. Концентрация FHA в вакцине обычно составляет от 10 до 50 мкг/мл. Типичные концентрации FHA составляют 10 мкг/мл, 16 мкг/мл или 50 мкг/мл. Концентрация пертактина в вакцине обычно составляет от 5 до 16 мкг/мл. Типичные концентрации пертактина составляют 5 мкг/мл, 6 мкг/мл или 16 мкг/мл. Например, бустерная вакцина для подростков и взрослых обычно содержит от 2,5 до 8 мкг РТ, от 4 до 8 мкг FHA (например, от 4 до 8 мкг FHA) и от 2,5 до 8 мкг пертактина (например, от 2,5 до 8 мкг пертактина) на дозу 0,5 мл. Обычно бустерная вакцина содержит 4 мкг РТ, 4 мкг FHA и 8 мкг пертактина, более предпочтительно 5 мкг РТ, 2,5 мкг FHA и 2,5 мкг пертактина на дозу 0,5 мл. Вакцина для детей обычно содержит 7 мкг РТ, 10 мкг FHA и 10 мкг пертактина на дозу 0,5 мл.

Когда водный компонент содержит РТ, FHA и пертактин, их массовые соотношения могут варьировать, но могут составлять, например, приблизительно 16:16:5, приблизительно 5:10:6, приблизительно 20:20:3, приблизительно 25:25:8 или приблизительно 10:5:3 (РТ:FHA:PRN).

Конкретные иммуногенные композиции по изобретению

Конкретно предусмотренные иммуногенные композиции по изобретению содержат:

(1) OMV *B. pertussis*, (2) дифтерийный анатоксин, (3) столбнячный анатоксин, (4) бесклеточный коклюшный антиген;

(1) OMV *B. pertussis*, (2) дифтерийный анатоксин, (3) столбнячный анатоксин, (4) детоксифицированный коклюшный токсин, (5) филаментный гемагглютинин и (6) пертактин;

(1) OMV *B. pertussis*, (2) дифтерийный анатоксин, (3) столбнячный анатоксин, (4) генетически детоксифицированный коклюшный токсин, (5) филаментный гемагглютинин и (6) пертактин;

(1) OMV *B. pertussis*, (2) дифтерийный анатоксин, (3) столбнячный анатоксин, (4) детоксифицированный коклюшный токсин, (5) филаментный гемагглютинин, (6) пертактин, (7) антиген штамма вируса полиомиелита 1-го типа, (8) антиген штамма вируса полиомиелита 2-го типа и (9) антиген штамма вируса полиомиелита 3-го типа.

Иммуногенные композиции по настоящему изобретению вызывают усиленный Th1- и усиленный Th2-ответ, то есть повышают как выработку IgG1, так и выработку IgG2a. Более конкретно, композиции вызывают усиленный Th1- и/или усиленный Th2-иммунный ответ по сравнению с иммунизацией с использованием OMV самих по себе или Tdap самой по себе.

Фармацевтические способы и применения

Иммуногенные композиции по изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Типичный "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой носитель, который сам по себе не индуцирует выработку антител, вредных для индивида, получающего композицию. Подходящие носители обычно представляют собой крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимеры молочной кислоты, полимеры гликолевой кислоты, полимеры аминокислот, сополимеры аминокислот, сахарозу [21], трегалозу [22], лактозу и липидные агрегаты (такие как масляные капли или липосомы). Такие носители хорошо известны специалистам в данной области техники. Вакцины могут также содержать разбавители, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и так далее. Кроме того, могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты или эмульгаторы, pH-буферные вещества и тому подобное. Типичным носителем является стерильный апиrogenный забуференный фосфатом физиологический раствор. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых эксципиентов приведено в источнике информации [23].

Композиции по изобретению могут быть представлены в водной форме (то есть в форме растворов или суспензий) или в высушенной форме (например, в лиофилизированной форме). При использовании высушенной вакцины ее будут восстанавливать в жидкой среде перед инъекцией. Лиофилизация вакцин известна в данной области техники, например, вакцина Menjugate™ представлена в лиофилизированной форме. Когда иммуногенные композиции по изобретению включают лиофилизированный компонент, этот компонент обычно изготавливают отдельно, смешивают и затем лиофилируют. Для стабилизации антигенов во время лиофилизации перед лиофилизацией могут быть добавлены неактивные компоненты, например, в качестве стабилизаторов. Предпочтительными стабилизаторами для включения являются лактоза, сахароза и маннит, а также их смеси, например смеси лактозы и сахарозы, смеси сахарозы и маннита и так далее. Таким образом, готовая вакцина, полученная восстановлением лиофилизированных веществ в воде, может содержать лактозу и/или сахарозу. При изготовлении лиофилизированных вакцин предпочтительно использовать аморфные эксципиенты и/или аморфные буферы [24].

Может быть предпочтительным включить в композицию сахарный спирт (например маннит) и/или дисахарид (например сахарозу или трегалозу), например, в количестве от 1 мг/мл до 30 мг/мл (например приблизительно 25 мг/мл).

Композиции могут быть представлены в флаконах, или они могут быть представлены в готовых заполненных шприцах. Шприцы могут поставляться с иглами или без игл. Шприц будет содержать одну дозу композиции, в то время как флакон может содержать одну дозу или множество доз.

Композиции по изобретению предпочтительно вводят пациентам в стандартных дозах 0,5 мл. Подразумевают, что ссылка на дозы 0,5 мл включает стандартное отклонение, например, 0,5 мл плюс/минус 0,05 мл. В случае множества доз, все количество, соответствующее множеству доз, будет выделено и упаковано в один контейнер, например, 5 мл для многодозового контейнера на 10 доз (или 5,5 мл с 10%-ным избытком).

Водные композиции по изобретению также подходят для восстановления других вакцин из лиофилизированной формы. Там, где композицию по изобретению следует использовать для такого восстановления непосредственно перед применением, в изобретении предложен набор, который может содержать два флакона или может содержать один готовый заполненный шприц и один флакон, где содержимое шприца используют для реактивации содержимого флакона перед инъекцией.

Вакцины могут также быть изготовлены в форме, где вакцина может быть приготовлена непосредственно во время/в момент применения посредством смешивания двух компонентов друг с другом. Такие двухкомпонентные воплощения включают смешивание жидкости с жидкостью и смешивание жидкости с твердым веществом, например, посредством смешивания водных веществ с лиофилизированными веществами.

Таким образом, набор, который может быть использован в изобретении, содержит первый компонент, содержащий OMV-компонент, и второй компонент, содержащий (а) бесклеточный(е) коклюшный(е) антиген(ы), (б) столбнячный анатоксин и (в) дифтерийный анатоксин, где эти два компонента находятся в отдельных контейнерах (например, флаконах или шприцах). OMV-компонент первого компонента может быть лиофилизирован. В некоторых воплощениях первый компонент не содержит адьювант. Второй компонент может содержать водные антигены. В некоторых воплощениях второй компонент содержит адьювант, например адьювант на основе соли алюминия.

Согласно изобретению также предложен способ изготовления иммуногенной композиции по изобретению, включающий смешивание первого компонента, содержащего OMV, и второго компонента, содержащего (а) бесклеточный(е) коклюшный(е) антиген(ы), (б) столбнячный анатоксин и (в) дифтерийный анатоксин. OMV первого компонента могут быть лиофилизированы. Второй компонент может содержать водные антигены. Способ может включать дополнительную стадию восстановления лиофилизированных OMV в первом компоненте водными антигенами второго компонента. Первый компонент может не содержать адьювант. Второй компонент может содержать адьювант, например адьювант на основе соли алюминия.

Композиции по изобретению могут быть упакованы в однодозовой форме или в многодозовой форме. Для многодозовых форм флаконы предпочтительнее, чем предварительно заполненные шприцы. Объемы эффективных доз могут быть определены обычными методами, но типичная доза композиции для человека, например, для внутримышечной инъекции, имеет объем 0,5 мл.

Значение pH композиции предпочтительно составляет от 6 до 8, предпочтительно приблизительно 7. Стабильный pH можно поддерживать с использованием буфера. Водные композиции, вводимые пациенту, могут иметь pH от 5,0 до 7,5 и, типичнее, от 5,0 до 6,0 для оптимальной стабильности; там, где присутствуют дифтерийный анатоксин и/или столбнячный анатоксин, pH составляет, в идеальном случае, от 6,0 до 7,0.

Иммуногенные композиции по изобретению обычно содержат буфер с дигидрофосфатом калия. Буфер с дигидрофосфатом калия может содержать приблизительно 1-10 мМ дигидрофосфата калия, например, 1,25 мМ, 2,5 мМ или 5,0 мМ. Если композиция содержит соль на основе гидроксида алюминия, предпочтительно использовать гистидиновый буфер [25]. Композиция может быть стерильной и/или апиrogenной. Композиции по изобретению могут быть изотоническими для людей.

Композиции по изобретению являются иммуногенными и, более предпочтительно, представляют собой вакцинные композиции. Вакцины по изобретению могут быть профилактическими (то есть для предотвращения инфекции) или терапевтическими (то есть для лечения инфекции), но обычно будут профилактическими. Профилактические вакцины не обеспечивают полную защиту от заболевания, поскольку даже в случае выработки антител у пациента возможны запаздывание или задерживание перед тем, как иммунная система станет способной бороться с инфекцией. Таким образом, и во избежание сомнений, термин "профилактическая вакцина" может также относиться к вакцинам, уменьшающим степень выраженности эффектов будущей инфекции, например, посредством уменьшения тяжести или продолжительности такой инфекции.

Термины "защита от инфекции" и/или "обеспечение защитного иммунитета" означают, что иммунная система субъекта была примирована (например, посредством вакцинации) для инициирования иммунного ответа и подавления инфекции. В частности, инициированный иммунный ответ способен подавлять инфекцию, вызываемую рядом патогенов, таких как различные штаммы бактерий. Таким образом, вакцинированный субъект может быть инфицирован, но обладает лучшей, по сравнению с контрольным субъектом, способностью к подавлению инфекции. Иммуногенные композиции, используемые

в качестве вакцин, содержат иммунологически эффективное количество антигена(ов), а также, по необходимости, любые другие компоненты. Под "иммунологически эффективным количеством" понимают, что введение этого количества индивиду, в одной дозе или в серии доз, эффективно для лечения или предотвращения. Обычно желаемым результатом является развитие иммунного ответа, специфичного в отношении антигена (например, патогена), способного защитить субъекта от патогена или способствующего такой защите. Это количество варьирует в зависимости от здоровья и физического состояния индивида, подлежащего лечению, возраста, таксономической группы индивида, подлежащего лечению (например, примат, не являющийся человеком, примат и так далее), способности иммунной системы индивида синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других имеющих значение факторов. Ожидают, что это количество будет входить в относительно широкий диапазон, который может быть определен стандартными исследованиями.

Композиции по изобретению могут быть изготовлены в различных формах. Например, композиции могут быть изготовлены в формах для инъекций в виде жидких растворов или суспензий. Композиция может быть изготовлена для легочного введения, например, в форме ингалятора с использованием тонкодисперсного порошка или спрея. Композиция может быть изготовлена в форме суппозитория или пессария. Композиция может быть изготовлена для назального, ушного или глазного введения, например, в форме спрея, капель, геля или порошка (например, источники информации [26] и [27]). Имеются сообщения об успешном назальном введении пневмококковых сахаридов [28, 29], сахаридов Hib [30], сахаридов MenC [31] и смесей сахаридных конъюгатов Hib и MenC [32].

Композиции по изобретению могут содержать антимикробный агент, в частности когда они упакованы в многодозовой форме.

Композиции по изобретению могут содержать детергент, например Tween (полисорбат), такой как Tween 80. Детергенты обычно присутствуют в небольших количествах, например, менее 0,01%.

Композиции по изобретению могут содержать соли натрия (например, хлорид натрия) для обеспечения тоничности. Типичная концентрация NaCl составляет 10 плюс/минус 2 мг/мл. В некоторых воплощениях может быть использована концентрация NaCl 4-10 мг/мл, например, 9,0, 7,0, 6,75 или 4,5 мг/мл.

