

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047205**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента 2024.06.20	(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01) <i>A61K 39/05</i> (2006.01) <i>A61K 39/08</i> (2006.01) <i>A61K 39/02</i> (2006.01) <i>A61K 39/102</i> (2006.01) <i>A61K 39/12</i> (2006.01) <i>A61K 39/13</i> (2006.01) <i>A61K 39/29</i> (2006.01)
(21) Номер заявки 202090316	
(22) Дата подачи заявки 2018.07.13	

(54) СОСТАВ ПОЛНОСТЬЮ ЖИДКОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ, УСИЛЕННОЙ ИММУНОГЕННОСТЬЮ И УМЕНЬШЕННОЙ РЕАКТОГЕННОСТЬЮ И СПОСОБ ЕЁ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 201721025513	(56) WO-A1-2010046934 WO-A1-2017048038 KUTUB MAHMOOD ET AL.: "Hexavalent IPV-based combination vaccines for public-sector markets of low-resource countries", HUMAN VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, vol. 9, no. 9, 19 September 2013 (2013-09-19), pages 1894-1902, XP055512954, US, ISSN: 2164-5515, DOI: 10.4161/hv.25407, the whole document
(32) 2017.07.18	
(33) IN	
(43) 2020.12.08	
(86) PCT/IB2018/055180	
(87) WO 2019/016654 2019.01.24	
(71)(73) Заявитель и патентовладелец: СЕРУМ ИНСТИТЮТ ОФ ИНДИЯ ПВТ ЛТД. (IN)	CHHATWAL JUGESH ET AL.: "Immunogenicity and safety of a liquid hexavalent vaccine in Indian infants", INDIAN PEDIATRICS, INDIAN PEDIATRIC, CALCUTTA, IN, vol. 54, no. 1, 5 November 2016 (2016-11-05), pages 15-20, XP036134225, ISSN: 0019-6061, DOI: 10.1007/S13312-017-0989-2 [retrieved on 2016-11-05] the whole document
(72) Изобретатель: Ракеш Кумар, Шарма Индер Жит, Шитоле Анил Вьянкатрао, Доддапанени Манохар, Шарма Хитт Джиоти (IN)	WO-A2-2012093406 WO-A2-2004110480
(74) Представитель: Вахнин А.М. (RU)	

(57) Предложен состав полностью жидкой комбинированной вакцины, представляющий собой иммуногенную композицию, включающую антиген дифтерийного анатоксина (D), антиген столбнячного анатоксина (T), поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), инактивированный цельноклеточный коклюшный антиген (wP), капсулярный сахарид Haemophilus influenzae типа В (Hib), конъюгированный с белком-носителем, инактивированный антиген вируса полиомиелита (IPV), дополнительно с одним или несколькими антигенами, и процесс ее получения. Состав полностью жидкой комбинированной вакцины характеризуется улучшенной иммуногенностью, пониженной реактогенностью и повышенной стабильностью. Усовершенствованные методы инактивации формальдегида, улучшенный профиль адсорбции антигена дифтерийного анатоксина (D), антигена столбнячного анатоксина (T) и поверхностного антигена гепатита В (HepB), адсорбированного отдельно на адьюванте фосфата алюминия, минимальное общее содержание алюминия (Al³⁺), и оптимизирована концентрация 2-феноксизанола (2-PE) в качестве консерванта.

047205
B1

047205
B1

Область техники

Данное раскрытие сущности изобретения касается области биотехнологий, и более конкретно, комбинированной композиции вакцины, которая состоит из группы антигенов/иммуногенов, и способа ее получения. Кроме того, это раскрытие касается усовершенствованной методологии в области производства комбинированной вакцины.

Предпосылки

Комбинированная вакцина, которая может обеспечить иммуногенность против большого количества заболеваний, является более эффективной по сравнению с одновалентной вакциной, поскольку при ее использовании уменьшается количество инъекций, уменьшается количество осложнений, связанных с многократными инъекциями, уменьшаются затраты на ввод и производство, уменьшаются затраты на хранение, уменьшается риск задержки или пропуска вакцинации и обеспечивается лучшее соблюдение рекомендаций пациентом за счет уменьшения количества отдельных вакцинаций. Более того, полностью жидкие препараты комбинированной вакцины имеют явные преимущества по сравнению с вакцинами, которые требуют разведения. Установлено, что среднее время приготовления полностью жидкой вакцины на половину короче времени приготовления не полностью жидкой вакцины. В ходе этого же исследования почти весь медицинский персонал (97,6%) сообщил, что отдал бы предпочтение использованию полностью жидкой вакцины в своей ежедневной практике. (См.: Soubeyrand B, et al; Оценка времени подготовки полностью жидкой вакцины по сравнению со временем подготовки не полностью жидкой педиатрической шестивалентной вакцины. Изучение трудового процесса во времени; Vaccine 2015; 33: 3976-82).

Известные и доступные в настоящее время комбинированные вакцины могут не содержать соответствующий состав соответствующих антигенов в соответствующих иммуногенных формах для достижения благодаря одной инъекции желаемых уровней безопасности, эффективности и иммуногенности среди уязвимой человеческой популяции по ряду заболеваний. Существует ряд различных комбинаций вакцин, которые можно создать с помощью лишь нескольких дополнительных антигенов. Добавляя от 1 до 4 других компонентов антигена (например, Н1В (лиофилизированный или жидкий), HBV, IPV, HAV) или DTwP, или DTaP, можно получить 44 возможные различные комбинации вакцин. Количество увеличилось бы до тысяч, если бы учитывались отдельные компоненты разных производителей. Поскольку каждая новая комбинированная вакцина (с учетом различий компонентов в зависимости от источника) должна разрабатываться отдельно, чтобы продемонстрировать безопасность, стабильность, совместимость и эффективность, разработка всех этих вакцин становится трудной задачей.

Антигены комбинированной вакцины

Антигены дифтерии и столбняка.

Дифтерия и столбняк являются острыми инфекциями, вызванными соответственно *Corynebacterium Diphtheriae* и *Clostridium tetani*. В обоих случаях причиной клинических заболеваний является высокоактивный экзотоксин этих бактерий. Вакцины, обеспечивающие защиту от этих бактерий, содержат токсины, которые химически модифицированы, следовательно, больше не являются токсичными, но все еще остаются антигенными. Дифтерийный токсин и токсин столбняка производятся выращиванием *Corynebacterium Diphtheriae* и *Clostridium tetani*, в среде, содержащей бычий экстракт. Токсины инактивируются с помощью обработки, которая включает тепло, УФ, формалин/формальдегид, глутаральдегид, ацетилэтиленимин и др., для изготовления анатоксинов (дифтерийный анатоксин (D) и анатоксин столбняка (T)). Беспокойство по поводу губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE), трансмиссионной губчатой энцефалопатии (TSE), болезни Кройцфельда-Якоба (CJD и разновидности болезни CJD) может возникнуть из-за животных компонентов, используемых в питательной среде с содержанием бычьего экстракта, который распространяется через вакцину. (См.: Руководящие принципы ВОЗ по трансмиссивным губчатым энцефалопатиям относительно биологических и фармацевтических препаратов; 2003 & ЕМЕА/СРМР/ВВР/819/01, 24 апреля 2001 г.).

Коклюшные антигены.

Введение цельноклеточных вакцин, состоящих из химически и физически теплом инактивированных организмов *Bordetella pertussis* в 40-х годах XX века, стало причиной резкого уменьшения заболеваемости коклюшем, вызванной *B. pertussis*.

Цельноклеточные вакцины АКДС обычно ассоциируются с несколькими местными нежелательными явлениями (например, эритемой, отеком и болью в месте инъекции), лихорадкой и другими легкими системными явлениями (например, сонливостью, раздражительностью и анорексией) (См.: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclarck CR; Характер и частота возникновения нежелательных реакций, связанных с вакцинацией АКДС и АДС у младенцев и детей. Paediatrics 1981; 68: 650-60) & (См.: Long SS, DeForest A, Pennridge Pediatric Associates, et al. Динамическое исследование нежелательных реакций после введения вакцины против дифтерии-столбняка-коклюша в грудном возрасте. Paediatrics 1990; 85: 294-302). Более тяжелые системные явления (например, судороги (с лихорадкой или без) и гипотонические гипореактивные эпизоды) встречаются реже (соотношение: один случай на 1750 введенных доз) среди детей, которые получают цельноклеточные вакцины АКДС (См.: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclarck CR; Характер и частота возникновения нежелательных реакций, связан-

ных с вакцинацией АКДС и АДС у младенцев и детей. *Paediatrics* 1981; 68: 650 -60). Острая энцефалопатия встречается еще реже (соотношение 0-10,5 случаев на миллион введенных доз). Эксперты соглашались с тем, что цельноклеточная вакцина против коклюша вызывает длительное поражение мозга в некоторых редких случаях. (См.: Институт медицины; Вакцина АКДС и хроническая дисфункция нервной системы, новый анализ, Washington DC, National Academy Press, 1994).

Ряд сообщений о взаимосвязи между вакцинацией от коклюша, реактогенностью и серьезными побочными эффектами, привели к снижению принятия вакцины и, как следствие, новым вспышкам эпидемий (Miller, DL, Ross, EM, Alderslade, R., Bellman, MH и Brawson, NSB (1981). Вакцинация против коклюша и серьезные острые неврологические заболевания у детей *Brit Med. J.* 282: 1595-1599).

Нежелательные реакции, связанные с цельноклеточной вакциной против коклюша (wP), являются препятствием для дальнейшего применения вакцин во всем мире, и поэтому комбинированные вакцины на основе wP постепенно заменяются в индустриальном мире комбинированными вакцинами на основе ацеллюлярного коклюша. Совсем недавно были разработаны определенные компонентные коклюшные вакцины. Ранее сообщалось о полностью жидких шестивалентных ацеллюлярных коклюшных вакцинах (DTaP IPV PRP-T-HBsAg) (EP1028750).

Infanrix® Hexa (GSK) на сегодняшний день является единственной на рынке шестивалентной детской комбинированной вакциной, содержащей Salk IPV. Этот препарат (DTaP3 -IPV-HBV//Hib) продается в виде шприца, предварительно заполненного пятивалентным препаратом, упакованного вместе с лиофилизированным конъюгатом Hib-антигена PRP-T в отдельном флаконе, который перед использованием необходимо развести остатком вакцины.

Вторая шестивалентная вакцина, Hexuop® (также ее называют Hexacima® и Hexaxim®) - это полностью жидкая шестивалентная вакцина от Sanofi Pasteur; однако также с содержанием aP. Эта вакцина, вероятно, будет нацелена на частные рынки Европы и всего мира. Другая шестивалентная вакцина, также с содержанием aP, которая является совместной разработкой компаний Merck и Sanofi Pasteur, в настоящее время изучается в клинических исследованиях III фазы.

Bharat Biotech International разрабатывает семивалентную комбинированную вакцину, которая включает DT, ацеллюлярный коклюш, Sabin IPV (тип 1: 40 DU, тип 2: 8 DU, тип 3: 32DU), одноштаммовый инактивированный ротавирус (штамм G9, то есть штамм 116E), конъюгат PRP Haemophilus influenza тип b с TT и вакцину на основе рекомбинантного гепатита В.

Однако возникает беспокойство относительно долгосрочной эффективности вакцин ацеллюлярного коклюша (aP), особенно в развивающихся странах. Последние сообщения свидетельствуют о том, что иммунитет к коклюшу снижается в подростковом возрасте и является причиной увеличения случаев заболеваемости у младенцев до шести месяцев, прежде чем они будут полностью вакцинированы. Оценка эффективности вакцины составила 24 процента в возрасте 8-12 лет, вакцинированных в грудном возрасте против aP. В неэкспериментальном исследовании в Австралии также подтвердился более высокий показатель случаев заболеваемости среди подростков, получивших коклюшную вакцину в грудном возрасте, по сравнению с теми, кто получал цельноклеточную коклюшную вакцину (относительный риск 3,3, 95-процентный доверительный интервал 2,4-4,5).

С точки зрения затрат, aP-антигены исторически превышали расходы на антигены wP в 10-30 раз из-за производственных различий и расходов на авторское вознаграждение, а, следовательно, составляли экономическую нагрузку для развивающихся стран. В результате стоимость шестивалентных вакцин на основе wP была бы более привлекательной для использования в государственном секторе стран с низким уровнем ресурсов.

Таким образом, использование цельноклеточного коклюшного компонента (wP) в шестивалентных вакцинах, предназначенных для развивающихся стран, приобрело важное значение как в отношении стоимости, так и в отношении беспокойства по поводу долгосрочной эффективности вакцин aP, особенно в развивающихся странах.