Осмоляльность композиций будет обычно составлять от 200 мОсм/кг до 400 мОсм/кг, предпочтительно 240-360 мОсм/кг, и, более предпочтительно, будет входить в диапазон 280-320 мОсм/кг. Ранее сообщалось, что осмоляльность не влияет на боль, обусловленную вакцинацией [33], но поддержание осмоляльности в данном диапазоне все равно предпочтительно.

Композиции по изобретению будут обычно содержать буфер. Типичным является фосфатный буфер.

Композиции по изобретению могут быть введены в сочетании с другими иммунорегуляторными агентами. В частности, композиции могут содержать один или более чем один адьювант. Такие адьюванты включают, без ограничения, минералосодержащие композиции.

Минералосодержащие композиции, подходящие для использования в изобретении в качестве адьювантов, включают минеральные соли, такие как соли алюминия и соли кальция (или их смеси). Соли кальция включают фосфат кальция (например, частицы "CAP", раскрытые в источнике информации [34]). Соли алюминия включают гидроксиды, фосфаты, сульфаты и так далее, в любой подходящей форме (например, гелевой, кристаллической, аморфной и так далее). Адсорбция на эти соли является предпочтительной. Минералосодержащие композиции могут также быть изготовлены в форме частиц соли металла [35].

Могут быть использованы адьюванты, известные как гидроксид алюминия и фосфат алюминия. Эти названия являются общепринятыми, но их используют только для удобства, поскольку ни одно из них не является точным описанием фактически присутствующего химического соединения (например, см. главу 9 источника информации [36]). В изобретении может быть использован любой из "гидроксидных" или "фосфатных" адьювантов, обычно используемых в качестве адьювантов. Типичные адьюванты, известные как "гидроксид алюминия", представляют собой соли метагидроксида алюминия, обычно по меньшей мере частично кристаллические. Типичные адьюванты, известные как "фосфат алюминия", представляют собой гидроксифосфаты алюминия, часто содержащие также небольшое количество сульфата (то есть гидроксифосфатсульфат алюминия). Они могут быть получены осаждением, и условия взаимодействия и концентрации во время осаждения влияют на степень замещения гидроксила соли фосфатом.

Для адьювантов на основе гидроксида алюминия типично волокнистое строение (например, как видно на микрофотографиях, полученных при трансмиссионной электронной микроскопии). Значение pI адьювантов на основе гидроксида алюминия обычно составляет приблизительно 11, то есть сам адьювант имеет положительный поверхностный заряд при физиологическом pH. Согласно сообщениям, адсорбционная способность адьювантов на основе гидроксида алюминия составляет 1,8-2,6 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Адьюванты на основе фосфата алюминия обычно имеют молярное отношение PO_4/Al от 0,3 до 1,2, предпочтительно от 0,8 до 1,2 и более предпочтительно 0,95 плюс/минус 0,1. Фосфат алюминия будет

обычно аморфным, в особенно в случае гидроксифосфатных солей. Типичным адьювантом является аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным отношением PO_4/Al от 0,84 до 0,92, включенный в количестве 0,6 мг Al^{3+} /мл. Фосфат алюминия будет обычно иметь форму частиц (например, пластинчатого строения, как видно на микрофотографиях, полученных при трансмиссионной электронной микроскопии). Типичные диаметры частиц после адсорбции любого антигена входят в диапазон 0,5-20 мкм (например, приблизительно 5-10 мкм). Согласно сообщениям, адсорбционная способность адьювантов на основе фосфата алюминия составляет 0,7-1,5 мг белка на мг Al^{+++} при pH 7,4.

Точка нулевого заряда (PZC) фосфата алюминия находится в обратной зависимости от степени замещения гидроксила фосфатом, и эта степень замещения может варьировать в зависимости от условий взаимодействия и концентрации взаимодействующих веществ, используемых для получения соли осаждением. PZC также меняется при изменении концентрации свободных фосфат-ионов в растворе (чем больше фосфата, тем более кислая PZC) или при добавлении буфера, такого как гистидиновый буфер (делает PZC более основной). Фосфаты алюминия, используемые согласно изобретению, будут обычно иметь PZC от 4,0 до 7,0, более предпочтительно от 5,0 до 6,5, например, приблизительно 5,7.

Суспензии солей алюминия, используемые для изготовления композиций по изобретению, могут содержать буфер (например, фосфатный, гистидиновый или трис-буфер), но это не всегда необходимо. Суспензии предпочтительно стерильны и апирогенны. Суспензия может содержать свободные водные фосфат-ионы, например, присутствующие в концентрации от 1,0 до 20 мМ, предпочтительно от 5 до 15 мМ и более предпочтительно приблизительно 10 мМ. Суспензии могут также содержать хлорид натрия.

В изобретении может быть использована смесь гидроксида алюминия и фосфата алюминия. В этом случае фосфата алюминия может быть больше, чем гидроксида, например, при массовом отношении по меньшей мере 2:1, например 5:1 или более, 6:1 или более, 7:1 или более, 8:1 или более, 9:1 или более и так далее.

Концентрация Al^{+++} в композиции для введения пациенту предпочтительно составляет менее 10 мг/мл, например 5 мг/мл или менее, 4 мг/мл или менее, 3 мг/мл или менее, 2 мг/мл или менее, 1 мг/мл или менее и так далее. Предпочтительный диапазон составляет от 0,3 до 1,0 мг/мл. Предпочтительное максимальное количество на одну дозу составляет 0,85 мг.

Типичным адьювантом на основе фосфата алюминия является аморфный гидроксифосфат алюминия с молярным отношением PO_4/Al от 0,84 до 0,92, включенный в количестве 0,6 мг Al^{3+} /мл. Может быть использована адсорбция при низкой дозе фосфата алюминия, например, от 50 до 100 мкг Al^{3+} на одну дозу.

Особенно предпочтительно использование адьювантов на основе солей алюминия, и антигены обычно адсорбированы на таких солях. В композициях по изобретению одни антигены могут быть адсорбированы на гидроксиде алюминия, а другие антигены могут находиться в ассоциации с фосфатом алюминия. Тем не менее, обычно предпочтительно использовать только одну соль, например гидроксид или фосфат, но не обе. Не все антигены должны быть адсорбированы, то есть некоторые или все антигены могут присутствовать в растворе в свободной форме.

Способы лечения

Согласно изобретению также предложены иммуногенные композиции для применения в индуцировании иммунного ответа у млекопитающего, включающего введение указанному млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению. Предпочтительно, иммуногенная композиция способна индуцировать иммунный ответ у млекопитающего. Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает антитела и, более предпочтительно, представляет вакцину. В некоторых воплощениях вакцина предназначена для применения при первичной вакцинации. Иммуногенная композиция может индуцировать бустерный ответ. Композиции по изобретению предпочтительно вводят пациентам в дозах 0,5 мл (как обсуждено выше).

Согласно изобретению также предложен способ индуцирования иммунного ответа у млекопитающего, включающий введение указанному млекопитающему иммуногенной композиции по изобретению. Иммунный ответ предпочтительно является защитным и предпочтительно включает антитела. Способ может индуцировать бустерный ответ. Композиции по изобретению предпочтительно вводят пациентам в дозах 0,5 мл (как обсуждено выше).

Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека. Там, где вакцина предназначена для профилактического использования, человек предпочтительно представляет собой ребенка (например, ребенка младшего возраста или младенца, в частности новорожденного) или подростка. Вакцину, предназначенную для детей, можно также вводить взрослым, например, для оценки безопасности, дозы, иммуногенности и так далее. Предпочтительной группой людей для лечения являются женщины репродуктивного возраста (например, подросткового возраста и старше). Другой предпочтительной группой являются беременные женщины.

В некоторых воплощениях пациент уже был иммунизирован дифтерийным анатоксином или его производным. В других воплощениях пациент уже был иммунизирован столбнячным анатоксином или его производным. В некоторых воплощениях пациент уже был иммунизирован как дифтерийным анатоксином или его производным, так и столбнячным анатоксином или его производным.

Согласно изобретению также предложена композиция по изобретению для использования в качестве лекарственного средства.

Согласно изобретению также предложено применение композиции по изобретению в изготовлении лекарственного средства для индуцирования иммунного ответа у млекопитающего.

Предпочтительно, эти применения и способы предназначены для предотвращения и/или лечения заболевания, вызываемого одним или более из *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* и *Bordetella pertussis*. *C. diphtheriae* может вызывать дифтерию; *C. tetani* может вызывать столбняк; *B. pertussis* может вызывать коклюш.

Субъект, у которого предотвращают заболевание, может не быть тем же субъектом, который получает иммуногенную композицию по изобретению. Например, иммуногенная композиция может быть введена особи женского пола (до или во время беременности) для защиты потомства (так называемая "материнская иммунизация" [37-39]). Иммунизация беременной особи женского пола обеспечивает анти-телоопосредованный иммунитет у потомства посредством пассивного материнского иммунитета. Пассивный иммунитет появляется естественным образом при переносе материнских антител к плоду через плаценту. Пассивный иммунитет особенно важен для младенцев, поскольку они рождаются без какого-либо активно приобретенного иммунитета. Введение композиций по изобретению беременной особи женского пола усиливает иммунитет у данной особи женского пола, и антитела переносятся к новорожденному через плаценту, обеспечивая пассивный материнский иммунитет у младенца. Однако, пассивный иммунитет у младенцев носит лишь временный характер и начинает ослабевать после первых недель или месяцев жизни. В силу временного характера пассивного иммунитета, может быть важным ввести младенцу композицию по изобретению для индуцирования у него активного иммунитета до ослабления пассивного иммунитета. Введение второй иммуногенной композиции младенцу после рождения индуцирует у данного младенца активный иммунитет и продлевает иммунитет, переданный от матери во время беременности.

При использовании здесь "младенец" представляет собой индивида в возрасте менее одного года (например, в возрасте менее одних суток, в возрасте 1 недели, в возрасте 2 недель, в возрасте 3 недель, в возрасте 4 недель, в возрасте 2 месяцев, в возрасте 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, в возрасте 8 месяцев, в возрасте 9 месяцев, в возрасте 10 месяцев, в возрасте 11 месяцев, в возрасте менее 12 месяцев).

Композиция по изобретению может быть введена беременной особи женского пола в любой момент во время ее беременности. Например, композиция может быть введена беременной особи женского пола во время первого, второго или третьего триместра ее беременности. В некоторых воплощениях композицию вводят особи женского пола в течение последних 6-12 недель беременности (например, при 28 неделях беременности, 29 неделях беременности, 30 неделях беременности, 31 неделе беременности, 32 неделях беременности, 33 неделях беременности, 34 неделях беременности, 35 неделях беременности, 36 неделях беременности, 37 неделях беременности, 38 неделях беременности, 39 неделях беременности). В частности, композиция по изобретению может быть введена беременной особи женского пола по меньшей мере за четыре недели до рождения ребенка. В некоторых воплощениях композицию вводят беременной особи женского пола по схеме, предусматривающей однократное введение, при 32-36 неделях беременности. В других воплощениях композицию вводят беременной особи женского пола по схеме, предусматривающей двукратное введение, при этом первую дозу вводят при приблизительно 32 неделях беременности, а вторую дозу вводят при приблизительно 36 неделях беременности.

Вводить композицию младенцу можно в любое время в течение первого года жизни и, в случае необходимости, позднее. Обычно композицию будут вводить младенцу один, два, три, четыре или более раз в течение первого года жизни. Например, композиция по изобретению может быть введена младенцу в один или более чем один момент времени, выбранный из рождения, возраста 2 недель, возраста 4 недель, возраста 6 недель, возраста 2 месяцев, возраста 3 месяцев, возраста 4 месяцев, возраста 6 месяцев, возраста 9 месяцев и возраста 12 месяцев. В частности, композицию по изобретению вводят младенцу в момент времени до падения титров материнских антител ниже защитных. Последующие введения можно проводить по любому желаемому графику.

В одном воплощении предложен способ защиты младенца от заболевания, вызываемого одним или более из *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* и *Bordetella pertussis*, включающий стадии (а) введения композиции по изобретению особи женского пола во время беременности указанным младенцем и, возможно, (б) введения композиции по изобретению указанному младенцу, рожденному в результате этой беременности.