По сравнению с лучшими цельноклеточными вакцинами против коклюша (wP), вакцины aP не столь эффективны в программах массовой иммунизации (Vickers et al.2006; Cherry2012).

В недавних исследованиях вспышек среди высокоиммунизированных групп населения было определено, что продолжительность защиты вакцин против aP слишком короткая (Klein et al. 2012; Misegades et al.2012), что приводит к снижению иммунитета у детей старшего возраста и подростков и соответствующего увеличения случаев заболеваемости в этой возрастной группе (Skowronski et al. 2002; Klein et al.2012). Напротив, вакцины wP обеспечивают лучшую защиту в подростковом возрасте (Klein et al.2012). Вследствие этих недостатков в странах, которые перешли на применение вакцины aP в 90-х годах XX века, сейчас у нас есть поколение детей не только менее защищенных от коклюша, но и тех, кто может быть менее чувствительным к ревакцинации, поскольку первоначальная вакцина может определить их иммунный ответ на дальнейшие ревакцинации (Podda et al. 1995; Mascart et al. 2007; Sheridan et al. 2012; Liko, Robison and Cieslak2013; Smits et al. 2013).

Одним из важнейших факторов, способствующих реактогенности wP, является наличие липоолигосахарида (LOS) - эндотоксина с наружной мембраны бактерий.

Инактивацию токсинов в вакцинах wP можно осуществить разными методами, но ни один активный токсин, устойчивый к теплу, не должен проявляться в конечном продукте. В процессе массового производства цельноклеточного коклюшного компонента (wP) для инактивации токсинов wP, который применяют многие производители, используется термическая обработка/формалин. В некоторых источниках сообщается об использовании тимеросала для инактивации wP. Однако использование тимеросала приводит к потере антигенности IPV (Вакцина 1994 г., том 12 № 9851 - 856. Пагубное влияние тимеросала на специфическую активность инактивированной вакцины против полиовируса), а потому в случае применения комбинированной вакцины, содержащей IPV, возможно, понадобится отдельный флакон для тимеросала, содержащего wP, чтобы сохранить его специфическую активность со временем, или изменить способ инактивации исходной массы коклюшного компонента. Некоторые антигены, то есть активные РТ, также могут служить модификаторами иммунного ответа. Наблюдались заметные различия в иммунном ответе на различные антигены в различных вакцинах (ВОЗ, 1993 г.).

Химическая экстракция LOS привела к значительному снижению содержания эндотоксина (на 20%) и впечатляющему снижению токсичности, связанной с эндотоксином (до 97%), в зависимости от используемого теста *in vitro* или *in vivo*. Экстракция LOS не влияла на целостность продукта и, что еще важнее, не влияла на специфическую активность и/или стабильность КДС. Кроме того, почти не наблюдалось различий в ответах антител и Т-клеток. (См.: Waldely Oliveira Dias et. Al; Усовершенствованная цельноклеточная вакцина против коклюша с пониженным содержанием эндотоксина; Вакцины и иммунотерапевтические средства 9: 2, 339-348; февраль 2012 г.)

Антигены гепатита В.

Существуют различные штаммы вируса гепатита. Гепатит В - это заболевание, вызванное вирусом гепатита В (НерВ), который инфицирует печень человека и вызывает воспаление, которое называется гепатитом. Вакцина против заболевания содержит один из белков вирусной оболочки, поверхностный антиген гепатита В (НВsАg). Теперь доступны вакцины, применявшиеся для массовой иммунизации, например, препараты Recombivax HB® и Comvax® от Merck, Engerix-B® и Pediarix® от Glaxo Smith-Kline Biologicals. Комбинированная вакцина, содержащая компонент против гепатита В, ассоциировалась с лучшими результатами выполнения и соблюдения по сравнению с одноразовой вакциной против гепатита. (См.: Kurosky. Et. Al; Влияние комбинированных вакцин на соблюдение схемы иммунизации вакциной против гепатита В у детей в США; The Pediatric Infectious Disease Journal. 36 (7): e189-e196, JUL 2017). В нескольких источниках сообщается об адсорбции поверхностного антигена гепатита В на фосфате алюминия в сочетании с другими антигенами. Компонент гепатита В практически не должен содержать тиомерсал (тимеросал) (способ приготовления НВsАg без тиомерсала ранее был опубликован в EP 1307473). Нехавас® - комбинированная вакцина, которая была выведена с рынка из-за низкой иммуногенности компонента гепатита В. Поэтому существует потребность в комбинированной композиции вакцины, содержащей антиген гепатита В, с надлежащей или усиленной иммуногенностью.

Антигены Haemophilus influenzae (Hib).

Haemophilus influenzae - это грамотрицательная коккобактерия, являющаяся обычной частью флоры верхних дыхательных путей. Haemophilus influenzae типа b (Hib b) является главной причиной инвазивных инфекций менингита, передающихся через кровь, у детей раннего возраста и главной причиной менингита в первые 2 года жизни. Иммунизация против Haemophilus influenzae началась в Канаде в 1987 году с применением полисахаридной вакцины [полирибозилрибитолфосфата (PRP)]. Капсула полирибозилрибитолфосфата (PRP) Hib является главным фактором вирулентности для организма. Антитело против PRP является основным фактором бактерицидной активности в сыворотке крови, а повышение уровня антител связано со снижением риска инвазивного заболевания. PRP является независимым Т-клеточным антигеном и, следовательно, характеризуется: а) индукцией плохого ответа на антитела у младенцев и детей, не достигших 18-месячного возраста, б) вариabельным и количественно меньшим ответом антител, по сравнению с антигенами, зависимыми от Т-клеток, в) выработкой большего количества иммуноглобулина М (IgM), и d) неспособностью индуцировать бустерную реакцию.

Начальные вакцины на основе только компонента PRP оказались неэффективными для младенцев. Дальнейшие усилия были направлены на разработку вакцины на основе конъюгата PRP, где PRP конъюгируется с белками, называемыми белками-носителями, такими как белок внешней мембраны Neisseria meningitidis, антитоксин дифтерии, антитоксин столбняка и CRM 197. Включение компонентов-конъюгатов Hib в комбинированные вакцины связано с пониженной иммуногенностью Hib. Кроме того, конъюгаты Hib неустойчивы в водных средах и не могут пережить длительное хранение в этой форме. Итак, полисахарид PRP Haemophilus influenzae b (Hib) часто имеет форму высушенного твердого вещества, разводится при вводе жидким составом других антигенов. Например, в Infanrix® hexa (WO 99/48525).

Антиген полиомиелита.

Доступны различные виды вакцины.

Живая (ослабленная) оральная полиомиелитная вакцина (ОПВ) была разработана доктором Альбертом Сабиним в 1961 году. ОПВ, включающую штаммы Сабин, вводят перорально.

Инактивированная (убитая) вакцина против полиомиелита (ИПВ) была разработана в 1955 году доктором Йонасом Солком. ИПВ, включающую штаммы Солк, вводят в виде инъекций.

Недавно был разработан инактивированный полиовирус Сабин для инъекций, который был приготовлен путем инактивации вируса полиомиелита штаммами Сабина, и который также доступен в коммерческих препаратах.

Живые ослабленные (ОПВ) и инактивированные (ИПВ) полиовакцины были эффективными в борьбе с заболеванием полиомиелита во всем мире. Вакцина против полиомиелита может содержать штаммы Солк или Сабин.

В 1955 году доктору Йонасу Солку удалось инактивировать вирус полиомиелита дикого типа, таким образом, включив его в состав инъекционного типа, и назвав его штаммом Солк, который включает Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3, которые использовались в вакцине против полиомиелита. Штаммы Сабин включают штаммы Сабин 1 и Сабин 2.

На данный момент приемлемая стандартная доза полиовакцины содержит 40 D антигенных единиц инактивированного полиовируса типа 1 (Mahoney), 8 D антигенных единиц инактивированного полиовируса типа 2 (MEF-I) и 32 D антигенных единиц инактивированного полиовируса типа 3 (Saukett), например Infanrix-hexa® (WO 99/48525).

В настоящее время ИПВ доступна или как безадыювантный отдельный препарат, или в различных комбинациях, включая DT-IPV (с дифтерийным и столбнячным анатоксинами) и шестивалентные ИПВ вакцины (дополнительно против коклюша, гепатита В и Haemophilus influenzae b), например Infanrix® hexa (WO 99/48525).

Однако по сравнению с ОПВ, общая себестоимость производства ИПВ значительно выше. В основном это связано с такими требованиями: (i) больше вируса на дозу; (ii) дополнительная последующая обработка (т.е. концентрация, очистка и инактивация) и соответствующее тестирование контроля качества (iii) потеря антигена или ненадлежащее дальнейшее восстановление и iv) сдерживание. До сих пор финансовый аспект был главным недостатком новаторской разработки и внедрения ИПВ в странах с низким и средним уровнем дохода.

Будущий мировой спрос на ИПВ после ликвидации полиовирусов может вырасти с нынешнего уровня 80 млн доз до 450 млн доз в год. Итак, вероятно, понадобятся подходы к "периодическим" поставкам ИПВ.

Эффективные вакцинные препараты с уменьшенной дозой, которые обеспечивают защиту от инфекции с применением меньшей дозы антигена ИПВ, являются оптимальными в ситуациях, когда поставки обычной вакцины недостаточно для удовлетворения глобальных потребностей или, когда расходы на изготовление обычной вакцины не позволяют продавать вакцину по цене, доступной для развивающихся стран. Также влияние меньшей дозы ИПВ по сравнению с существующими на рынке продуктами может быть более безопасным. Таким образом, необходимо оценить различные стратегии обеспечения ИПВ по более доступным ценам. Итак, комбинированная вакцина с уменьшенной дозой ИПВ может быть доступной по цене и удобной для введения.

В случае вакцины против пандемического гриппа использование адъювантов позволило уменьшить дозу, увеличить доступность и снизить стоимость вакцины. Поэтому было предположено, что форма вакцины ИПВ на основе адъюванта позволит снизить расходы, а также увеличить количество доступных доз ИПВ во всем мире.

Кроме того, соли алюминия считаются безопасными и недорогими, они уже используются в комбинированных вакцинах, содержащих ИПВ, их использование приносит меньше препятствий при разработке и является менее затратным при производстве. Однако неизвестно можно ли значительно уменьшить дозу при применении алюминиевых адъювантов.

Другие антигены.

Другими антигенами, которые могут быть включены в комбинированную вакцину, является Haemophilus influenzae (серотипы a, c, d, e, f и неинкапсулированные штаммы), гепатит (штаммы A, C, D, E, F и G), менингит A, B или C, грипп, пневмококки, стрептококки, сибирская язва, денге, малярия, корь, свинка, краснуха, БЦЖ, японский энцефалит, ротавирус, оспа, желтая лихорадка, тиф, вирус опоясывающего лишая, воздушной оспы и др.

Диапазон и тип антигенов, применяемых в комбинированной вакцине, зависят от возраста целевых групп популяции, например, младенцы, дети ясельного возраста, дети школьного возраста, подростки и взрослые. Известны первые комбинированные вакцины, которые могли бы предотвратить инфицирование: Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium Diphtheriae и необязательно инактивированный полиовирус (ИПВ) и/или вирус гепатита В и/или Haemophilus influenzae типа В (см., Например, WO 93/24148, WO 97/00697, WO 2000/030678, WO 2008/028956, US 6013264 и WO 2005089794).

В то же самое время для многократной инъекции вакцины необходимо использовать консервант, чтобы избежать заражения микроорганизмами. Среди комбинированных вакцинных препаратов, которые экспортируются ООН в развивающиеся страны, преобладают вакцины, содержащие консервант, учитывая среду стран, где следует использовать вакцины, методы распределения, расходы и тому подобное.

Примеры консерванта, применяемого в вакцинных продуктах, могут содержать тимеросал, 2-ПЭ, фенол, формальдегид и обычные дозы консервантов, известные в данной области техники.

Изобретатели установили, что иммуногенность, реактогенность, стабильность и поддержание правильной формы антигенов в комбинированной вакцинной композиции зависят от способа образования композиции, включающей процесс изготовления индивидуальных антигенов, последовательность добавления антигенов, использование специфических адъювантов в конкретном количестве для определенных антигенов, индивидуальная адсорбция или комбинированная адсорбция антигенов на адъювант, степень адсорбции антигена на адъювант, общее содержание алюминия, концентрация и тип используемого консерванта, использование различных параметров, в том числе смешивание, температура и уровень pH.

Краткое изложение сути изобретения

Раскрыта жидкая, стабильная комбинированная вакцинная композиция, которая демонстрирует улучшенную иммуногенность и сниженную реактогенность, и процесс ее изготовления.

Данное раскрытие касается комбинированной вакцинной композиции, включающей

a) высокоочищенный дифтерийный анатоксин (D) и анатоксин столбняка (T), полученный с использованием полусинтетической среды и впоследствии обезвреженный;

b) инактивированный цельноклеточный коклюшный компонент (wP), приготовленный с применением комбинации тепловой и химической инактивации, специфических штаммов *Bordetella pertussis* в определенном соотношении, что приводит к снижению реактогенности и повышению специфической активности;

c) капсулярный полисахаридный антиген (PRP) *Haemophilus influenzae* типа B (Hib), конъюгированный с белком-носителем (CP);

d) инактивированный полиовирус (ИПВ) со стандартной или пониженной дозой штамма Солк или штамма Сабин, полученный с помощью усовершенствованных методов инактивации формальдегида, который может быть дополнительно адсорбирован на гидроксиде алюминия;

e) оптимальный профиль адсорбции антигена(ов), такой, что поверхностный антиген гепатита B (НерВ) адсорбируется индивидуально на адъюванте фосфата алюминия, антигены D и T индивидуально адсорбируются на адъюванте фосфата алюминия, благодаря чему повышается иммуногенность;

f) минимальное содержание алюминия, обеспечивая тем самым сниженную реактогенность;

g) оптимальную концентрацию 2-феноксизанола (2-PE) в качестве консерванта.

Цели

Некоторые цели этого раскрытия, которые соответствуют по меньшей мере одному варианту изобретения приведены ниже.

Целью этого раскрытия является сглаживание одной или нескольких проблем уровня техники или хотя бы предоставление полезной альтернативы.

Другой целью этого раскрытия является создание жидкой, стабильной, менее реактогенной и более иммуногенной комбинированной вакцинной композиции/рецептуры, пригодной для профилактики и лечения более чем одного безвредного состояния, соответствующего критерию серопротекции в отношении каждого из указанных иммуногенных компонентов.

Еще одной целью этого раскрытия является представление способа изготовления такой композиции/рецептуры комбинированной вакцины.

Другие цели и преимущества этого раскрытия будут более понятны из следующего описания, которое не предназначено для ограничения сферы применения этого раскрытия.

Подробное описание

Согласно первому варианту этого раскрытия, комбинированная вакцинная композиция состоит из группы антигенов/иммуногенов, избранных, среди прочего, среди таковых: дифтерийный анатоксин (D), столбнячный анатоксин (T), цельноклеточный *B. pertussis* (wP), *Haemophilus influenzae* типа B (Hib), конъюгированный с PRP-CP, гепатит B (НерВ), инактивированный полиовирус (ИПВ) и дополнительно содержит адъювант и консерванты на основе алюминия.

Согласно второму варианту этого раскрытия, комбинированная вакцинная композиция может дополнительно содержать один или более антигенов, выбранных из группы, состоящей, в том числе, из следующих компонентов: *Haemophilus influenzae* (серотипы a, c, d, e, f и не инкапсулированных штаммов), гепатит (штаммы A, C, D, E, F и G), менингит A, B, C, Y, W-135, или X, грипп, *Staphylococcus aureus*, антиген(ы) *Salmonella typhi*, ацеллюлярный коклюшный антиген, модифицированная аденилатциклаза, антиген малярии (RTC, S), пневмококки, стрептококки, сибирская язва, денге, малярия, корь, свинка, краснуха, БЦЖ, вирус папилломы человека, японский энцефалит, денге, Зика, Эбола, чикунгунья, ротавирус, желтая оспа, флавивирусы, опоясывающий лишай, антигены вируса *Varicella*, соответственно.

Согласно третьему варианту этого раскрытия, штаммы ИПВ, используемые в составе комбинированной вакцины, содержат инактивированные штаммы Сабин, выбранные из группы типа 1, типа 2 и типа 3 или инактивированные штаммы Солк, выбранные из группы Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3.

В одном из аспектов третьего варианта полиовирус может быть культивируемый следующим образом: клеточная линия CCL81-VERO (почка обезьяны) использовалась в качестве клетки хозяина для

культивации полиовирусов, то есть штаммов сабин и солк.

После инфицирования клеток-хозяев выбранным штаммом полиовируса и инкубации в течение 72 ч среду, содержащую вирус и клеточный дебрис, объединяли и собирали в один контейнер.

Фильтрат подвергали тангенциальной поточной фильтрации с помощью кассеты 100KDa; диа-фильтровали с использованием фосфатного буфера и очищали с помощью анионообменной хроматографии.

До введения пациентам вирусы должны быть инактивированы с помощью соответствующих методов инактивации.

Однако изобретатели неожиданно обнаружили, что высокий процент потерь пост-формальдегидной инактивации D-антигена может быть обусловлен наличием фосфатного буфера, который неожиданно вызывает нежелательную агрегацию частиц полиовируса.

Итак, важный аспект этого раскрытия включает усовершенствованный процесс инактивации формалина, состоящий из следующих этапов:

a) очищенный пул вирусов подвергали буферному обмену от фосфатного буфера в трис-буфер в диапазоне (от 30 до 50 мм) с рН от 7 до 7,5;

b) к вышеуказанной смеси добавляли среду М-199, содержащую глицин (5 г/л);

c) добавляли 0,025% формальдегида и затем смешивали;

d) далее смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 5-13 дней при постоянном перемешивании массы вируса на магнитной мешалке;

e) пост-инкубационную смесь обрабатывали на промежуточной системе TFF (100 КДА, 0,1 м2) на 7-й день и при окончательной фильтрации после инактивации;

f) потом отфильтрованную часть хранили при температуре 2-8°C;

g) проводили ИФА D-Ag для определения единицы D-Ag.

Согласно четвертому варианту этого раскрытия, штаммы ИПВ, используемые в составе комбинированной вакцины, содержат уменьшенные дозы инактивированных штаммов Сабин, выбранных из группы типа 1, типа 2 и типа 3 или инактивированные штаммы Солк, выбранные из группы Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3.

Согласно пятому варианту этого раскрытия, ИПВ (штаммы Сабин и Солк) не адсорбируются на любом адьюванте (например, перед смешиванием с другими компонентами, если есть).

Согласно шестому варианту этого раскрытия, компонент(ы) ИПВ (Сабин и Солк) могут быть адсорбированы на адьюванте, выбранном из группы соли алюминия (Al^{3+}), например, гидроксид алюминия ($Al(OH)_3$) или фосфат алюминия ($AlPO_4$), квасцы, фосфат кальция, MPLA, 3D-MPL, QS21, олигодезокси-нуклеотидный адьювант, содержащий CpG, липосома или водно-масляная эмульсия или их комбинация, (например, до или после смешивания с другими компонентами, если есть). Если адсорбированы, один или несколько компонентов ИПВ могут адсорбироваться отдельно или вместе в виде смеси на гидроксиде алюминия.

Компонент(ы) ИПВ (штаммы Сабин и Солк) могут быть адсорбированы на соли алюминия с помощью такой процедуры:

берут нужный объем обработанного в автоклаве $Al(OH)_3$ для получения конечной концентрации алюминия (Al^{+++}) от 0,1 до 0,8 мг/доза в контейнере объемом 50 мл.

Добавляют массу ИПВ с доказанной единицей D-Ag и доводят объем до метки разбавителем (10x М-199 + 0,5% глицина).

Доводят рН конечного состава до метки и получают готовый состав с рН от 6 до 6,8.

В одном из аспектов шестого варианта адсорбция ИПВ, инактивированного формалином, может быть осуществлена на алюминии (Al^{3+}) с концентрацией, выбранной из 0,1 мг/доза, 0,2 мг/доза, 0,3 мг/доза, 0,4 мг/доза, 0,5 мг/доза, 0,6 мг/доза, 0,7 мг/доза и 0,8 мг/доза, преимущественно с 0,1 мг/доза до 1,25 мг/доза на серотип и при рН, из диапазона 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 и 6,8, преимущественно 6,5.

В еще одном аспекте шестого варианта процентное восстановление D-антигена после инактивации формалином в присутствии Tris может быть либо 50%, 60%, 70% или 80%, а процент адсорбции после адсорбции гидроксидом алюминия может быть от 70% до 80%, от 80% до 90% или от 90% до 99% или от 95% до 99%.

Согласно седьмому варианту этого раскрытия, дифтерийный токсин (экзотоксин) и токсин столбняка (экзотоксин) получали в соответствии с *Corynebacterium Diphtheria* и *Clostridium tetani* и впоследствии детоксифицировали с помощью соответствующего способа инактивации. Полученный таким образом дифтерийный анатоксин (D) и анатоксин столбняка (T) был дополнительно очищен с помощью гель-фильтровальной хроматографии. Полученный таким образом очищенный DT дальше использовался для создания комбинированной вакцины.

В одном из аспектов седьмого варианта дифтерийный токсин продуцируется культивацией *Corynebacterium Diphtheriae* в полусинтетической среде, состоящей из следующих ингредиентов в оптимальных концентрациях в любой из таких комбинаций.

Комбинация 1.

Казеиновый гидролизат, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, сульфат

магния, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, сернокислая медь, сульфат цинка, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлорида кальция, ортофосфат дигидрогена калия, дикалийфосфат, сульфат железа и ВДИ.

Комбинация 2.

Казеин гидролизат, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, натрия лактат, сульфат магния, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлорида кальция, ортофосфат дигидрогена калия, дикалийфосфат, сульфат железа и ВДИ.

Комбинация 3.

Казеиновый гидролизат, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, сернокислая медь, сульфат цинка, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлорида кальция, ортофосфат дигидрогена калия, дикалийфосфат и ВДИ.

Комбинация 4.

Дрожжевой экстракт, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, сульфат магния, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, сернокислая медь, сульфат цинка, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлорида кальция, ортофосфат дигидрогена калия, дикалийфосфат, сульфат железа и ВДИ.

Согласно второму аспекту седьмого варианта дифтерийный токсин продуцируется культивацией *Corynebacterium Diphtheriae* в полусинтетической среде, состоящей из следующих ингредиентов в оптимальных концентрациях в любой из таких комбинаций.

Комбинация 1.

Казеиновая среда, хлорид кальция, дикалийфосфат, декстроза безводная, натрия хлорид, сульфат магния, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, пиридоксина гидрохлорид, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина В12, раствор, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и ВДИ.

Комбинация 2.

Казеиновая среда, хлорид кальция, β-аланин, дикалийфосфат, декстроза безводная, натрия хлорид, сульфат магния, сульфат железа, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, пиридоксина гидрохлорид, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина В12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и ВДИ.

Комбинация 3.

Казеиновая среда, хлорид кальция, дикалийфосфат, декстроза безводная, натрия хлорид, сульфат цинка, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, пиридоксина гидрохлорид, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина В12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и ВДИ.

Комбинация 4.

Казеиновый гидролизат, хлорид кальция, дикалийфосфат, декстроза безводная, натрия хлорид, сульфат магния, дихлорид марганца, рибофлавин, тиамин гидрохлорид, пиридоксина гидрохлорид, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина В12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и ВДИ.

В еще одном аспекте седьмого варианта дифтерийный токсин и токсин столбняка детоксифицировали с помощью одного или комбинации следующих методов инактивации, которые включают тепло, УФ, формалин/формальдегид, ацетилетиленимин и др.

Согласно восьмому варианту этого раскрытия антиген гепатита (Нер), который используется в комбинированной вакцинальной композиции, содержит Нер-антигены, полученные с поверхности штамма гепатита В (HBsAg).

В одном из аспектов девятого варианта HBsAg может быть получен одним из следующих способов.

Очистка антигена в виде частиц из плазмы хронических носителей гепатита В, большие количества HBsAg синтезируются в печени и высвобождаются в кровь во время заражения HBV.

Экспрессия белка методами рекомбинантной ДНК.

Согласно девятому варианту этого раскрытия, дифтерийный анатоксин (D), анатоксин столбняка (T) и поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) индивидуально адсорбируются на адьюванте, выбранном из группы соли алюминия (Al^{3+}), например, гидроксид алюминия ($Al(OH)_3$) или фосфат алюминия ($AlPO_4$), алюминий, фосфат кальция, MPLA, 3D-MPL, QS21, олигодезоксинуклеотидный адьювант, содержащий CpG, липосома или водно-масляная эмульсия или их комбинация.