Таким образом, также предложен способ защиты младенца от одного или более из дифтерии, столбняка и коклюша, включающий стадии (а) введения композиции по изобретению особи женского пола во время беременности указанным младенцем и, возможно, (б) введения композиции по изобретению указанному младенцу, рожденному в результате этой беременности.

Предпочтительные композиции по изобретению могут обеспечивать у пациента титр антител, превосходящий критерий серологической защиты для каждого антигенного компонента, у приемлемого процента субъектов-людей. Антигены с соответствующими титрами антител, превышение которых у

хозяина рассматривают как сероконверсию против антигена, хорошо известны, и такие титры опубликованы такими организациями, как ВОЗ. Предпочтительно, сероконверсия происходит более чем у 80% статистически значимой выборки субъектов, более предпочтительно у более чем 90%, еще более предпочтительно у более чем 93% и наиболее предпочтительно у 96-100%.

Композиции по изобретению будут обычно вводить непосредственно пациенту. Прямая доставка может быть осуществлена парентеральной инъекцией (например, подкожно, внутривенно, внутримышечно или в интерстициальное пространство ткани) или ректальным, пероральным, вагинальным, местным, трансдермальным, интраназальным, глазным, ушным, легочным или другим введением через слизистые оболочки. Предпочтительно внутримышечное введение в бедро или верхнюю часть плеча. Инъекция может представлять собой инъекцию через иглу (например, иглу для подкожных инъекций), но, альтернативно, может быть использована безыгольная инъекция. Объем типичной дозы для внутримышечного введения составляет 0,5 мл.

Изобретение может быть использовано для обеспечения системного иммунитета и/или иммунитета слизистых оболочек.

Иммуногенные композиции по изобретению можно вводить однократно или многократно. В данном изобретении предпочтительно однократное введение. Альтернативно, эффективным может быть введение еще одной стандартной дозы после первой стандартной дозы. Обычно вторая (или третья, четвертая, пятая и так далее) стандартная доза идентична первой стандартной дозе. Обычно иммуногенные композиции по изобретению вводят тремя стандартными дозами. Обычно иммуногенные композиции по изобретению будут вводить внутримышечно, например, внутримышечным введением в бедро или верхнюю часть плеча.

Многократное введение может быть использовано в схеме первичной иммунизации и/или в схеме бустерной иммунизации. За схемой первичного введения может следовать схема бустерного введения. Подходящий интервал между первичными введениями (например, 4-16 недель) и между первичными и бустерными введениями может быть определен рутинным образом.

Для обеспечения полной эффективности типичная схема первичной иммунизации (в частности для ребенка) может включать введение более чем одной дозы. Например, введение может быть проведено: в 0 и 6 месяцев (с первым введением в 0 месяцев); в 0, 1, 2 и 6 месяцев; на 0 сутки и 21 сутки с последующим введением третьей дозы в 6-12 месяцев; в 2, 4 и 6 месяцев; в 3, 4 и 5 месяцев; в 6, 10 и 14 недель; в 2, 3 и 4 месяца; или в 0, 1, 2, 6 и 12 месяцев. Композиции для детей могут также быть использованы для бустерного введения, например, детям второго года жизни.

Композиции могут также быть использованы для бустерного введения, например, детям второго года жизни. Бустерные вакцинные композиции по изобретению для подростков вводят однократно лицам в возрасте 10 лет и старше. Иммуногенная композиция по изобретению может быть введена в качестве бустерной вакцины пациенту, вакцинированному ранее как от дифтерии, так и от столбняка, и предпочтительно также от коклюша. Эти пациенты отличаются от общей популяции наличием ответа иммунологической памяти на введенную ранее вакцину. Пациенты могли получить последние из своих предшествующих вакцин от дифтерии и/или столбняка по меньшей мере за пять лет до получения вакцины по изобретению. Возраст пациентов, получающих вакцины, может составлять от 4 до 65 лет, например, 11-64 года, 10-18 лет и так далее.

Может быть использован любой подходящий путь введения. Например, композиция может быть введена внутримышечно, внутривенно, подкожно, трансдермально или внутрикожно. Если желательно, композиция может быть введена интрамукозальным путем, таким как интратротова, интраназальный, интравагинальный и интаректальный. Введение беременной особи женского пола и младенцу может быть проведено одним и тем же путем или разными путями. Композиции по изобретению могут быть введены внутримышечной инъекцией, например, в плечо или бедро.

Вакцины, изготовленные по изобретению, могут быть введены пациентам одновременно с другой вакциной, например, одновременно с пневмококковой конъюгатной вакциной, такой как PREVNAR™, одновременно с вакциной от гриппа, одновременно с ротавирусной вакциной, одновременно с вакциной против кори, краснухи и паротита (MMR) и так далее.

Там, где композиции по изобретению содержат адъювант на основе алюминия, возможно осаждение компонентов при хранении. Поэтому композицию следует встряхивать перед ее введением пациенту. После встряхивания композиция будет представлять собой мутную белую суспензию.

Воплощения

Воплощение 1. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от *Bordetella pertussis*.

Воплощение 2. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Воплощение 3. Иммуногенная композиция согласно воплощению 1 или воплощению 2, где бесклеточный коклюшный антиген выбран из группы, состоящей из (1) детоксифицированного коклюшного

токсина (PT), (2) филаментного гемагглютинина (FHA) и (3) пертактина (PRN).

Воплощение 4. Иммуногенная композиция согласно воплощению 3, где бесклеточный коклюшный антиген содержит PT, FHA и PRN.

Воплощение 5. Иммуногенная композиция согласно воплощению 4, где PT, FHA и PRN присутствуют в соотношении 16:16:5 (при измерении по массе).

Воплощение 6. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, где дифтерийный анатоксин присутствует в концентрации от 4 Lf/мл до 8 Lf/мл, например 4 Lf на дозу 0,5 мл.

Воплощение 7. Иммуногенная композиция согласно любому из воплощений 1-6, где дифтерийный анатоксин присутствует в концентрации от 20 до 50 Lf/мл, например 25 Lf на дозу 0,5 мл.

Воплощение 8. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, где столбнячный анатоксин присутствует в концентрации приблизительно 5 Lf на дозу 0,5 мл.

Воплощение 9. Иммуногенная композиция согласно любому из воплощений 1-8, где столбнячный анатоксин присутствует в концентрации от 5 до 10 Lf на дозу 0,5 мл.

Воплощение 10. Иммуногенная композиция согласно любому из воплощений 1-9, где дифтерийный анатоксин и столбнячный анатоксин присутствуют в соотношении "дифтерийный анатоксин : столбнячный анатоксин", превышающем 1, например, от 2:1 до 3:1 (при измерении в Lf-единицах), таком как 2,5:1.

Воплощение 11. Иммуногенная композиция согласно любому из воплощений 1-9, где дифтерийный анатоксин и столбнячный анатоксин присутствуют в соотношении "столбнячный анатоксин : дифтерийный анатоксин", превышающем 1, например, от 1,5:1 до 2,5:1 (при измерении в Lf-единицах), таком как 2:1.

Воплощение 12. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, содержащая адъювант.

Воплощение 13. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, содержащая адъювант на основе соли алюминия.

Воплощение 14. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, представляющая собой жидкий раствор или суспензию для инъекций.

Воплощение 15. Иммуногенная композиция согласно любому из воплощений 1-14, представляющая собой лиофилизированную композицию.

Воплощение 16. Иммуногенные композиции согласно любому из предыдущих воплощений, где композиция свободна от консервантов.

Воплощение 17. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, представляющая собой вакцину.

Воплощение 18. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, предназначенная для введения человеку.

Воплощение 19. Иммуногенная композиция согласно любому из предыдущих воплощений, предназначенная для применения в качестве лекарственного средства.

Воплощение 20. Способ индуцирования иммунного ответа у пациента, включающий стадию введения пациенту композиции согласно любому из предыдущих воплощений.

Воплощение 21. Способ индуцирования иммунного ответа у пациента, включающий стадию введения пациенту композиции, содержащей (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Воплощение 22. Способ изготовления иммуногенной композиции согласно любому из воплощений 1-19, включающий смешивание первого компонента, содержащего везикулы наружной мембраны (OMV), и второго компонента, содержащего бесклеточный коклюшный антиген, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин.

Воплощение 23. Способ согласно воплощению 22, где OMV первого компонента лиофилизированы.

Воплощение 24. Способ согласно воплощению 22 или воплощению 23, где второй компонент содержит водные антигены.

Воплощение 25. Способ согласно воплощению 24, включающий дополнительную стадию восстановления лиофилизированных OMV в первом компоненте водными антигенами второго компонента.

Воплощение 26. Способ согласно любому из воплощений 22-25, где первый компонент не содержит адъювант.

Воплощение 27. Способ согласно любому из воплощений 22-26, где второй компонент содержит адъювант, например адъювант на основе соли алюминия.

Воплощение 28. Набор для приготовления иммуногенной композиции согласно любому из воплощений 1-19, содержащей первый компонент, содержащий OMV, и второй компонент, содержащий бесклеточный коклюшный антиген, столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин, где эти два компонента представлены в отдельных контейнерах.

Воплощение 29. Набор согласно воплощению 28, где OMV в первом компоненте лиофилизированы.

Воплощение 30. Набор согласно воплощению 28 или воплощению 29, где второй компонент содержит водные антигены.

Воплощение 31. Набор согласно любому из воплощений 28-30, где первый компонент не содержит адьювант.

Воплощение 32. Набор согласно любому из воплощений 28-31, где второй компонент содержит адьювант, например адьювант на основе соли алюминия.

Воплощение 33. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин, в частности генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 34. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 35. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 36. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, и где OMV не являются химически детоксицированными.

Воплощение 37. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, и где OMV не являются химически детоксицированными и/или обработанными формальдегидом, формалином, глутаровым альдегидом, перекисью водорода и их комбинациями или производными.

Воплощение 38. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, и где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры.

Воплощение 39. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры и где OMV не являются химически детоксицированными и/или обработанными формальдегидом, формалином, глутаровым альдегидом, перекисью водорода и их комбинациями или производными.

Воплощение 40. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из группы, состоящей из (1) детоксицированного коклюшного токсина (PT), (2) филаментного гемагглютинина (FHA) и (3) пертактина (PRN), (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Воплощение 41. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из группы, состоящей из (1) детоксицированного коклюшного токсина (PT), (2) филаментного гемагглютинина (FHA) и (3) пертактина (PRN), (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры и где OMV не являются химически детоксицированными.

Воплощение 42. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из группы, состоящей из (1) детоксицированного коклюшного токсина (PT), (2) филаментного гемагглютинина (FHA) и (3) пертактина (PRN), (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella*

имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, с нокаутом или делецией гена *AggT*, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры и где OMV не являются химически детоксифицированными и/или обработанными формальдегидом, формалином, глутаровым альдегидом, перекисью водорода и их комбинациями или производными.

Воплощение 61. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, содержащие генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Воплощение 62. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, содержащие генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Воплощение 63. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, содержащие генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Воплощение 64. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV) *Bordetella pertussis*, содержащие генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры, (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин.

Воплощение 65. Иммуногенная композиция согласно воплощениям 61-64, где 100% коклюшного анатоксина в везикулах наружной мембраны представляют собой генетически детоксифицированный PT.

Воплощение 66. Иммуногенная композиция согласно воплощениям 61-65, где 100% коклюшного анатоксина в везикулах наружной мембраны представляют собой генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

Общие понятия

Термин "содержащий" охватывает "включающий", например, композиция, "содержащая" X, может содержать что-либо дополнительное, например, X плюс Y. Термин "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, "по существу свободная" от Y, может быть полностью свободной от Y. В некоторых воплощениях термин "содержащий" относится к включению указанного активного агента, такого как указанные полипептиды, а также к включению других активных агентов и фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов, смягчающих агентов, стабилизаторов и так далее, известных в фармацевтической промышленности. В некоторых воплощениях термин "состоящий по существу из" относится к композиции, единственным активным ингредиентом которой является указанный активный ингредиент (ингредиенты), например антигены, тем не менее, могут быть включены другие соединения, которые предназначены для стабилизации, консервации композиции и так далее, но не вовлечены непосредственно в терапевтический эффект указанного активного ингредиента. Применение переходной фразы "состоящий по существу" означает, что объем пункта следует трактовать как охватывающий конкретные материалы или стадии, указанные в данном пункте, и те, которые не оказывают существенного влияния на основное(ые) и новое(ые) свойство(а) заявленного изобретения. См. *In re Herz*, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (выделено в первоисточнике); см. также MPEP § 2111.03. Таким образом, термин "состоящий по существу из", при использовании в пункте формулы изобретения, не следует трактовать как эквивалентный термину "содержащий". Если прямо не указано иное, термин "состоящий из" и его варианты означает "ограниченный". В некоторых областях вместо "состоящий по существу" может быть использован термин "содержащий активный ингредиент, состоящий из". Термин "приблизительно", в привязке к числовому значению x, означает, например, $x \pm 10\%$, $x \pm 5\%$, $x \pm 4\%$, $x \pm 3\%$, $x \pm 2\%$, $x \pm 1\%$. Термин "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, "по существу свободная" от Y, может быть полностью свободной от Y. При необходимости, слово "по существу" может быть опущено в определении по изобретению. Там, где в способах указаны стадии введения, например, (а), (б), (в) и так далее, подразумевают, что эти стадии являются последовательными, то есть стадия (в) следует за стадией (б), которой предшествует стадия (а). Антитела будут как правило специфичны в отношении своей мишени, то есть их аффинность в отношении мишени будет выше, чем в отношении неродственного контрольного белка, такого как бычий сывороточный альбумин.

Если не указано иное, способ, включающий стадию смешивания двух или более компонентов, не требует какого-либо конкретного порядка смешивания. Поэтому компоненты можно смешивать в любом порядке. В случае трех компонентов можно смешивать друг с другом два компонента, а затем смешивать полученную смесь с третьим компонентом, и так далее.

Антитела будут обычно специфичны в отношении своей мишени. Таким образом, их аффинность в отношении мишени будет выше, чем в отношении неродственного контрольного белка, такого как бычий

сывороточный альбумин.

При описании компонента как "адсорбированного" на адьюванте предпочтительна адсорбция по меньшей мере 50% (по массе) этого антигена, например, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или более. При полной адсорбции компонента он не должен обнаруживаться в супернатанте композиции после центрифугирования.

Количества конъюгатов обычно указаны по массе сахара (то есть доза всего конъюгата (носитель плюс сахарид) выше указанной дозы) во избежание вариативности в зависимости от выбора носителя.

В случае использования веществ животного (и, в частности, бычьего) происхождения при культивировании клеток, они должны быть получены из источников, свободных от трансмиссивных губчатых энцефалопатий (TSE) и, в частности, свободных от губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE).

Варианты осуществления изобретения

Материалы и методы

TdaP-вакцина

Использовали TdaP-вакцины, имеющиеся в продаже. TdaP-вакцина содержит гидроксид алюминия в качестве адьюванта и столбнячный анатоксин, дифтерийный анатоксин и бесклеточные коклюшные антигены (PT, FHA и 69K, также называемый пертактином или PRN).

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В данном исследовании были использованы следующие штаммы *B. pertussis*: W28 PT 9K/129G (Piza et al., 1989) с генетически детоксифицированным коклюшным токсином и его производный штамм с нокаутом (KO) *arnT* без гена *arnT*, полученный, как описано ниже. Хранение и культивирование бактерий обычно проводили, как описано в Gasperini et al, 2018, и кратко изложено ниже. Бактерии хранили при 80°C и восстанавливали высеванием на чашки с агаром Борде-Жангу (BG), дополненным 15% (об./об.) овечьей крови, в течение 3 суток при 37°C. Затем бактерии инокулировали при начальной оптической плотности при 600 нм (OD600) 0,05-0,1 в среду Стейнера-Шольте (Stainer-Scholte), дополненную 0,4% (мас./об.) моногидрохлорида L-цистеина, 0,1% (мас./об.) FeSO₄, 0,2% (мас./об.) аскорбиновой кислоты, 0,04% (мас./об.) никотиновой кислоты, 1% (мас./об.) восстановленного глутатиона. Культуры выращивали в ротационных шейкерах при 37°C. Рекомбинантные штаммы *E. coli* DH5 хранили при 80°C, восстанавливали высеванием на чашки с LB-агаром, дополненным 20 г/мл хлорамфеникола на 16 часов при 37°C. Для жидких культур, бактерии инокулировали в среду LB, дополненную 20 г/мл хлорамфеникола, и выращивали в ротационных шейкерах при 37°C в течение 16 ч.

Конструирование *arnTKO*

Для конструирования штамма *B. pertussis*, мутантного по *arnT*, сходного с описанным в Geurtsen et al., 2009, авторы изобретения амплифицировали часть ДНК, расположенную перед *arnT*, из штамма *B. pertussis* W28 PT-9K/129G с использованием праймеров 5'-ATAGAATTCACGCGGTGCGGCCACGCGC-3' (SEQ ID NO: 1) и 5'-ATAGGATCCGCCAGGACCTGGCCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 2), содержащих сайты EcoRI и BamHI (подчеркнуты). Кроме того, получали фрагмент ДНК, расположенный после *arnT*, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами 5'-ATAGGATCCGGACGAAGCCTTCAAGGGGC-3' (SEQ ID NO: 3) и 5'-ATAAAGCTTCGTCCAGGCGCGCCAGCGC-3' (SEQ ID NO: 4), содержащими сайты BamHI и HindIII (подчеркнуты). Оба ПЦР-продукта клонировали в pUC19 вместе с кассетой резистентности к канамицину (KanR), содержащей сайты BamHI на обоих концах. Полученные плазмиды pUC19-*arnT_{up}*-KanR-*arnT_{down}* расщепляли рестриктазами EcoRI и HindIII и полученный EcoRI-HindIII-фрагмент лигировали в суицидный вектор pSORTP1, обработанный рестриктазами EcoRI-HindIII. Окончательную конструкцию, названную pSORTP1-*arnTKO*, использовали для конструирования *B. pertussis* (штамм W28 PT-9K/129G), мутантной по *arnT*, посредством аллельного обмена. Проводили скрининг трансформантов посредством ПЦР с использованием различных наборов праймеров.

Очистка OMV

OMV получали из W28 PT-9K/129G и его *arnTKO*-производного. Выделение из жидких культур *B. pertussis* проводили после 3 суток культивирования в колбах с дефлекторами объемом 250 мл. Отношение объема жидкости к объему воздуха было важным для производственного выхода OMV, и его поддерживали на уровне 1:5. Затем бактерии осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 30 минут. Бесклеточные супернатанты отбирали и фильтровали через 0,22 мкм фильтры Stericup (Millipore). После ультрацентрифугирования при 175000 g в течение 2 часов полученный осадок OMV промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором Дульбекко (D-PBS), проводили еще одно ультрацентрифугирование при 175000 g продолжительностью 2 часа и, в завершение, ресуспендировали его в 100 мкл D-PBS. Количество OMV определяли анализом общего содержания белка по методу Лоури (DC Protein Assay, BioRad), следуя инструкциям изготовителя.

Результаты

Препараты везикул наружной мембраны были получены из двух детоксифицированных вакцинных штаммов *B. pertussis*, штамма W28 PT-9K/129G, экспрессирующего генетически детоксифицированный

коклюшный токсин, и его производного штамма W28 PT-9K/129G arnTKO с генетически модифицированной структурой липида А без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры в результате делеции гена, кодирующего ArnT. arnTKO-мутант W28 PT-9K/129G (Bp-ΔarnT) демонстрирует в 10 раз меньшее связывание с TLR4 (фиг. 1(a)) и индуцирует значительно меньшую секрецию IL-6 из МКПК, чем штамм W28 PT-9K/129G (Bp WT) (фиг. 1(b)).

Было показано, что как OMV вакцинного штамма W28 9K/129G (Bp WT), так и OMV вакцинного штамма W28 9K/129G arnTKO (Bp ΔarnT) содержат малые количества компонентов FHA, 69K и коклюшного токсина (фиг. 2). И мыши, иммунизированные с использованием OMV обоих штаммов, вырабатывали антитела против всех трех бесклеточных коклюшных компонентов в обнаружимых уровнях (фиг. 3).

Иммунизации мышей для получения мышинной антисыворотки

У мышей BALB/c (самки, возраст 6 недель) (Charles River Laboratories International Inc., Уилмингтон, штат Массачусетс) проводили либо три внутрибрюшинных (в/б) иммунизации с интервалом три недели, либо две внутримышечных (в/м) иммунизации с интервалом 4 недели, используя по 100 мкл композиции (по 50 мкл в каждое бедро). Сыворотки получали через 2 недели после каждой иммунизации. OMV включали в состав композиций в дозах, указанных для каждого исследования, с 2 мг/мл Al(OH)₃. В случае комбинированных композиций OMV включали в состав композиций в дозах 0,1, 0,5 и 2,5 мкг вместе с 1/5 дозы TdaP-антигенов, применяемой у человека (см. ниже), в общем объеме 100 мкл в 2 мг/мл Al(OH)₃.

Доза TdaP-вакцины, применяемая у человека (0,5 мл)					
PT	FHA	69K	D	T	Al(OH) ₃
4 мкг	4 мкг	8 мкг	2 Lf (1,2 мкг)	5 Lf (3,2 мкг)	1 мг

Иммунологический анализ мышинных антисывороток методом Luminex

Титры общего IgG против всех вакцинных антигенов анализировали пентаплексным иммунологическим анализом Luminex, как описано в Agnolon et al., 2015, и ниже. Титры выражены в относительных единицах Luminex (Relative Luminex Units) на мл (RLU/мл), полученных при преобразовании зарегистрированной медианной интенсивности флуоресценции (MFI) относительно гипериммунной контрольной антисыворотки. Пентаплексный иммунологический анализ Luminex, основанный на микросферах Mag-Plex, проводили, следуя инструкциям изготовителя, для количественного определения титров антител против TdaP в мышинных сыворотках. Титры IgG определяли у отдельных животных после инкубации микросфер, связанных с антигенами, с разведенными сыворотками (1:10000, после 1; 1:20000, после 2). Для выявления использовали вторичное антитело, конъюгированное с фикоэритрином (1:400). При измерении IgG определяли медианную интенсивность флуоресценции (MFI) на анализаторе Luminex FLEX-MAP 3D (Luminex Corporation, Остин, штат Техас) с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 5.0 (Bio-Rad, Геркулес, штат Калифорния). Для преобразования значений MFI общего IgG в RLU/мл (относительные единицы Luminex) использовали антисыворотку, специфичную в отношении каждого антигена. Для каждого антигена в анализе был определен предел количественного определения (LOQ), и его использовали как пороговое значение для определения положительных результатов. Результаты показаны на фиг. 4.

Анализ ингибирования адгезии

Для анализа ингибирования адгезии *B. pertussis* бактерии выращивали в течение 16 ч в жидкой культуре, затем осаждали при 8000 g в течение 5 минут и ресуспендировали в d-PBS при OD₆₀₀ 0,5. Для флуоресцентного мечения клеток *B. pertussis* бактериальную суспензию объемом 445 мкл затем смешивали с 50 мкл 1 М NaHCO₃ и 5 мкл сукцинимидилового эфира карбоновой кислоты Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Уолтем, штат Массачусетс) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. После центрифугирования при 8000 g в течение 5 мин при комнатной температуре супернатант удаляли, а осадок промывали один раз с использованием 1 мл d-PBS для удаления несвязанного красителя и, в завершение, бактерии ресуспендировали в среде F12-K при OD₆₀₀ 0,2. Проводили 4-кратное серийное разведение объединенных мышинных сывороток в среде F-12K, содержащей 1% (об./об.) сыворотки неиммунизированных мышей, и инкубировали их с мечеными *B. pertussis* в течение 1 ч при 37°C в соотношении 1:1. По сто микролитров смесей "бактерии/сыворотка" переносили в трех повторах на высеянные клетки A549. Инфицированные клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После интенсивной промывки для удаления несвязанных бактерий измеряли флуоресценцию с возбуждением/эмиссией при 485/535 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов Tecan Infinite F200PRO.