Однако преимущественно дифтерийный анатоксин (D), анатоксин столбняка (T) и поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) индивидуально адсорбируются фосфатом алюминия.

В одном из аспектов девятого варианта дифтерийный анатоксин (D) адсорбируется на фосфате алюминия с процентной адсорбцией по крайней мере 50%.

В другом аспекте девятого варианта анатоксин столбняка (T) адсорбируется на фосфате алюминия с процентной адсорбцией по крайней мере 40%.

В еще одном аспекте девятого варианта поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) адсорбируется

на фосфате алюминия с процентной адсорбцией по крайней мере 70%.

Согласно десятому варианту этого раскрытия, Hib-антиген, который используется в комбинированной вакцине этого раскрытия, происходит от капсульного полисахарида штамма Hib b 760705.

Согласно одному аспекту десятого варианта, PRP антигена HiP b конъюгируется с белком-носителем, выбранным из группы белка-носителя, состоящей, в том числе, из следующих компонентов: CRM197, дифтерийный анатоксин, комплекс внешней мембраны *Neisseria meningitidis*, фрагмент С анатоксина столбняка, коклюшный анатоксин, белок D *H. influenzae*, LT, *E. coli* ST и экзотоксин А с *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс внешней мембраны с (OMP), порины, белки, связывающие трансферрин, пневмолизин, поверхностный белок пневмококка А (PspA), поверхностный пневмококковый адгезин А (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis*, детоксифицированный отечный фактор (EF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин лимфы улитки (KLH), альбумин сыворотки человека, альбумин бычьей сыворотки (BSA) и сухой туберкулин, очищенный от белков среды (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие много эпитопов CD4+ Т-клеток человека от различных антигенов, производных от патогенов, таких как N 19, протеины, поглощающие железо, токсин А или В из белков *C. difficile* и *S. agalactiae*.

Тем не менее, оптимально, чтобы Hib b PRP конъюгировался с анатоксином столбняка (ТТ) с помощью химии CNBr, химии восстановительного аминирования, химии цианилирования или любой другой химии, уже раскрытой Kniskern et al., "Конъюгация: дизайн, химия и анализ" и Ellis et al. "Разработка и клиническое применение вакцин *Haemophilus b* на основе конъюгата". New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

Согласно второму аспекту десятого варианта, белок-носитель присутствует как в свободной, так и в конъюгированной форме в композиции этого раскрытия, неконъюгированная форма преимущественно составляет не более 20% от общего количества белка-носителя в композиции как в целом и, более преимущественно, по крайней мере менее 5% по массе.

Согласно третьему аспекту десятого варианта Hib-антиген не абсорбируется по существу на любом адьюванте.

Согласно четвертому аспекту десятого варианта Hib-антиген не может подвергаться намеренной или принудительной адсорбции на любом адьюванте.

Согласно одиннадцатому варианту этого раскрытия, антиген цельноклеточного коклюшного компонента (wP), используемый в составе комбинированной вакцинной композиции этого раскрытия, преимущественно изготавливают из штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229, смешанных в определенном соотношении и впоследствии инактивированных посредством использования усовершенствованных методов инактивации без применения тимеросала, что приводит к снижению реактогенности и увеличению специфической активности и может или не может быть адсорбированный на адьюванте на основе алюминия.

Согласно первому аспекту одиннадцатого варианта, антиген цельноклеточного коклюшного компонента (wP), используемый в составе комбинированной вакцинной композиции этого раскрытия преимущественно изготовлен из штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229, смешанных в соотношении 1:1:0,25:0,25.

Согласно второму аспекту одиннадцатого варианта, антиген цельноклеточного коклюшного компонента (wP), используемый в комбинированной вакцинной композиции, был инактивированный с использованием одного или нескольких следующих методов инактивации, которые включают тепло, УФ, формалин/формальдегид, ацетилетиленимин и др.

Однако преимущественно антиген цельноклеточного коклюшного компонента (wP), используемый в комбинированной вакцинной композиции, был инактивирован комбинацией термической и химической обработки. Однако преимущественно инактивированная теплом при температуре $56 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида масса wP остается некомковатой и легко гомогенизированной, тем самым приводя к снижению реактогенности и улучшению активности wP течение более длительного времени.

Согласно третьему аспекту одиннадцатого варианта, антиген цельноклеточного коклюшного компонента (wP), используемый в комбинированной вакцинной композиции, может или не может быть адсорбирован на адьюванте на основе алюминия, таком как гидроксид алюминия, фосфат алюминия или их комбинации (например, до или после смешивания с другими компонентами, если есть). При адсорбции один или несколько штаммов wP (т.е. 134, 509, 25525 и 6229) могут быть адсорбированы отдельно или вместе в виде смеси.

Согласно двенадцатому варианту этого раскрытия, количество дифтерийного анатоксина (D) составляет 1-40 Lf; анатоксина столбняка (Т) - 4-25 Lf; wP - 4-30 IOU на 0,5 мл; количество конъюгата PRP-ТТ *H. influenzae* В составляет 1-20 мкг содержания PRP на 0,5 мл; количество антигена HBsAg составляет от 1 до 20 мкг на 0,5 мл; ИПВ Сабин, включающий тип 1, тип 2 и тип 3, где тип 1 содержится в количестве 1-50 DU/0,5 мл, тип 2 в количестве 1-20 DU/0,5 мл и тип 3 в количестве 1-50 DU/0,5 мл и дополнительно содержит адьювант на основе алюминия и консерванты в готовой комбинированной вакцинной

композиции/рецептуре.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 25 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 20 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 4 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 2 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 16 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 14 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 12 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B* PRP-TT составляет около 13 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B* PRP-TT составляет около 10 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B* PRP-TT составляет около 8 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 15 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 10 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 8 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество полиовакцины инактивированной штаммом Сабин (sIPV), которая включает штаммы типа 1, типа 2 и типа 3, составляет около 40 DU, 8 DU и 32 DU соответственно на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

Согласно тринадцатому варианту раскрытия, количество дифтерийного анатоксина (D) составляет 1-40 Lf; анатоксина столбняка (T) - 4-25 Lf; wP - 4-30 IOU на 0,5 мл количество конъюгата PRP-TT *H. Influenzae B* составляет 1-20 мкг содержания PRP на 0,5 мл количество антигена HBsAg составляет от 1 до 20 мкг на 0,5 мл полиовирус, инактивированный штаммом Солк (IPV), включая штаммы Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3, при этом штамм Mahoney типа 1 содержится в количестве 1-50 DU/0,5 мл, MEF типа 2 содержится в количестве 1-20 DU/0,5 мл и Saukett типа 3 содержится в количестве 1-50 DU/0,5 мл с дополнительным содержанием адъюванта и консервантов на основе алюминия в готовой комбинированной вакцинной композиции/рецептуре.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 25 Lf у готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 20 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 4 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 2 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 16 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 14 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 12 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B* PRP-TT составляет около 13 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B PRP-TT* составляет около 10 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B PRP-TT* составляет около 8 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 15 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 10 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 8 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество полиовакцины? инактивированной штаммом Солк, которая включает штаммы Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3 составляет около 40 DU, 8 DU и 32 DU соответственно на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

Согласно четырнадцатому варианту этого раскрытия, количество дифтерийного анатоксина составляет 1-40 Lf; анатоксина столбняка - 4-25 Lf; wP - 4-30 IOU на 0,5 мл; количество конъюгата PRP-TT *H. Influenzae B* составляет 1-20 мкг содержания PRP на 0,5 мл; количество Нер-антигена составляет от 1 до 20 мкг на 0,5 мл; полиовакцина инактивированная уменьшенной дозой штамма Сабин (сИПВ), которая используется в составе комбинированной вакцины и включает тип 1, тип 2 и тип 3, где тип 1 содержится в количестве 2,5-10 DU/0,5 мл, тип 2 содержится в количестве 5-20 DU/0,5 мл, а тип 3 содержится в количестве 1-20 DU/0,5 мл с дополнительным содержанием адъюванта и консервантов на основе алюминия в готовой комбинированной вакцинной композиции/рецептуре.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 25 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 20 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 4 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 2 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 16 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 14 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 12 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B PRP-TT* составляет около 13 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B PRP-TT* составляет около 10 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae B PRP-TT* составляет около 8 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 15 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 10 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 8 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество полиовакцины, инактивированной уменьшенной дозой штамма Сабин (сИПВ), которая включает штаммы типа 1, типа 2 и типа 3, составляет около 5 DU, 16 DU и 10 DU соответственно на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

Согласно пятнадцатому варианту этого раскрытия, количество дифтерийного анатоксина составляет 1-40 Lf; анатоксина столбняка - 4-25 Lf; wP - 4-30 IOU на 0,5 мл; количество конъюгата PRP-TT *H. Influenzae B* составляет 1-20 мкг содержания PRP на 0,5 мл; количество Нер-антигена составляет от 1 до 20 мкг на 0,5 мл; полиовакцина, инактивированная уменьшенной дозой штамма Солк, включающая штаммы Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3, при этом штамм Mahoney типа 1 содержится в количестве 5-15 DU/0,5 мл, MEF типа 2 содержится в количестве 1-18 DU/0,5 мл и Saukett типа 3 содержится в количестве 5-15 DU/0,5 мл с дополнительным содержанием адъюванта и консервантов на основе алюминия в готовой комбинированной вакцинной композиции/рецептуре.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 25 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 20 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество дифтерийного анатоксина (D) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 10 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 4 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество анатоксина столбняка (T) составляет около 2 Lf в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 16 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 14 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество wP составляет около 12 IOU на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae* B PRP-TT составляет около 13 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae* B PRP-TT составляет около 10 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество конъюгата *H. Influenzae* B PRP-TT составляет около 8 мкг содержания PRP на 0,5 мл.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 15 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 10 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество антигена HBsAg составляет около 8 мкг на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

При этом оптимальное количество полиовакцины, инактивированной уменьшенной дозой штамма Солк, которая включает штаммы Mahoney типа 1, MEF типа 2 и Saukett типа 3 составляет около 10 DU, 2 DU и 10 DU соответственно на 0,5 мл в готовой комбинированной вакцинной композиции.

Согласно шестнадцатому варианту этого раскрытия, один или более антигенов готовой комбинированной вакцинной композиции не могут быть по сути адсорбированными на любом адьюванте.

Согласно семнадцатому варианту этого раскрытия, композиция содержит один или более адьювантов, выбранных из группы соли алюминия (Al^{3+}), например, гидроксид алюминия ($Al(OH)_3$) или фосфат алюминия ($AlPO_4$), алюминий, фосфат кальция, MPLA,

3D-MPL, QS21, олигодезоксинуклеотидный адьювант, содержащий CpG, липосому или водно-масляную эмульсию.

При этом оптимальная композиция содержит в качестве адьюванта фосфат алюминия ($AlPO_4$).

В одном из аспектов семнадцатого варианта антигены готовой композиции могут быть адсорбированные *in situ* на геле ортофосфата алюминия или на готовом геле ортофосфата алюминия или их комбинации.

В одном из оптимальных аспектов семнадцатого варианта композиция этого раскрытия может содержать адьювант в количестве 2,5 мг/0,5 мл или меньше, а именно, в количестве от 1,5 мг/0,5 мл до 0,1 мг/0,5 мл

При этом в другом оптимальном аспекте семнадцатого варианта содержание алюминия (Al^{+3}) в готовой комбинированной вакцинной композиции/рецептуре может быть не более 1,25 мг на 0,5 мл, преимущественно 1 мг на 0,5 мл и наиболее предпочтительно в количестве от 0,1 мг на 0,5 мл до 0,63 мг на 0,5 мл.

Согласно восемнадцатому варианту этого раскрытия, комбинированная вакцинная композиция/рецептура может содержать консервант, выбранный из группы, включающей: 2 феноксиэтанол, бензетония хлорид (фемерол), фенол, тиомерсал, формальдегид, метиловые и пропиловые парабыны или бензиловый спирт или их комбинацию.

При этом оптимальная комбинированная композиция/рецептура может содержать 2-феноксиэтанол (2-POE) в качестве консерванта.

Согласно еще одному аспекту изобретения количество 2-феноксиэтанола в комбинированной вакцине согласно изобретению не может быть больше, чем оптимально 3,5 мг/0,5 мл; более оптимально 3,0 мг/0,5 мл и наиболее оптимально 2,5 мг/0,5 мл.