Иммунизация мышей с использованием wP или трех различных доз OMV приводила к индуцированию антител, которые могут подавлять способность *B. pertussis* к адгезии на культивированных эпителиальных клетках A549 *in vitro*. Сыворотки мышей, иммунизированных инактивированными целыми бактериями, продемонстрировали наибольшее ингибирование бактериальной адгезии, а ингибирование бактериальной адгезии, индуцированное OMV-вакцинами, было пропорционально дозе антигена. TdaP-вакцина не приводила к высоким уровням антител, ингибирующих адгезию флуоресцентно меченных

бактерий, у мышей, и только малые разведения сывороток (1/40 и выше) приводили к снижению флуоресценции в данном анализе. Было обнаружено, что OMV в максимальной дозе 10 мкг после вакцинации индуцировали антитела, обеспечивающие наибольшее ингибирование бактериальной адгезии, которое было сопоставимо с индуцированным в контроле целыми бактериями (фиг. 5).

Тест Кендрик на эффективность с интракраниальным контрольным заражением

Мышей CD1 (возраст 6 недель) вакцинировали однократно внутрибрюшинно (в/б) путем введения 500 мкл вакцинных композиций и через 2 недели после иммунизации проводили контрольное заражение путем интракраниального введения 30 мкл суспензии штамма *B. pertussis* 18323 и определяли выживаемость мышей на протяжении 2 недель после контрольного заражения в соответствии с тестом Кендрик на эффективность с интракраниальным контрольным заражением (Kendrick et al., 1947) и в соответствии с руководствами Европейской Фармакопеи. В качестве положительного контроля использовали стандарт NIBSC в трех дозах (1/10, 1/50 и 1/250 дозы, применяемой у человека) и OMV включали в состав композиций в дозах 0,4, 2 и 10 мкг в 2 мг/мл Al(OH)₃.

Тест защиты мышей после интрацеребрального заражения (тест Кендрик) эффективен для определения эффективности цельноклеточных коклюшных вакцин и является единственным тестом, продемонстрировавшим корреляцию с защитой у детей (Xing et al., 2014 [40]). Иммунизация мышей с использованием OMV в возрастающих дозах (в дозах 0,4, 2 и 10 мкг) обеспечивала нарастающие уровни защиты после интракраниального контрольного заражения *B. pertussis* (фиг. 6), что было сопоставимо с wP-стандартом NIBSC. Защита, индуцированная OMV-вакцинами, была пропорциональна дозе антигена и успешно приводила к сильному защитному ответу, сопоставимому с ответом при использовании wP (фиг. 6).

Аэрозольное контрольное заражение

Мышей C57BL/6 (самки, возраст 10 недель) вакцинировали однократно внутрибрюшинно (в/б) путем введения 100 мкл вакцинных композиций и проводили контрольное заражение через 3 недели, как описано ранее (Misiak et al., 2017a) и ниже. Цельноклеточную коклюшную вакцину (wP) использовали в качестве положительного контроля в указанных дозах, составляющих 1/5 или 1/10 дозы, применяемой у человека. OMV в указанных дозах, составляющих 0,4, 2 и 10 мкг, включали в состав композиций с 2 мг/мл Al(OH)₃. В случае комбинированных композиций OMV включали в состав композиций в дозе 2,5 мкг вместе с 1/5 дозы Tdap-антигенов, применяемой у человека (см. ниже), в общем объеме 100 мкл в 2 мг/мл Al(OH)₃.

Доза Tdap, применяемая у человека (объем дозы 0,5 мл)	PT (8 мкг)	FHA (8 мкг)	PRN (2,5 мкг)	TT (5 Lf)	DT (2 Lf)	Квасцы (1 мг)
--	---------------	----------------	------------------	--------------	--------------	------------------

Образцы сыворотки и селезенки от иммунизированных мышей (по 4 мыши на группу) получали через 3 недели после вакцинации, за одни сутки до контрольного заражения. Антигенспецифичную выработку цитокинов клетками селезенки и антитела в сыворотке анализировали посредством ELISA. Остальных мышей затем подвергали контрольному заражению вирулентным штаммом *B. pertussis*, как описано ниже, и число КОЕ в легких оценивали на 1, 3, 7 и 14 сутки после инфицирования.

Воздушно-капельное инфицирование мышей проводили, подвергая их воздействию аэрозоля *B. pertussis* (штамм BP338; 1×10^9 КОЕ/мл) на протяжении 10 мин с последующими 10 мин покоя, используя небулайзер PARI TurboBOY SX. Течение инфекции, вызванной *B. pertussis*, оценивали путем проведения подсчета КОЕ в легких в группах из трех-четырех мышей с определенными интервалами после контрольного заражения. Легкие асептически извлекали и гомогенизировали в 1 мл стерильного физиологического раствора с 1% казеина. Неразведенные и серийно разведенные гомогенаты (100 мкл) из отдельных легких высевали в двух повторах на чашки с агаром Борде-Жангу и после 6 суток инкубации при 37°C проводили подсчет бактериальных колоний.

Титры антител измеряли посредством ELISA, как описано ранее (Misiak et al., 2017b) и ниже. Количество FHA-специфичных антител анализировали посредством ELISA с использованием FHA (1 мкг/мл), сорбируемого на планшеты, антител против мышинового IgG1 или IgG2a, конъюгированных с биотином, и стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (BD Pharmingen, Франклин-Лэйкс, штат Нью-Джерси). Уровни антител выражены в виде среднего конечного титра плюс/минус SEM, определенного экстраполяцией линейной части титрационной кривой на 2 SE выше фонового значения, полученного с использованием неиммунной сыворотки.

Иммунизация мышей с использованием wP и трех разных доз OMV приводила к индуцированной выработке антител, специфичных в отношении *B. pertussis*. wP приводила к наиболее высоким титрам общего IgG против FHA, которые были значительно выше, чем при всех трех дозах OMV (фиг. 7). Вакцинация с использованием wP приводила к наиболее высоким Th1-ответам и, соответственно, наиболее высоким титрам IgG2c против FHA (фиг. 7). IgG2c против FHA были выявлены в сыворотках 1 из 4 и 3 из 4 мышей, вакцинированных OMV 2 и OMV 10, соответственно. У мышей, иммунизированных OMV 0,4, не было выявлено FHA-специфичных IgG2c. Различия FHA-специфичных ответов указывают на значительно меньшее содержание FHA в OMV по сравнению с wP.

Высокие титры защитных антител, вместе с индуцированием Th1-ответа, являются ключевым фактором для защиты от *V. pertussis*. Однократная иммунизация с использованием wP, OMV 0,4, OMV 2 и OMV 10 приводила к разным уровням защиты от воздушно-капельного заражения *V. pertussis* (фиг. 8). У мышей, иммунизированных wP-вакциной, уровень защиты был наиболее высоким, и у большинства из них инфекция проходила к 7 суткам после заражения. Кроме того, у мышей, иммунизированных с использованием wP, число КОЕ во всех временных точках после инфицирования было значительно меньше, чем у мышей, получавших OMV-вакцину во всех трех тестируемых концентрациях. Защита, индуцированная OMV-вакцинами, была пропорциональна дозе антигена. Тем не менее, защита, индуцированная OMV 10, не была такой же эффективной, как защита, индуцированная вакцинацией с использованием wP. Площади под кривыми клиренса подтвердили, что wP обеспечивала мышам наилучшую защиту от аэрозольного контрольного заражения *V. pertussis*. Было обнаружено, что OMV в максимальной дозе 10 мкг обеспечивали наиболее высокий уровень защиты в мышинной модели контрольного заражения *V. pertussis*. Тем не менее, их эффективность все равно была значительно ниже, чем у wP-вакцины. Также было обнаружено, что ФНА-специфичные IgG2c-ответы были наиболее высокими у мышей, получавших wP-вакцину, но уровни ФНА-специфичных IgG2c в сыворотке повышались по мере повышения дозы OMV-вакцины.

Представленные здесь данные демонстрируют, что уровень защиты, обеспечиваемой OMV-вакцинами, прямо пропорционален применяемой дозе антигена. Они также показывают, что даже в наиболее высокой из выбранных доз OMV-вакцины не обеспечивают такой же защиты, как при использовании wP.

Для сравнения эффективности защиты от заражения *V. pertussis*, которую OMV могут иметь при их добавлении в композицию в комбинации с бесклеточными коклюшными антигенами, использовали модель аэрозольного контрольного заражения с добавлением в бесклеточную коклюшную вакцину квасцов или квасцов плюс OMV и с цельноклеточной вакциной в качестве положительного контроля. Иммунизация мышей с использованием wP, aP и aP плюс OMV приводила к высоким титрам общего IgG против ФНА (фиг. 9). Кроме того, высокие титры общего IgG были выявлены в группе, получавшей только OMV. Существенных различий между четырьмя вакцинированными группами отмечено не было. Высокие титры IgG1 против ФНА были выявлены во всех вакцинированных группах, при этом наиболее высокие титры IgG1 были выявлены в сыворотках мышей, вакцинированных с использованием aP и aP плюс OMV (фиг. 9). Тем не менее, существенных различий между группами выявлено не было. ФНА-специфичные IgG2c были выявлены в сыворотках у 2 из 4 мышей, вакцинированных с использованием wP, у 4 из 4 мышей, вакцинированных с использованием aP плюс OMV, и у 1 из 4 мышей, вакцинированных с использованием OMV (фиг. 9с). В группе aP IgG2c против ФНА выявлены не были. Добавление OMV существенно усиливало IgG2c-ответ на aP.

Было обнаружено, что однократная иммунизация мышей с использованием wP, aP, aP плюс OMV, а также с использованием OMV самих по себе обеспечивала защиту от воздушно-капельного заражения *V. pertussis* (фиг. 10). У мышей, иммунизированных wP-вакциной, уровень защиты был наиболее высоким, и инфекция проходила к 7 суткам после заражения. Вакцинация с использованием aP и OMV обеспечивала сходный уровень защиты. Тем не менее, эффективность этих вакцин была существенно ниже, чем у wP-вакцины. В отличие от этого, было обнаружено, что комбинация aP плюс OMV обеспечивала уровень защиты, сопоставимый с защитой, индуцированной wP-вакциной. Ни в одной из проанализированных временных точек значимых различий между этими двумя вакцинами выявлено не было. Площади под кривыми клиренса подтвердили, что wP и aP плюс OMV были наиболее эффективными из проанализированных вакцин.

Таким образом, однократная иммунизация с использованием всех проанализированных вакцинных композиций в дозе, составляющей 1/5 дозы, применяемой у человека, индуцировала защитный иммунитет против *V. pertussis* у мышей C57BL6. Было обнаружено, что иммунизация OMV самими по себе также обеспечивала существенную защиту, сопоставимую с защитой, индуцированной aP-вакциной.

Сильные Th1-ответы удалось выявить у мышей, вакцинированных с использованием wP, aP плюс OMV и OMV самих по себе, но не у мышей, вакцинированных с использованием aP. Усиленные Th1-ответы у мышей, вакцинированных с использованием aP плюс OMV, по сравнению с мышами, получавшими aP-вакцину, коррелировали с высокими титрами IgG2c против ФНА, которые почти отсутствовали у мышей, иммунизированных с использованием aP. Представленные здесь данные демонстрируют, что добавление OMV к aP-вакцине значительно повышает ее защитную эффективность и приводит к переключению на выработку IgG2c против ФНА и Th1-ответы как при первичной, так и при бустерной вакцинации (фиг. 11).