Согласно девятнадцатому варианту этого раскрытия, комбинированная вакцинная композиция/рецептура этого раскрытия может содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, выбранные из группы, включающей сахара и полиолы, ПАВ, полимеры, соли, аминокислоты, мо-

дификаторы рН (регулирование рН вакцинной композиции) и др. Примеры сахаров и полиолов, которые следует использовать, могут включать сахарозу, трегалозу, лактозу, мальтозу, галактозу, манит, сорбит, глицерин и др. Примеры ПАВ могут включать неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и тому подобное. Примеры полимеров могут включать декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и тому подобное. Примеры солей могут включать NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂ и др. Примеры аминокислот могут включать аргинин, глицин. Примеры модификаторов рН могут включать гидроксид натрия, соляную кислоту и др.

Согласно двадцатому варианту этого раскрытия, указанная комбинированная вакцина может быть лиофилизированной или жидкой композицией, преимущественно жидкой.

Согласно двадцать первому варианту этого раскрытия, указанная комбинированная вакцина может быть стабильной при температуре 2-8°C в течение периода от 12 до 36 месяцев; при температуре 25°C в течение от 2 до 6 месяцев при температуре 37°C - от 1 недели до 4 недель, с конечным рН в диапазоне от 6,0 до 7,0; более оптимально в диапазоне рН от 6,2 до 6,8; и наиболее оптимально в диапазоне рН от 6,3 до 6,7.

Согласно двадцать второму варианту этого раскрытия, заявитель обнаружил, что стабильную мультивалентную вакцину с улучшенной иммуногенностью и пониженной реактогенностью можно получить, когда вакцина изготавливается способом, представленным ниже, с учетом i) процесса изготовления отдельных антигенов ii) последовательности добавления антигенов iii) использования специфических адъювантов в определенном количестве для определенных антигенов; iv) индивидуальной адсорбции или комбинированной адсорбции антигенов на адъюванте; v) степени адсорбции антигена на адъюванте; vi) использовании концентрации алюминия; vii) использовании оптимальной концентрации и типа консерванта; и viii) использования различных параметров, включая перемешивание, температуру и рН.

Биологический источник штаммов, используемых в комбинированной вакцине SIPL

Дифтерийный анатоксин.

Штамм *Corynebacterium diphtheriae* PW8 CN2000 был получен из исследовательской лаборатории "Wellcome", Лондон, Великобритания, Центральным научно-исследовательским институтом национального органа контроля (CRI) Kasauli, Himachal Pradesh, Индия в лиофилизированном виде в 1973 г. Штамм был восстановлен и дополнительно лиофилизированный как серия производственного штамма *C. diphtheriae* CN2000 A1 в CRI Kasauli.

Столбнячный анатоксин.

Штамм *Clostridium tetani* Harvard Strain No.49205 был получен Национальным органом контроля CRI из Института The Rijks Institute Voor de Volksgezondheid (Нидерланды). Kasauli, в лиофилизированной форме.

Коклюш.

Производство массы коклюшной вакцины в SIPL предусматривает использование четырех штаммов *Bordetella pertussis* viz. Штаммы 134, 509, 6229 и 25525. Производственные штаммы 134 и 509 получены из Института Rijks, Нидерланды, через Национальный орган контроля, Центральный научно-исследовательский институт, Kasauli, Himachal Pradesh, Индия. Производственные штаммы 6229 и 25525 полученные из Института Листера, Англия.

Гепатит В.

В Rhein Biotech (Германия) разработан рекомбинантный штамм *Hansenulapolyomorpha*, содержащий ген поверхностного антигена HBsAg. В Rhein Biotech также создан Главный банк клеток (MCB *Hansenulapolyomorpha* K3/8-1 штамм ADW, 12/94) и проведены все испытания по определению характеристик этого банка.

Haemophilus influenzae типа В.

Исходным организмом для генерации клеточного субстрата является *Haemophilus influenzae* типа В, штамм 760705. Сначала штамм был выделен у мальчика в возрасте 2 года 2 месяца (родился 14.08.1974 г.) в ноябре 1976 года. Было проведено три пересева штамма прежде чем его хранили при температуре -70°C в Академическом медицинском центре (АМС) университета Амстердама. Этот штамм был передан SIPL в рамках сотрудничества между SIPL и Нидерландским институтом вакцин (NVI, Нидерланды).

ИПВ.

Штамм и источник полиовируса ниже.

Полиовирус типа 1.

Штамм: Mahoney.

Источник: Dr. J.Salk (компания Pitman & Moore).

Полиовирус типа 2.

Штамм: MEF1.

Источник: Statens Serum Institute, Копенгаген.

Полиовирус типа 3.

Штамм: Saukett.

Источник: Statens Serum Institute, Копенгаген.

В этом документе спецификации слово "содержит" или вариации, такие как "состоит из" или "включает" означают, что они включают указанный элемент, целое число или шаг, или группу элемен-

тов, целых чисел или шагов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или шага, или группы элементов, целых чисел или шагов.

Использование выражения "по меньшей мере" или "по меньшей мере один" предусматривает использование одного или нескольких элементов, или ингредиентов, или количеств, поскольку использование может быть в варианте изобретения для достижения одной или нескольких желаемых целей или результатов. Хотя отдельные варианты изобретения были описаны, эти варианты были представлены лишь в качестве примера и не предназначены для ограничения сферы применения изобретений. Варианты или модификации состава этого изобретения в пределах изобретения возможные со стороны специалистов в данной области техники при рассмотрении раскрытия в данном документе. Такие вариации или модификации должным образом соответствуют сути этого изобретения.

Числовые значения, приведенные для различных физических параметров, размеров и величин, являются лишь приблизительными значениями, и предполагается, что значения, превышающие числовое значения, присвоенные физическим параметрам, размерам и величинам, подпадают в сферу применения изобретения, если в спецификации отсутствует другое утверждение.

Несмотря на то, что был сделан значительный акцент на конкретных особенностях лучшего варианта, следует понимать, что много дополнительных функций можно добавить к оптимальному варианту, а также внести изменения, не отклоняясь от принципов раскрытия. Эти и другие изменения в оптимальном варианте раскрытия очевидны для специалистов в этой области техники на основе данного раскрытия; поэтому следует четко понимать, что вышеуказанный описательный материал должен толковаться только как иллюстративное раскрытие, а не как ограничение.

Преимущества

Данное раскрытие, описанное в этом документе, имеет ряд технических достижений и преимуществ, включая, среди прочего, реализацию комбинированной вакцинной композиции, включающей D, T, wP, HBsAg, конъюгат Hib PRP-TT и ИПВ и способ ее изготовления. По сравнению с другой комбинированной вакцинной композицией, данное раскрытие обеспечивает следующие преимущества:

- 1) полностью жидкая комбинированная вакцина;
- 2) улучшенная иммуногенность;
- 3) сниженная реактогенность;
- 4) повышенная стабильность при температуре 2-8°C и при комнатной температуре, испытываемая в течение 12 месяцев;
- 5) высокоочищенные дифтерийные анатоксины (D) и анатоксины столбняка (T), полученные с использованием полусинтетической среды без содержания трансмиссионной губчатой энцефалопатии (TSE) или губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE);
- 6) антиген цельноклеточного *B. pertussis* (wP) включает штаммы *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25, тем самым улучшая специфическую активность и иммуногенность против *B. Pertussis*;
- 7) усовершенствованный метод инактивации цельноклеточного компонента *B. pertussis* (wP) с использованием комбинированной инактивации теплом и формальдегидом. В процессе не используют тиомерсал, а инактивированный цельноклеточный коклюшный антиген остается некомокватым и гомогенным, что приводит к снижению реактогенности и улучшению специфической активности в течение более длительного времени;
- 8) низкое содержание свободного PRP (менее 7%) в общей массе конъюгата PRP-TT *Haemophilus influenzae* типа b;
- 9) улучшенный профиль адсорбции антигена дифтерийного анатоксина (D), антигена анатоксина столбняка (T) и поверхностного антигена гепатита В (HepB), адсорбированного отдельно на адьюванте на основе фосфата алюминия, улучшая тем самым специфическую активность и иммуногенность;
- 10) минимальное содержание алюминия (Al^{3+}), что обеспечивает пониженную реактогенность;
- 11) оптимальная концентрация 2-феноксэтанола (2-PE) в качестве консерванта.

Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации оптимальных вариантов изобретения. Специалистам в этой области техники следует признать, что композиции и методы, раскрытые в приведенных ниже примерах, представляют собой методы, открытые изобретателем, которые будут функционировать должным образом в практике изобретения, и, таким образом, можно считать, что представляют собой оптимальные способы практического применения. Однако, специалисты в данной области техники должны, несмотря на это раскрытие, учесть возможность внесения многих изменений в конкретные варианты, которые раскрываются и все еще получают подобные или аналогичные результаты, не отступая от сути и сферы применения изобретения.

Пример 1.

Табл. 1. В этой таблице приведено краткое описание процентной адсорбции отдельных антигенов, профиля специфической активности и стабильности отдельных антигенов в комбинированной вакцине SIPL при температуре 2-8°C в течение 12 месяцев.

Таблица 1

Испытания	Граничные условия / Спецификация	0 дней	6 месяцев	12 месяцев
Гепатит В Специфическая активность In-Vivo RP (95% CL)	NLT 1,0	Соответствует	Н/П	Соответствует
Содержание Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Общий PRP)	Фактическое значение.	8,1 мкг/0,5 мл	8,46 мкг/0,5 мл	10,03
Специфическая активность дифтерийного компонента (МЕ/доза)	NLT 30 МЕ/доза.	98,5120 МЕ/доза (69,9650-137,247)	Н/П	95,8463 МЕ/доза
Специфическая активность столбнячного компонента (МЕ/доза)	NLT 40 МЕ/доза	139,030 МЕ/доза (88,2850-208,688)	Н/П	382,079 МЕ/доза
Специфическая активность коклюшного компонента (МЕ/доза)	NLT 4 МЕ/доза	4,6749 МЕ/доза (2,6492-8,2763)	4,8410 МЕ/доза (2,7331-8,6081)	5,131
Адсорбция гепатита В (%)	Фактическое значение.	89,44	82,65	75,52
Адсорбция: Столбнячный компонент (%)	Фактическое значение.	59,0	41,0	Н/П
Адсорбция: Дифтерийный компонент (%)	Фактическое значение.	79,0	72,0	Н/П
D-антиген (DU/0,5 мл)	Тип 1 = 40 DU/0,5 мл, Тип 2 = 8 DU/0,5 мл и Тип 3 = 32 DU/0,5 мл (= 75% от номинального значения приемлемо)	Соответствует	Соответствует	Соответствует

Н/П - не применимо

Табл. 2. Краткое описание процентной адсорбции отдельных антигенов, профиля специфической активности и стабильности отдельных антигенов в комбинированной вакцине при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 12 месяцев.

Таблица 2

Испытания Граничные условия	Граничные условия /Спецификация	0 дней	6 месяцев	12 месяцев
Гепатит В Специфическая активность In-Vivo PRP (95% CL)	NLT 1,0	Соответствует	Н/П	Соответствует
Содержание Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Общий PRP)	Фактическое значение	8,6 мкг/0,5 мл	8,20 мкг/0,5 мл	Н/П
Специфическая активность дифтерийного компонента (МЕ/доза)	NLT 30 МЕ/доза.	98,5120 МЕ/доза (69,9650- 137,247)	Н/П	96,5482 МЕ/доза (65,9292- 137,687)
Специфическая активность столбнячного компонента (МЕ/доза)	NLT 40 МЕ/доза	139,030 МЕ/доза (88,2850- 208,688)	Н/П	Н/П
Специфическая активность коклюшного компонента (МЕ/доза)	NLT 4 МЕ/доза	4,6749 МЕ/доза (2,6492- 8,2763)	4,5170 МЕ/доза (2,4894- 8,2672)	3,4899 МЕ/доза (1,8699 * - 6,4750)
Адсорбция гепатита В (%)	Фактическое значение.	89,44	83,92	83,00
Адсорбция: Столбнячный компонент (%)	Фактическое значение.	59,0	31,0	40,0
Адсорбция: Дифтерийный компонент (%)	Фактическое значение.	79,0	72,0	69,0
D-антиген (DU/0,5 мл)	Тип 1 = 40 DU/0,5 мл, тип 2 = 8 DU/0,5 мл и тип 3 = 32 DU/0,5 мл (= 75% от номинального значения приемлемо)	Соответствует	Соответствует	Соответствует

Н/П - не применимо

Пример 2.

Этот пример дает краткое описание различных комбинированных вакцинных композиций.

Таблица 3

Комбинированная вакцинная композиция 1

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	10-25 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	02-10 Lf
3	Антиген инактивированного B. pertussis (wP)	12-16 IOU
4	HBs-антиген	7-15 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-TT	7-13 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	2-феноксиэтанол	2,5 мг
9	Хлорид натрия	4,5 мг

Таблица 4

Комбинированная вакцинная композиция 2

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	10-25 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	02-10 Lf
3	Антиген инактивированного <i>B. pertussis</i> (wP)	12-16 IOU
4	HBs-антиген	7-15 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-ТТ	7-13 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	Хлорид натрия	4,5 мг

Таблица 5

Комбинированная вакцинная композиция 3

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	10 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	02 Lf
3	Антиген инактивированного <i>B. pertussis</i> (wP)	12 IOU
4	HBs-антиген	8 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-ТТ	8 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	2-феноксиэтанол	2,5 мг
9	Хлорид натрия	4,5 мг

Таблица 6

Комбинированная вакцинная композиция 4

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	10 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	02 Lf
3	Антиген инактивированного <i>B. pertussis</i> (wP)	12 IOU
4	HBs-антиген	8 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-ТТ	8 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	Хлорид натрия	4,5 мг

Таблица 7

Комбинированная вакцинная композиция 5

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	20 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	04 Lf
3	Антиген инактивированного <i>B. pertussis</i> (wP)	14 IOU
4	HBs-антиген	15 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-ТТ	10 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	2-феноксиэтанол	2,5 мг
9	Хлорид натрия	4,5 мг

Таблица 8

Комбинированная вакцинная композиция 6

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	20 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	04 Lf
3	Антиген инактивированного <i>B. pertussis</i> (wP)	14 IOU
4	HBs-антиген	15 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-ТТ	10 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	Хлорид натрия	4,5 мг

Таблица 9

Комбинированная вакцинная композиция 7

п/н	КОМПОНЕНТЫ СОСТАВА	Антиген единица/0,5 мл дозы
1	Дифтерийный анатоксин (D)	25 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	10 Lf
3	Антиген инактивированного <i>B. pertussis</i> (wP)	16 IOU
4	HBs-антиген	15 мкг
5	Hib-антиген на основе конъюгата PRP-ТТ	13 мкг PRP
6	ИПВ типа I (единицы D-антигена)	40
	Типа II (единицы D-антигена)	8
	Типа III (единицы D-антигена)	32
7	Адсорбируется на фосфате алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,6 мг
8	Хлорид натрия	4,5 мг

Вакцина может содержать незначительное количество глутаральдегида, формальдегида, неомицина, стрептомицина и полимиксина В, используемых в процессе изготовления.

Пример 3.

Процесс производства конъюгированной массы *Haemophilus influenzae* типа b.

Развернутый обзор этапов процесса производства конъюгированной массы *Haemophilus influenzae* типа b представлен путем краткого описания 53 шагов, представленного ниже.

Шаг 1. Колба для культивирования инокулята на этапе I (S1).

Флакон с рабочим посевным материалом используется для посева инокулята в колбе для культивирования, которая содержит 0,22 мкм отфильтрованной посевной среды. Используется одноразовая колба ПЭТГ вместительностью 125 мл с рабочим объемом 25 мл. Этот этап выполняется в шейкере-инкубаторе с контролируемым перемешиванием (200±50 об/мин) при температуре (36±2°C). После достижения соответствующего роста бактерий (OD₅₉₀≥1,0) культуру переносят на следующий этап инокуляции (этап S2), описанный в шаге 2. Выполняют окраску по методу Грама в качестве внутрипроизводственного контроля для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы).

Шаг 2. Колба для культивирования инокулята на этапе II (S2).

Этап инокуляции S2 предусматривает использование колб Фернбаха на 2 л (S2A и S2B) с рабочим объемом 800 мл. Колба S2A используется для измерения OD₅₉₀, пока OD₅₉₀ не достигнет критериев приемлемости, а колбу S2B используют для инокуляции на этапе S3. В обе колбы загружают стерилизованную путем фильтрации среду, идентичную используемой на этапе инокуляции S1. Колбу для этапа S1 используют для инокуляции обеих колб для этапа II. Этот этап выполняется в шейкере-инкубаторе с контролируемым перемешиванием (200±50 об/мин) при температуре (36±2°C). После достижения соответствующего роста бактерий (OD₅₉₀ ≥ 1,0) культуру переносят на следующий этап инокуляции (этап S3), описанный в шаге 3. Выполняют окраску по методу Грама в качестве внутрипроизводственного контроля для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы).

Шаг 3. Ферментер для инокулята этапа III.

На этапе инокуляции S3 используют ферментер на 120 л с рабочим объемом 35 л. В ферментер загружают среду, идентичную используемой на предыдущих этапах инокуляции. Используют колбу для этапа S2 для посева инокулята в ферментере. Культивирование осуществляют при температуре (36 ± 2°C), DO (10% от заданной точки), перемешивании (300-600 об/мин), аэрации (1-5 LPM) и обратном давлении (0,2 бар) в ферментере инокулята. После достижения соответствующего роста бактерий (OD₅₉₀ ≥ 1,0) культуру переносят на следующий производственный этап (этап S4), описанный в шаге 4. Выполняют окраску по методу Грама в качестве внутрипроизводственного контроля для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы).

Шаг 4. Ферментативное расщепление в производственном масштабе 1200 л.

Производственный ферментер на 1200 л имеет рабочий объем 800 л, в который загружены компоненты основной среды и стерилизованный паром *in situ*. Впоследствии добавляют различные добавки для носителя после прохождения фильтра с размером пор 0,22 мкм. Ферментер инокулируют культурой

на этапе S3, полученной во время выполнения шага 3. Ферментацию проводят при контролируемом растворенном кислороде (20% - заданное значение), температуре ($36 \pm 2^\circ\text{C}$), pH (7,1-7,4), перемешивании (40-400 об/мин), аэрации (50-300 LPM) и давлении (0,2 бар). Во время ферментации добавляют два дискретные биогенные вещества. Рост контролируется с помощью измерения OD_{590} ($OD_{590} \geq 3,5$), а ферментация считается завершенной после достижения устойчивого уровня. Во время роста и фазы устойчивого уровня полисахаридный продукт секретируется и накапливается в бульонной культуре. Выполняют окраску по методу Грама в качестве внутрипроизводственного контроля для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы).

Шаг 5. Обработка формалином.

Снижения бионагрузки на этом этапе достигают с помощью химического агента (формалина). Добавляют 0,1% формалина и инкубируют ферментированный бульон в течение НМН 2 ч при температуре 37°C . После обработки формалином сосуд быстро охлаждают до $<15^\circ\text{C}$. Было валидировано, что добавление формалина позволяет достичь уменьшения биологической нагрузки. Это подтверждается с помощью культуральных планшетов после периода инкубации. Бульон с уменьшенной бионагрузкой готов к сбору, как описано в шаге 6.

Шаг 6. Сбор при постоянном центрифугировании.

Непрерывное центрифугирование применяют как основной этап сбора. Этот этап выполняется для отделения полисахарида, содержащего сырой бульон, от инактивированной биомассы. Непрерывную центрифугу используют с целью извлечения $>90\%$ биомассы на основе измерений в соответствии с показателями уменьшения OD_{590} . Центрифуга работает примерно при 15000 г и при скорости потока жидкости 200-500 л/ч. Центрифугированный супернатант дополнительно обрабатывают, как описано в шаге 7.

Шаг 7. Глубинная фильтрация 50LP.

Центрифугированный супернатант пропускают через фильтр глубиной 50LP для удаления грубого материала, такого как клеточный дебрис. Во время выполнения этого шага продукт пропускают через фильтр в соответствии с применением дополнительного глубинного фильтра, как описано в шаге 8.

Шаг 8. Глубинная фильтрация 90LP.

Фильтрат, полученный из глубинного фильтра 50LP дальше пропускают через глубинный фильтр 90LP (номинальный показатель 0,22 мкм) для последующего удаления любого нерастворимого материала, который, возможно, не был отфильтрован предыдущим глубинным фильтром. Этот шаг гарантирует, что фильтрат, по сути, не содержит клеточного дебриса и его можно пропустить через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Следующий шаг фильтрации описан в шаге 9.

Шаги 9 и 10. Фильтрация при размере пор фильтра 0,22 мкм.

Фильтрат после прохождения глубинного фильтра 90LP дальше пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм, фильтрат собирают в накопительный резервуар.

Шаги 11 и 12. Концентрация и диафильтрация 100 кД.

Этот шаг проводится для удаления компонентов среды и примесей с небольшой молекулярной массой. Кроме того, проводится концентрация для уменьшения рабочего объема. Выбирают пороговое значение молекулярной массы 100 кД, поскольку молекулярная масса полисахарида Hib (PRP) составляет ≥ 500 кД. Бульон концентрируют примерно в 10 раз и впоследствии диафильтруют для получения объемов НМН 5, используя 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,2). Полученный в концентрате продукт называется "сырым PRP" и далее обрабатывается, как описано в шаге 13. Концентрированный бульон переносят в зону DSP через порт для переноса через 0,22 мкм фильтр для гарантии, что ни одна бактерия не попадет в зону DSP.

Шаг 13. Осаждение ЦТАБ.

ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромида) - это катионное моющее средство, которое используется для осаждения полисахарида. ЦТАБ состоит из гидрофильной области, а также гидрофобной части и осаждает белок, нуклеиновую кислоту и полисахарид. Неочищенный PRP, полученный на шаге 12, осаждают при концентрации 1% ЦТАБ и инкубируют в течение >2 ч. Сбор гранул ЦТАБ описано в шаге 14.

Шаги 14, 15 и 16. Центрифугирование, сбор и хранение гранул ЦТАБ.

В SEZ-3, FF, гранулы ЦТАБ центрифугируют с использованием центрифуги непрерывного действия при 15000 об/мин. Гранулы ЦТАБ собирают, взвешивают, аликвотируют и хранят при $\leq -20^\circ\text{C}$ для дальнейшей обработки. Это первый внутрипроизводственный шаг линии.

Шаги 17 и 18. Размораживание и растворение пасты ЦТАБ.

Замороженную пасту ЦТАБ размораживают до комнатной температуры. Размороженные гранулы растворяют в 5,85% растворе NaCl. Растворение осуществляют в смесителе, а полисахаридный продукт растворяют в водной фазе. В резервуаре содержится определенное количество нерастворимого материала, поступающего с осажденных белков и нуклеиновых кислот. Эту суспензию дополнительно обрабатывают, как описано в шаге 19.

Шаг 19. Центрифугирование.

Материал, полученный на шаге 18 центрифугируют при температуре $2-8^\circ\text{C}$, 5000-6500 об/мин в течение 20-30 мин для удаления нерастворенного материала. Центрифугированный супернатант собирают

и дальше обрабатывают, как описано в шаге 20.

Шаг 20. Осаждение этанолом 72%.

72%-ный этанол используют для осаждения PRP. 96%-ный этанол используют для получения готовой концентрации 72%-ного этанола с учетом супернатанта, полученного при выполнении шага 19. Осаждение осуществляют при температуре 2-8°C в течение ночи. Полученный осадок собирают, как описано в шаге 21.

Шаги 21 и 22. Центрифугирование и растворение гранул.

Осадок 72%-ного этанола собирают центрифугированием при температуре 2-8°C, 5000-6500 об/мин в течение 20-30 мин. Полученные гранулы растворяют в ВДИ до получения видимой прозрачности. Дальнейшая обработка солюбилизованных гранул описана в шаге 23.

Шаг 23. Осаждение DOC и 32-процентного этанола.

К материалу, полученному на шаге 22 добавляют 6%-ный ацетат натрия и 1-процентный дезокси-холат натрия (DOC). 96-процентный этанол используют для получения готовой концентрации 32-процентного этанола. DOC и 32-процентный спирт приводят к осаждению белковых примесей, позволяя полисахариду находиться в жидкой фазе. Этот осадок выдерживают при температуре 2-8°C в течение ночи (НМН 8 ч).

Шаг 24. Центрифугирование.

Материал, полученный на шаге 23 центрифугируют при температуре 2-8°C, 5000-6500 об/мин в течение 20-30 мин для удаления осадка. Центрифугированный супернатант собирают и дальше обрабатывают как описано в шаге 25.

Шаг 25. Глубинная и углеродная фильтрация.