Бустерная вакцинация

В предыдущих экспериментах для иммунизации использовали мышей, не иммунизированных ранее. Это соответствует первичной вакцинации (то есть вакцинам для детей). Тем не менее, в дальнейшей жизни также необходима бустерная вакцинация, и большинство субъектов в развитых странах будут получать вакцины, имеющиеся в данный момент в продаже, которые более склонны к индуцированию Th2-ответа. Эта ситуация была воспроизведена с использованием имеющейся в продаже вакцины для детей

(Infanrix Hexa) для первой (первичной) иммунизации и различных имеющихся в продаже или экспериментальных бустерных композиций, включая TdaP плюс OMV, для вторичной иммунизации.

Добавление OMV к TdaP-вакцине значительно усиливало Th1-ответы, в то время как различные TdaP-вакцины, даже в присутствии Th1-индуцирующего адьюванта (Alum-TLR7), не изменяли Th-баланс (фиг. 12).

Выводы

Применительно к иммуногенности исследованных вакцинных композиций было установлено следующее.

У мышей, иммунизированных всеми исследованными композициями, OMV, дифтерийные, столбнячные и коклюшные вакцины приводили к титрам специфических антител к соответствующим антигенам.

Иммунологического взаимовлияния между OMV и комбинированными столбнячными/дифтерийными/коклюшными вакцинами отмечено не было.

IgG- и функциональные гуморальные иммунные ответы на вакцинацию комбинацией OMV/дифтерийных/столбнячных/коклюшных антигенов приводили к значительно более высоким титрам, чем наблюдаемые после вакцинации с использованием OMV или TdaP-вакцины самих по себе.

Добавление OMV к aP-вакцине приводит к переключению на выработку IgG2c против FHA, и Th1-ответы удалось выявить у мышей, вакцинированных с использованием wP, aP плюс OMV и OMV самих по себе, но не у мышей, вакцинированных с использованием aP.

Добавление OMV к aP-вакцине в комбинированной вакцине значительно повышает ее защитную эффективность по сравнению с защитными ответами на введение OMV или aP самих по себе. В заключение, не было выявлено признаков сильного взаимовлияния каких-либо из исследованных вакцин. Было обнаружено, что иммунизация с использованием OMV самих по себе обеспечивала значимую защиту в тесте Кендрик на эффективность и в модели аэрозольного контрольного заражения. Добавление OMV к бесклеточным коклюшным вакцинам приводит к более сильной защите, чем при использовании aP- или OMV-вакцин самих по себе. Без ограничения теорией, это может быть обусловлено дополнительными защитными антигенами, присутствующими в везикулах, и/или индуцированием благоприятного Th1-профиля как при первичной, так и при бустерной вакцинации.

Следует понимать, что изобретение описано лишь посредством примеров и может быть модифицировано без выхода за пределы объема и сущности изобретения.

Источники информации

- [1] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Katial *et al.* 2002, *Infect Immun*, 70: 702-707.
- [3] WO2004/019977.
- [4] European patent 0011243.
- [5] Fredriksen *et al.* (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [6] WO01/91788.

- [7] WO2005/004908.
- [8] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [9] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK.
www.nibsc.ac.uk.
- [10] Sesardic *et al.* (2001) *Biologicals* 29:107-22.
- [11] NIBSC code: 98/560.
- [12] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka).
- [13] NIBSC code: 69/017.
- [14] NIBSC code: DIFT.
- [15] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK.
www.nibsc.ac.uk.
- [16] Sesardic *et al.* (2002) *Biologicals* 30:49-68.
- [17] NIBSC code: 98/552.
- [18] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka).
- [19] NIBSC code: TEFT.
- [20] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [21] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [22] WO00/56365.
- [23] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [24] WO01/41800.
- [25] WO03/009869.
- [26] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [27] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [28] WO00/53221.
- [29] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [30] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [31] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [32] Uguzzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [33] Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [34] US patent 6355271.
- [35] WO00/23105.
- [36] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

[37] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224.

[38] Madoff *et al.* (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.

[39] Paoletti *et al.* (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.

[40] Xing D, Markey K, Das RG, Feavers I. 2014. Whole-cell pertussis vaccine potency assays: the Kendrick test and alternative assays. *Expert Rev Vaccines*. 13(10):1175-82.

Geurtsen J, Dzieciatkowska M, Steeghs L, Hamstra HJ, Boleij J, Broen K, Akkerman G, El Hassan H, Li J, Richards JC, Tommassen J, van der Ley P. 2009 Identification of a novel lipopolysaccharide core biosynthesis gene cluster in *Bordetella pertussis*, and influence of core structure and lipid A glucosamine substitution on endotoxic activity. *Infect Immun*. Jul;77(7):2602-11.

Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., Perugini, M., Nencioni, L., De Magistris, M. T., Villa, L., Nucci, D., Manetti, R., and Bugnoli M. (1989) Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* 246, 497–500.

Gianmarco Gasperini, Massimiliano Biagini, Vanessa Arato, Claudia Gianfaldoni, Alessandro Vadi, Nathalie Norais, Giuliano Bensi, Isabel Delany, Mariagrazia Pizza, Beatrice Arico, and Rosanna Leuzzi. 2018. Outer Membrane Vesicles (OMV)-based and Proteomics-driven Antigen Selection Identifies Novel Factors Contributing to *Bordetella pertussis* Adhesion to Epithelial Cells.

Misiak A., Wilk M.M., Raverdeau M., Mills K.H. 2017a. IL-17-Producing innate and pathogen-specific tissue resident memory $\gamma\delta$ T cells expand in the lungs of *Bordetella pertussis*-infected mice. *J Immunol*, 198 pp. 363-374.

Misiak A, Leuzzi R, Allen AC, Galletti B, Baudner BC, D'Oro U, O'Hagan DT, Pizza M, Seubert A, Mills KHG. 2017b. Addition of a TLR7 agonist to an acellular pertussis vaccine enhances Th1 and Th17 responses and protective immunity in a mouse model. *Vaccine*. 2017 Sep 18;35(39):5256-5263.

Agnolon V, Bruno C, Leuzzi R., Galletti B., D'Oro U., Pizza M., Seubert A., O'Hagan D.T., Baudner B.C.. 2015. The potential of adjuvants to improve immune responses against Tdap vaccines: a preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A. *Int J Pharm*, 492, pp. 169-176.

Kendrick PL, Eldering G, Dixon MK, Misner J. Mouse protection tests in the study of pertussis vaccine: a comparative series using the intracerebral route for challenge. *Am J Public Health Nations Health* 1947;37(7):803-10.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая (а) везикулы наружной мембраны (OMV), (б) бесклеточный коклюшный антиген, (в) столбнячный анатоксин и (г) дифтерийный анатоксин в иммунологически эффективных количествах, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

2. Иммуногенная композиция по п.1, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis*, содержащего ген S1, модифицированный с включением мутаций R9K и E129G, и экспрессирующего генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин PT-9K/129G.

3. Иммуногенная композиция по п.2, где OMV имеют происхождение от штамма *Bordetella pertussis* с нокаутом или делецией гена AgnT.

4. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-3, где липид А в OMV имеет модифицированную структуру без глюкозаминных (GlcN) замен на дистальных фосфатных группах центральной структуры.

5. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-4, где бесклеточный коклюшный антиген выбран из группы, состоящей из (1) детоксифицированного коклюшного токсина (PT), (2) филаментного гемагглютинина (FHA) и (3) пертактина (PRN).

6. Иммуногенная композиция по п.5, где бесклеточный коклюшный антиген содержит PT, FHA и PRN.

7. Иммуногенная композиция по п.6, где PT представляет собой генетически детоксифицированный коклюшный анатоксин.

8. Иммуногенная композиция по п.6 или 7, где PT, FHA и PRN присутствуют в соотношении 16:16:5, определенном по массе.

9. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-8, где дифтерийный анатоксин присутствует в концентрации

1) от 4 Lf(единиц флоккуляции)/мл до 8 Lf/мл, предпочтительно 4 Lf на дозу 0,5 мл, или

2) от 20 до 50 Lf/мл, предпочтительно 25 Lf на дозу 0,5 мл.

10. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-9, где столбнячный анатоксин присутствует в концентрации от 5 до 10 Lf на дозу 0,5 мл.

11. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-10, где дифтерийный анатоксин и столбнячный анатоксин присутствуют:

1) в соотношении "дифтерийный анатоксин : столбнячный анатоксин", превышающем 1, предпочтительно от 2:1 до 3:1, при измерении в Lf-единицах, более предпочтительно 2,5:1, или

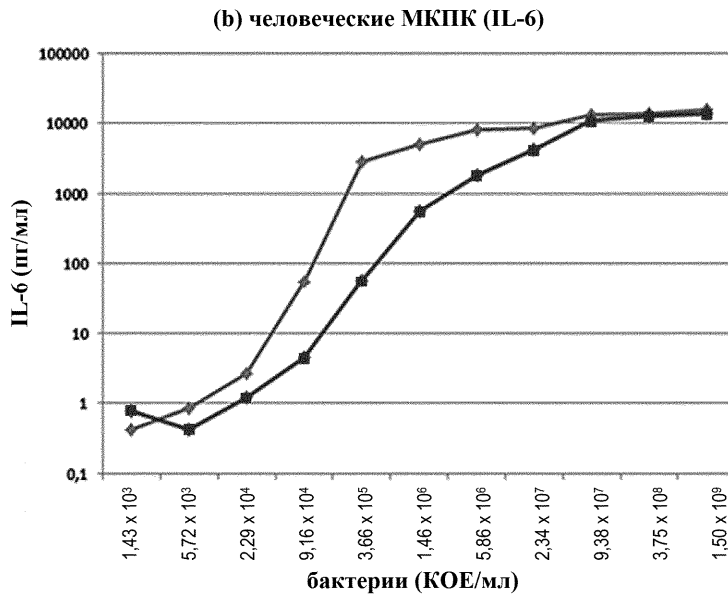
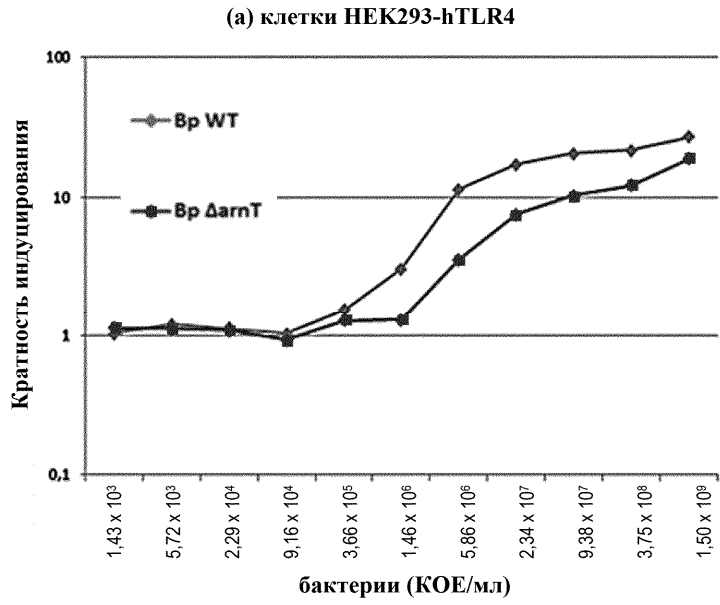
2) в соотношении "столбнячный анатоксин : дифтерийный анатоксин", превышающем 1, предпочтительно от 1,5:1 до 2,5:1, при измерении в Lf-единицах, более предпочтительно 2:1.

12. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-11, содержащая адъювант, возможно адъювант на основе соли алюминия.

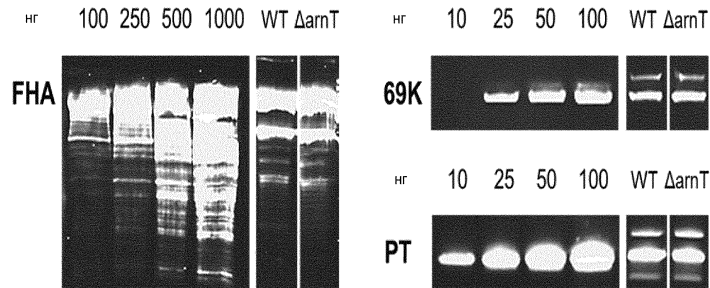
13. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-12, предназначенная для использования в качестве лекарственного средства.