Супернатантный раствор, полученный при выполнении шага 24 содержит растворимый PRP и подвергается глубинной фильтрации с последующей углеродной фильтрацией для удаления нуклеиновых кислот и красителя. Удаление нуклеиновых кислот контролируется путем периодического измерения поглощения при 260 нм (A260). После достижения требуемого значения A260 раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм и этот отфильтрованный раствор дополнительно обрабатывают, как описано в шаге 26.

Шаг 26. Осаждение 64%-ным этанолом.

Отфильтрованный материал, полученный при выполнении шага 25 дополнительно осаждают 96-процентным этанолом при готовой концентрации этанола 64%. Осаждение осуществляют при температуре 2-8°C в течение ночи. Полученный осадок собирают путем центрифугирования и дальше обрабатывают как описано в шаге 27.

Шаг 27. Сбор и растворение гранул.

Супернатант декантируют и отбрасывают для сбора гранул. Гранулы растворяют в ВДИ при комнатной температуре.

Шаг 28. Концентрация и диафильтрация 300 кД.

Раствор растворенных гранул концентрируют с помощью мембраны NMWCO 300 кД. Затем дополнительно диафильтруют не менее (НМН) 8 раз с помощью ВДИ. Полученный концентрат обрабатывают далее, как описано в шаге 29.

Шаги 29 и 30. 0,22 мкм фильтрация и хранение очищенного PRP.

Концентрат UF 300 кД пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм в качестве шага очистки для минимизации биологической нагрузки. Полученный очищенный PRP аликвотируют и хранят при температуре $\leq -20^\circ\text{C}$ до дальнейшего использования, как описано в шаге 31. Образец очищенного PRP отправляют на анализ контроля качества.

Шаг 31. Размораживание и объединение.

Исходя из объема серии конъюгата, размораживают соответствующее количество нативного полисахарида, полученного при выполнении шага 30. Объединенный материал анализируют на содержание PRP, которое необходимо для дальнейшей обработки, как описано в шаге 32.

Шаг 32. Концентрация 100 кД.

Для дальнейшей обработки минимальная концентрация объединенного очищенного полисахарида должна составлять 8-12 мг/мл. Если концентрация полисахарида в пуле ниже требуемой, объединенный раствор полисахарида концентрируют с помощью мембраны 100 кД UF NMWCO.

Пробу отбирают после концентрации, чтобы обеспечить достижение минимальной концентрации для следующих шагов (шаг 33).

Шаг 33. Щелочная деполимеризация.

Концентрированный полисахарид (эквивалентный 74 г/110 г), полученный при выполнении шага 32, деполимеризируют в легких щелочных растворах, используя карбонат-бикарбонатный буфер. После достижения необходимого объема полисахарида деполимеризованный полисахарид активируют, как описано в шаге 34.

Шаг 34. Активация полисахарида.

Деполимеризованный полисахарид, полученный при выполнении шага 33, активируют с помощью бромида цианогена. Активация проводится в азотной среде. Цианоген бромид является высокотоксич-

ным химическим веществом, поэтому следует соблюдать необходимые меры по технике безопасности при обращении с этим химикатом.

Шаг 35. Добавление линкера.

Свежеприготовленный раствор дигидрида адипиновой кислоты (ADH) добавляют в течение 6-10 мин к реакционной смеси, полученной при выполнении шага 34. Реакцию проводят в течение НМН 16 часов при температуре 2-10°C. Роль линкера ADH заключается в обеспечении в полисахариде аминокрупп, необходимых для реакции конъюгации.

Шаг 36. Концентрация и диафильтрация.

Реакционную смесь, полученную при выполнении шага 35, концентрируют и диафильтруют по объему с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), используя мембрану 10 кД UF-NMWSO для удаления свободной ADH. Удаление ADH контролируют с помощью ВЭЖХ и продолжают диафильтрацию пока уровень свободной ADH не будет ниже 5%. Полученный концентрат дополнительно диафильтруют буфером NLT 5X MES-NaCl. Далее концентрируют для получения концентрации НМН 20 мг/мл. Этот концентрированный обработанный PRP выдерживают при температуре 2-8°C до дальнейшего использования, как описано в шаге 37.

Шаги 37 и 38. Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранение обработанного PRP.

Концентрат, полученный при выполнении шага 36, пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм, который служит этапом очистки. Это также обеспечивает контроль уровня биологической нагрузки во время процесса, который выполняется в зоне класса С. Отфильтрованный активированный полисахарид собирают, отбирают пробу, аликвотируют и хранят при температуре 2-8°C до дальнейшей обработки. С обработанного полисахаридного пула берут образец для анализа, который включает молекулярный размер PRP (кД), содержание PRP и степень активации PRP. Дальнейшая обработка PRP описана в шаге 40.

Шаг 39. Концентрация и диафильтрация 10 кД.

Реакция конъюгации требует двух компонентов, в частности, обработанного полисахарида и белка-носителя (ТТ). Белок-носитель концентрируют и диафильтруют буфером MES-NaCl с использованием мембраны 10 кД UF NMWSO. Затем этот диафильтрованный белок-носитель дальше концентрируют в НМН 20 мг/мл, используя ту же мембрану.

Шаг 40. Конъюгация.

Реакция конъюгации требует двух компонентов, в частности, обработанного полисахарида и белка-носителя (ТТ). Активированный полисахаридный компонент получают при выполнении шага 38. Белок-носитель получают при выполнении шага 39. Два компонента смешивают в соответствующих количествах в соотношении PRP: ТТ = 1:1 (мас./мас.) в присутствии EDC при перемешивании. Реакцию конъюгации контролируют с помощью ВЭЖХ и продолжают пока конверсия белка не будет представлять $\geq 85\%$ (на основе конверсии свободного белка в конъюгат).

Шаг 41. Тушение.

После достижения критериев приемлемости реакции конъюгации относительно конверсии (шаг 40), реакцию прекращают тушением. Реакцию конъюгации тушат с помощью фосфатного буфера ЭДТА. Реакция конъюгации впоследствии обрабатывается, как описано в шаге 42.

Шаг 42. Фильтрация через фильтр 30 SP с размером пор 0,22 мкм.

Конъюгат, полученный при выполнении шага 41, фильтруют через фильтр 30 SP с последующей фильтрацией 0,22 мкм. Это обеспечивает удаление любых крупных частиц. Отфильтрованный конъюгат обрабатывают, как описано в шаге 43.

Шаг 43. Ультрафильтрация и диафильтрация 300 кД.

Смесь, полученную после реакции конъюгации при выполнении шага 42, диафильтруют 0,05%-ным физиологическим раствором с использованием мембраны 300 кД UF NMWSO. Диафильтрация проводится для удаления конъюгационных реагентов и ТТ, не вступивших в реакцию. Полученный концентрат дополнительно обрабатывают, как описано в шаге 44.

Шаги 44 и 45. Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранение предыдущего PRP.

Концентрат, полученный при выполнении шага 43, пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм, который служит этапом очистки. Это также обеспечивает контроль уровня биологической нагрузки во время процесса, который выполняется в зоне класса С. Отфильтрованный предыдущий конъюгат собирают, отбирают пробу и хранят при температуре 2-8°C до дальнейшей обработки. Дальнейшая обработка предыдущего конъюгата описана в шаге 46.

Шаг 46. Разведение предварительного конъюгата.

Предыдущий конъюгат, полученный при выполнении шага 45, разводят ВДИ до целевой концентрации 4 ± 1 мг/мл, если нужно, и дополнительно обрабатывают до шагов осаждения, как описано в шаге 47.

Шаг 47. Осаждение сульфата аммония.

Разведенную смесь реакции конъюгации дополнительно обрабатывают для удаления свободного PRP с использованием сульфата аммония (маточный раствор 50 мас.%/об.). Шаг осаждения выполняют при температуре менее 15°C и перемешивании. При выполнении шага осаждения конъюгат осаждается и в супернатанте остается свободный PRP. После добавления сульфата аммония полученную суспензию

хранят при температуре менее 15°C без перемешивания в течение НМН 12 ч.

Шаг 48. Сбор и растворение гранул.

Суспензию, полученную при выполнении шага 47, центрифугируют при ~7000 г при температуре 2-8°C в течение 40±10 мин. Супернатант отбрасывается декантацией, а полученная гранула растворяется в трис-физиологическом растворе.

Шаг 49. Диафильтрация 300 кД.

Раствор, полученный при выполнении шага 48, фильтруют через глубинный фильтр 30 SP и диафильтруют 20 мМ трис-физиологическим раствором с использованием мембраны NMWCO 300 кД.

Шаг 50. Очистка с помощью гель-фильтрационной хроматографии.

Раствор, полученный при выполнении шага 49, загружают на колонку гель-фильтрационного хроматографа примерно 70 L, содержащую гидроксिलированный метакриловой гель с гранулами полимера Toyorearl HW-65F для выполнения эксклюзионной хроматографии по размеру. Использование гель-фильтрационной хроматографии: для обработанного конъюгата (после обработки сульфатом аммония) снижает уровень свободного PRP в полученном материале. Колонку элюируют с использованием раствора 20 мМ Tris 0,9% NaCl, и собирают фракции на основе A₂₈₀. Соответствующие фракции, на основе критериев приемлемости относительно свободного PRP, соотношения и молекулярного размера, объединяют. Затем пул дополнительно обрабатывают, как описано в шаге 51.

Шаг 51. Диафильтрация 300 кД.

Объединенный элюат конъюгата, полученный при выполнении шага 50, диафильтруют раствором 20 мМ Tris с использованием мембраны 300 кД UF NMWCO. Необходимый объем концентрата должен быть таким, чтобы содержание PRP в нем составляло примерно 1 мг/мл.

Шаги 52 и 53. Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Массу конъюгата, полученную при выполнении шага 51, фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм в среде класса А для обеспечения стерильности. Фильтр с размером пор 0,22 мкм испытывают на целостность. Образец отфильтрованной массы конъюгата отправляют для полного анализа контроля качества. Отфильтрованный конъюгат маркируют как "Стерильная масса конъюгата Hib" и хранят при температуре 2-8°C. Масса конъюгата должна храниться при температуре 2-8°C в течение максимум 3 месяцев, после чего, если он не используется, его можно хранить при температуре -70°C в течение до 1 года.

Качественные характеристики полученного антигена конъюгата Hib PRP-ТТ:

содержание PRP (мкг/0,5 мл): 8,1;

соотношение (PRP: ТТ): 0,5;

свободный PRP (%): 4,8%;

PMW (kD): 983;

сер. МВ (kD): 752.

Пример 4.

Метод инактивации цельноклеточного коклюшного (wP) антигена.

Оптимизация метода инактивации выполняется после проведения различных экспериментов, включающих инактивацию при температуре 56°C в течение 10 мин в присутствии формальдегида, 56°C в течение 15 мин в присутствии формальдегида, 56°C в течение 10 мин в присутствии гимины, 56°C в течение 15 мин в присутствии гимины и только при нагревании до 56°C в течение 30 мин. Значительной разницы в специфической активности при использовании этих методов не наблюдалось. Из этих методов выбирают 56°C в течение 10 мин в присутствии формальдегида, поскольку масса клеток коклюша, полученная с помощью этого метода, является более однородной по сравнению с другими способами, указанными выше.

Процесс производства инактивированного wP-антигена включает следующие этапы:

а) инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 134;

б) инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 509;

в) инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 25525 и 6229;

г) впоследствии смешивают инактивированные штаммы *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25;

е) необязательно адсорбируют на адъюванте на основе алюминия.

В процессе не используют тимеросал, а инактивированный цельноклеточный коклюшный антиген остается некомковатым и гомогенным, что приводит к снижению реактогенности и улучшению специфической активности в течение более длительного времени.

Пример 5. Процесс производства инактивированного полиовируса (ИПВ).

Полиовирус можно культивировать с помощью следующих методов.

Клеточная линия CCL81-VERO (почка обезьяны) использовалась в качестве клетки хозяина для культивации полиовирусов, то есть штаммов сабин и солк.

После инфицирования клеток-хозяев выбранным штаммом полиовируса и инкубации в течение 72 ч

среду, содержащую вирус и клеточный дебрис объединяли и собирали в один контейнер.

Фильтрат подвергали тангенциальной поточной фильтрации с помощью кассеты 100KDa; диалитировали с использованием фосфатного буфера и очищали с помощью анионообменной хроматографии.

До введения пациентам вирусы должны быть инактивированы с помощью соответствующих методов инаktivации.