14. Иммуногенная композиция по любому из пп.1-13, предназначенная для индуцирования иммунного ответа у пациента.

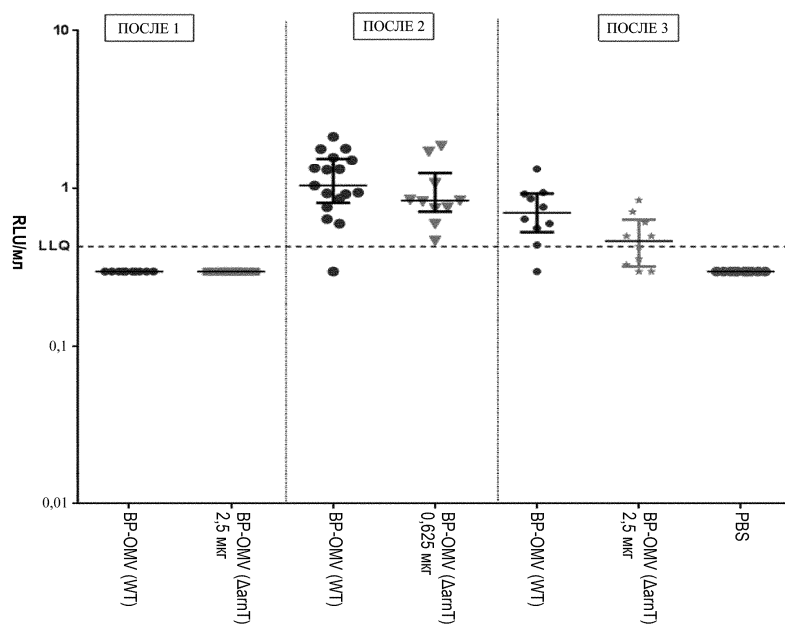
15. Иммуногенная композиция по п.14, предназначенная для индуцирования иммунного ответа против *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* и *Bordetella pertussis* у пациента.



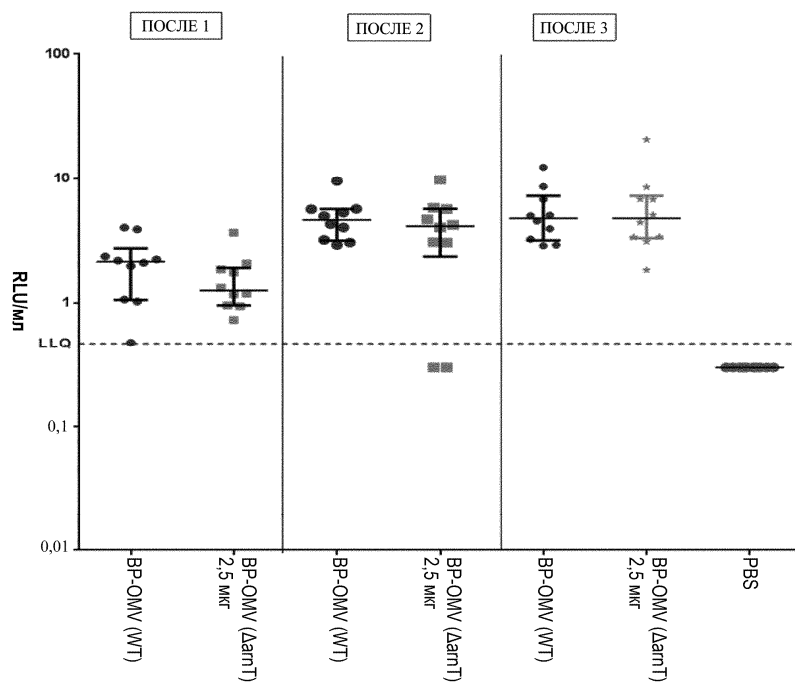
Фиг. 1



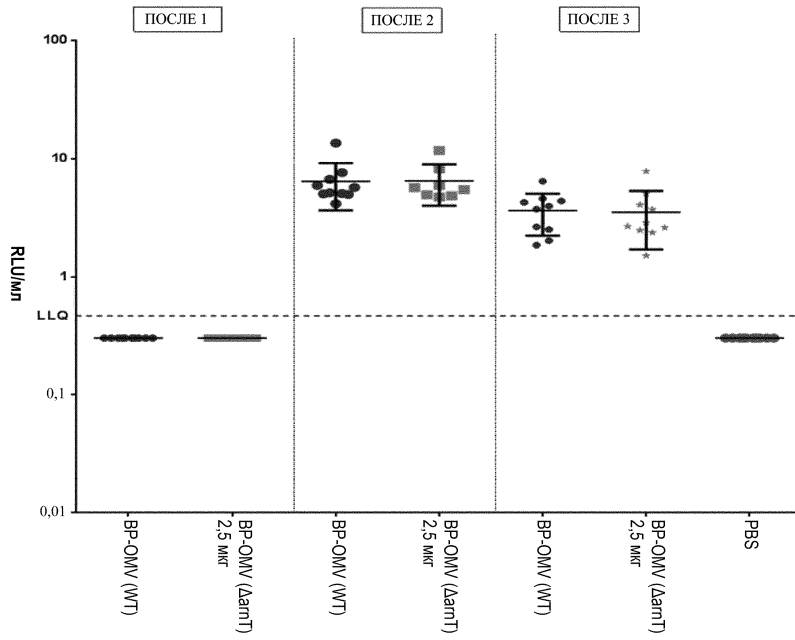
Фиг. 2



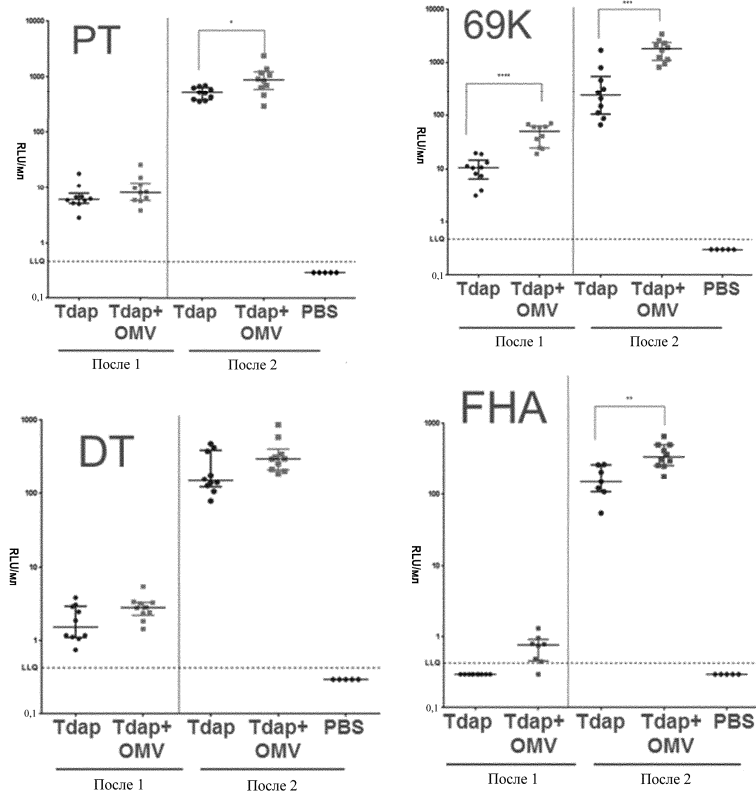
Фиг. 3(а)

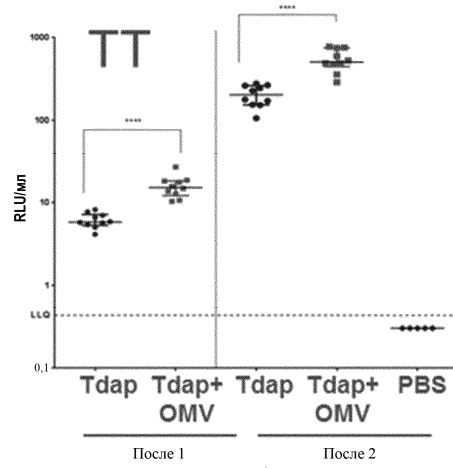


Фиг. 3(б)

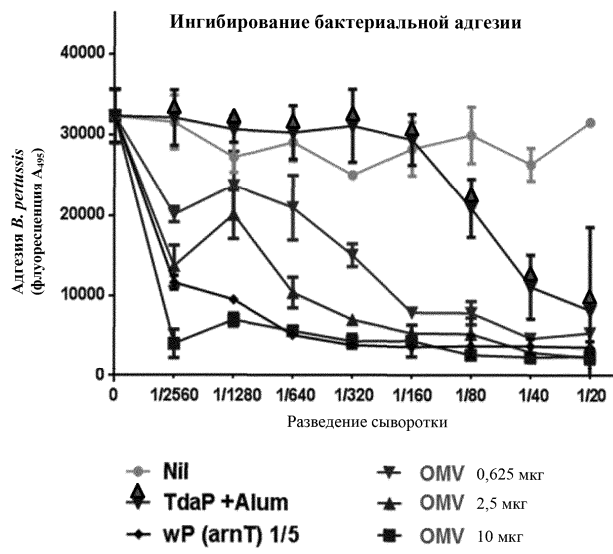


Фиг. 3(с)

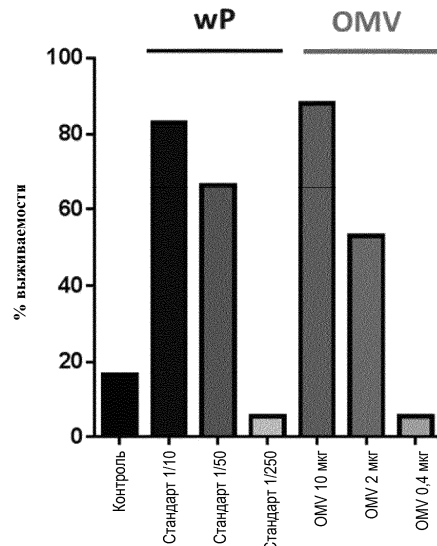




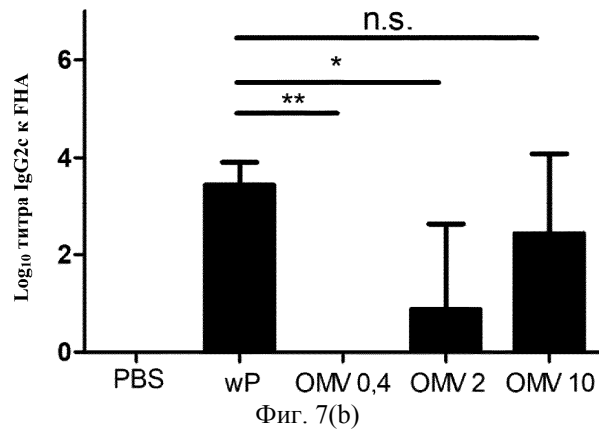
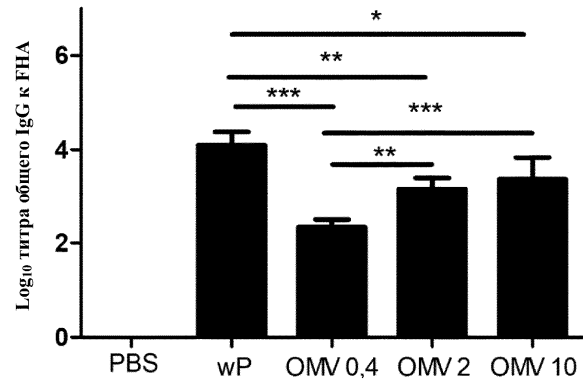
Фиг. 4

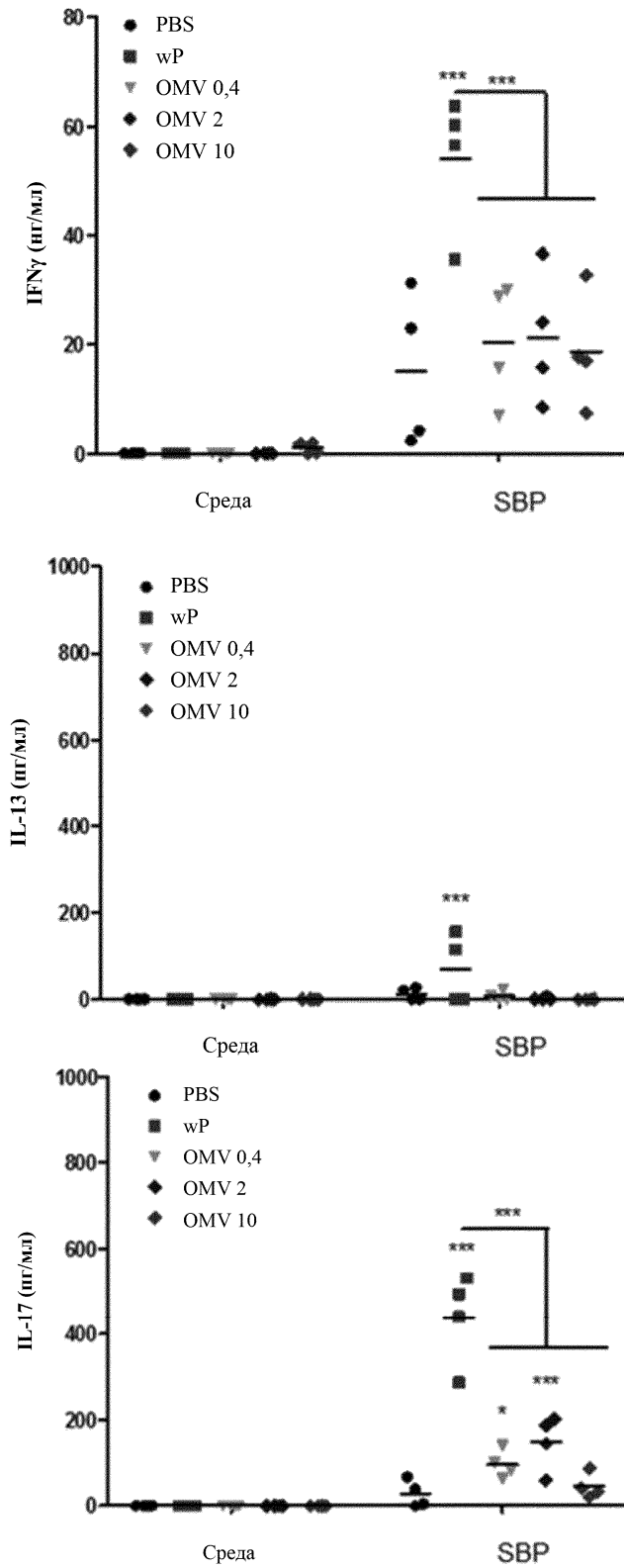


Фиг. 5

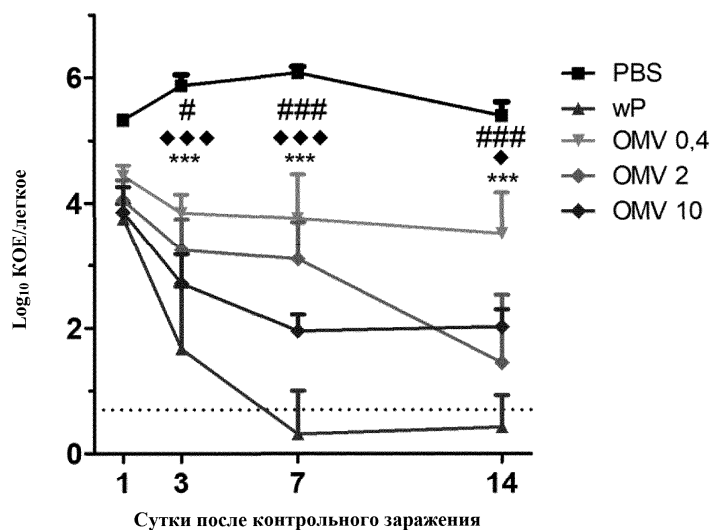


Фиг. 6





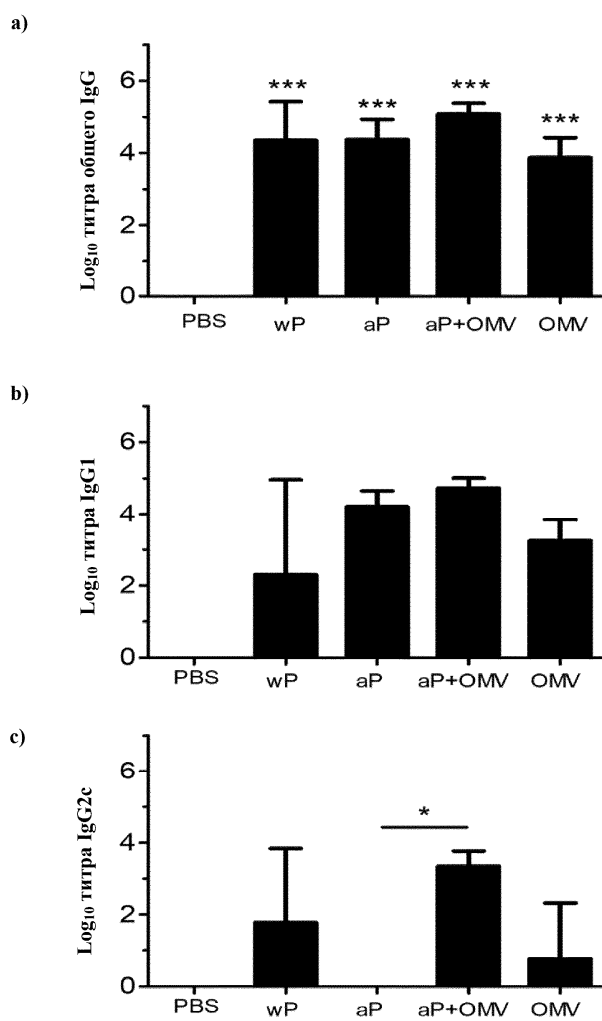
Фиг. 7(с)



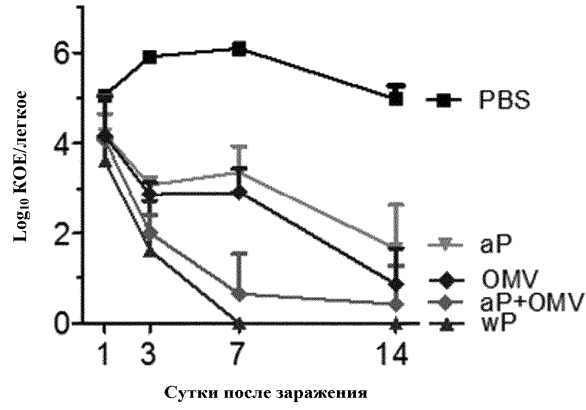
Площадь под кривой:

PBS	wP	OMV 0,4	OMV 2	OMV 10
75,25	11,94	48,93	35,89	29,77

Фиг. 8

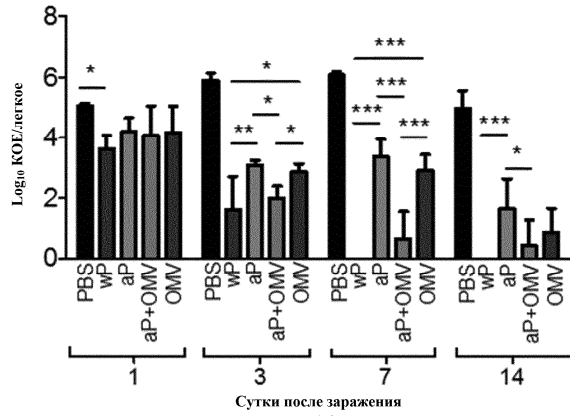


Фиг. 9

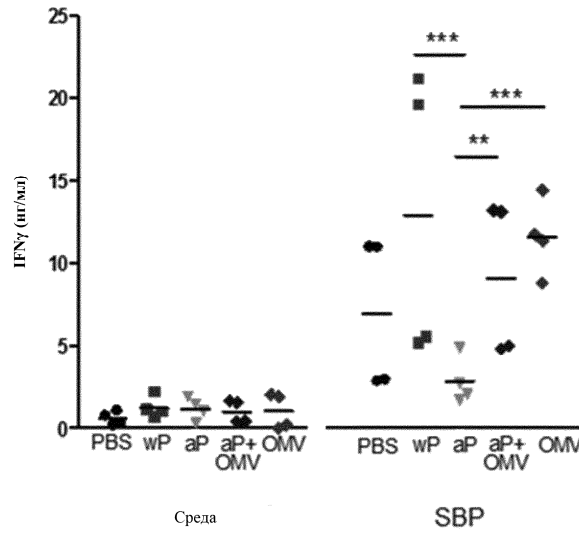


Площадь под кривой:

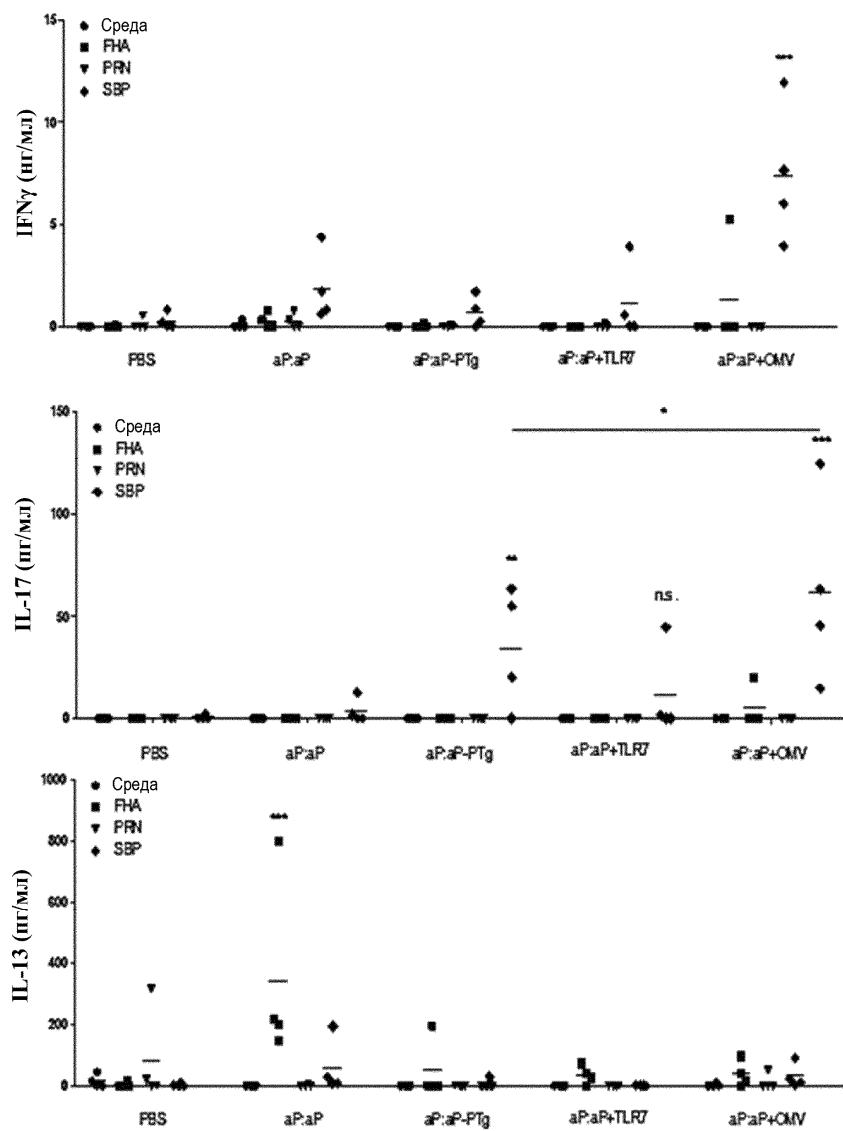
PBS	wP	aP	aP+OMV	OMV
73,73	8,479	37,72	15,17	31,83



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