Этапы инаktivации формалином:

- a) очищенный пул вирусов подвергали буферному обмену от фосфатного буфера до трис-буфера в диапазоне (от 30 до 50 мм) с рН от 7 до 7,5;
- b) к вышеуказанной смеси добавляли среду М-199, содержащую глицин (5 г/л);
- c) добавляли 0,025% формальдегида и затем смешивали;
- d) далее смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 5-13 дней при постоянном перемешивании массы вируса на магнитной мешалке;
- e) пост-инкубационную смесь обрабатывали на промежуточной системе TFF (100 КДА, 0,1 м2) на 7-й день и подвергали окончательной фильтрации после инаktivации;
- f) потом отфильтрованную часть хранили при температуре 2-8°C;
- g) проводили ИФА D-Ag для определения единицы D-Ag.

Пример 6.

В этом примере кратко изложен процесс производства комбинированной вакцинной композиции, включающей D, Т, wP, HBsAg, Hib PRP-ТТ конъюгат и ИПВ.

1. Процедура формирования компонента I:

- a) перенос фосфата алюминия в контейнер/сосуд;
- b) добавление дифтерийного анатоксина;
- c) регулирование рН до 4,5-5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- d) выжидание для стабилизации;
- e) регулирование рН до 5,5-6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия;
- f) выжидание для стабилизации.

2. Процедура формирования компонента II:

- a) перенос фосфата алюминия в контейнер/сосуд;
- b) добавление столбнячного анатоксина;
- c) регулирование рН до 4,5-5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- d) выжидание для стабилизации;
- e) регулирование рН до 5,5-6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия;
- f) выжидание для стабилизации.

3. Процедура формирования компонента III:

- a) перенос фосфата алюминия в контейнер/сосуд;
- b) добавление поверхностного антигена гепатита В;
- c) регулирование рН до 4,5-5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- d) выжидание для стабилизации;
- e) регулирование рН до 5,5-6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия;
- f) выжидание для стабилизации.

4. Смешивание компонента I в компоненте II и перемешивание при RT.

5. К вышеуказанной смеси добавляли инаktivированный wP антиген с последующим перемешиванием при RT.

6. Компонент III добавляли к смеси, полученной при выполнении шага 5 при RT.

7. Конъюгат Hib PRP добавляли к смеси, полученной при выполнении шага 6, при температуре 6-16°C.

8. Антиген ИПВ добавляли к смеси, полученной при выполнении шага 6, при температуре 6-16°C.

9. 2-феноксиэтанол добавляли к смеси, полученной при выполнении шага 7 при температуре 6-16°C.

10. Проверяют рН, если нужно, доводят рН 6,0 до 7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия.

11. К смеси, полученной при выполнении шага 10, добавляли NaCl с последующим перемешиванием в течение 3 ч.

Пример 7.

Исследование токсичности шестивалентной вакцины.

Последующие исследования токсичности проводили с применением вакцины DTwP-HepB-IPV-Hib согласно плану исследования в соответствии с таблицей "Y" и рекомендаций ВОЗ по доклинической оценке вакцин и в соответствии с принципами ОЭСР по надлежащей лабораторной практике.

1. Исследование токсичности разовой дозы, которую вводили подкожно крысам линии Спрэг-Дуули.

Всего 20 самцов и 20 самок крыс в возрасте 5-6 недель были случайным образом разделены на че-

тыре группы. Каждая группа состояла из 5 самцов и 5 самок. Готовые плацебо, адъювант, однодозовую вакцину DTwP-НерВ-IPV-Hib и многодозовую вакцину вводили подкожно. Крыс наблюдали в течение 14 дней после введения препарата.

2. Исследование токсичности нескольких доз, которые вводили внутримышечно крысам линии Спрэг-Доули.

В среднем 100 самцов и 100 самок крыс были случайным образом разделены в основную группу и группу восстановления. Готовые к использованию контроль плацебо, контроль адъюванта, однодозовую вакцину DTwP-НерВ-IPV-Hib и многодозовую вакцину вводили медленно глубокой внутримышечной инъекцией в дни 1, 29, 57 и 85. Животным в группах восстановления ничего не вводили и наблюдали за ними в течение 28 дней.

3. Исследование токсичности разовой дозы, которую вводили подкожно новозеландским белым кроликам.

Всего 16 самцов и 16 самок кроликов были случайным образом разделены на четыре группы. Готовые к использованию плацебо, адъювант, одноразовую вакцину DTwP-НерВ-IPV-Hib и многодозовую вакцину вводили подкожно каждому животному соответствующей группы. Кроликам вводили разовую подкожную дозу и наблюдали в течение 15 дней.

4. Исследования токсичности повторных доз, которые вводили внутримышечно новозеландским белым кроликам.

Всего 40 самцов и 40 самок кроликов были случайным образом разделены на основную группу и группу восстановления. Готовые к использованию контроль плацебо, контроль адъюванта, и различные дозы однократной и многодозовой вакцины DTwP-НерВ-IPV-Hib вводили медленно посредством глубокой внутримышечной инъекцией в дни 1, 29, 57 и 85. Животным в группах восстановления ничего не вводили и наблюдали за ними в течение 28 дней.

На основании результатов был сделан вывод, что однократная и многодозовая шестивалентная вакцина (дифтерия, столбняк, коклюш (цельноклеточный), гепатит В, полиомиелит (инактивированный) и конъюгат *Haemophilus influenzae* типа b (адсорбированный)) не приводила к любым системным нежелательным явлениям у крыс линии Спрэг-Доули и новозеландских белых кроликов, когда им вводили разовую дозу для человека (0,5 мл) подкожно или внутримышечно в предусмотренных условиях испытания. Воспалительные реакции в месте инъекции и результаты иммунологического ответа, наблюдавшиеся в группах, получавших вакцину, обычно являются ожидаемыми и наблюдаются в исследованиях токсичности при введении адъювантных вакцин на основе алюминия. Таким образом, исследуемый препарат "Вакцина DTwP-НерВ-IPV- Hib" в самой большой дозе 0,5 мл/животное (1 человеческая доза) считается таковым, который "Не вызывает наблюдаемых нежелательных явлений" (NOAEL), в условиях испытаний и при применяемых дозах.

Пример 8.

Табл. 10. В этой таблице приведено сравнение процентной адсорбции отдельных антигенов, специфической активности, содержания свободного PRP комбинированной вакцины SIPL и Easy Six (Panacea).

Таблица 10

	Комбинированная вакцина SIPL	Комбинированная вакцина Panacea Easy-Six™
Адсорбция «D». (%)	79,0	38,0
Адсорбция «Т». (%)	59,0	30
Адсорбция HBsAg (%)	95,44	Более 95,0
Специфическая активность «D» (МЕ/доза)	98,5120	Более 40
Специфическая активность «Т» (МЕ/доза)	139,030	Более 50
Специфическая активность «HBsAg» In-Vitro (мкг/мл)	35,490 (34,210-36,818)	23,167
Специфическая активность «HBsAg» In-Vivo (R/P)	1,07 (0,74-1,57)	0,71 (0,42-1,13)
Специфическая активность «NewP» (МЕ/доза)	4,6749 (2,6492-8,2763)	3,2221 (1,8032-5,7706)
НIB (общий PRP) мкг/0,5 мл	8,1	13,20
НIB (свободный PRP) (%)	4,8	18,45
Свободный формальдегид (% Масс./Об.)	0,0013	0,0011
Содержание 2-феноксиэтанола (мг/0,5 мл)	2,71	3,3
Общее содержание алюминия (Мг/0,5 мл)	0,2863	0,6034
D-антиген «ИПВ» (DU/0,5 мл)	Тип-I = 39,046 Тип-II = 7,280 Тип III = 33,058	Тип-I = 43,504 Тип-II = 8,056 Тип III = 39,840

D = антиген дифтерийного анатоксина;

T = антиген анатоксина столбняка;

wP = антиген цельноклеточного коклюша;

HBsAg = поверхностный антиген гепатита B;

ИПВ = антиген инактивированного полиовируса;

адсорбция (%) = процентная адсорбция антигена на соли алюминия (Al³⁺)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав полностью жидкой комбинированной вакцины, представляющий собой иммуногенную композицию, где 0,5 мл композиции включает

- (i) дифтерийный анатоксин (D) 20 Lf, адсорбированный на соли алюминия с адсорбцией не менее 50%;
 - (ii) анатоксин столбняка (T) 4 Lf, адсорбированный на соли алюминия с адсорбцией не менее 40%;
 - (iii) инактивированный цельноклеточный антиген коклюша (wP), содержащий инактивированные штаммы Bordetella pertussis 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25, 14 IOU;
 - (iv) поверхностный антиген вируса гепатита B (HBsAg), 15 мкг, адсорбированный на соли алюминия с адсорбцией не менее 70%;
 - (v) капсулярный сахарид Haemophilus influenzae типа b (Hib), конъюгированный с анатоксином столбняка в качестве белка-носителя, с использованием CNBr в качестве цианилирующего агента, 10 мкг;
 - (vi) инактивированный антиген вируса полиомиелита (IPV), содержащий IPV-антиген типа 1 в диапазоне 1-40 DU, антиген типа 2 в диапазоне 2-8 DU и антиген типа 3 в диапазоне 3-32 DU соответственно;
 - (vii) общее содержание алюминия (Al³⁺) в качестве адъюванта - фосфата алюминия в диапазоне от 0,1 до 0,3 мг;
 - (viii) 2-феноксиэтанол в качестве консерванта в диапазоне от 1 до 3 мг и
 - (ix) NaCl в качестве среды для разведения или буферного раствора в диапазоне от 0,5 до 1,5%;
- при этом состав характеризуется улучшенной иммуногенностью, уменьшенной реактогенностью и улучшенной стабильностью при температуре 2-8°C и при комнатной температуре.

2. Состав по п.1, где антигены IPV представляют собой штаммы Salk, отобранные из типа 1 Mahoney, MEF типа 2, Saukett типа 3, или штаммы Sabin, отобранные из группы типа 1, типа 2 или типа 3.

3. Состав по п.1, где композиция содержит D-антиген в количестве 20 Lf на 0,5 мл; T-антиген в количестве 4 Lf на 0,5 мл; wP-антиген в количестве 14 IOU на 0,5 мл; HBsAg в количестве 15 мкг на 0,5 мл; Hib-антиген в количестве 10 мкг на 0,5 мл; IPV-антиген Salk типа 1 в количестве 40 DU, Salk типа 2 в количестве 8 DU и Salk типа 3 в количестве 32 DU соответственно на 0,5 мл; общее содержание алюминия (Al³⁺) в виде фосфата алюминия 0,3 мг на 0,5 мл; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг на 0,5 мл; хлорид натрия в количестве 0,9%.

4. Способ изготовления состава полностью жидкой комбинированной вакцины по п.1, включающий

следующие этапы:

- А) подготовка компонента I, которая включает следующие стадии:
- перенос фосфата алюминия в контейнер/сосуд;
 - добавление анатоксина дифтерии в контейнер/сосуд стадии (а);
 - регулировка рН смеси, полученной на стадии (b), до 4,5-5,5 уксусной кислотой/гидроксидом натрия;
 - выдерживание смеси, полученной на стадии (с), при 33-37°C в течение по меньшей мере 48 ч;
 - изменение температуры до 2-8°C и выдерживание в течение 7 дней;
 - регулировка рН смеси, полученной на стадии (е), до 5,5-6,5 гидроксидом натрия/карбонатом натрия/фосфатом натрия; и
 - хранение компонента I, полученного на стадии (f), при 2-8°C до последующего использования;
- В) подготовка компонента II, которая включает в себя следующие стадии:
- перенос фосфата алюминия в контейнер/сосуд;
 - добавление анатоксина столбняка в контейнер/сосуд стадии (а);
 - регулировка рН смеси, полученной на стадии (b), до 4,5-5,5 уксусной кислотой/гидроксидом натрия;
 - выдерживание смеси, полученной на стадии (с), при 33-37°C в течение по меньшей мере 48 ч;
 - изменение температуры до 2-8°C и выдерживание в течение 7 дней;
 - регулировка рН смеси, полученной на стадии (е), до 5,5-6,5 гидроксидом натрия/карбонатом натрия/фосфатом натрия; и
 - хранение компонента II, полученного на стадии (f), при 2-8°C до последующего использования;
- С) подготовка компонента III, которая включает в себя следующие стадии:
- перенос фосфата алюминия в контейнер/сосуд;
 - добавление поверхностного антигена гепатита В в контейнер/сосуд стадии (а);
 - регулировка рН смеси, полученной на стадии (b), до 4,5-5,5 уксусной кислотой/гидроксидом натрия;
 - выдерживание смеси, полученной на стадии (с), при 22-25°C в течение по меньшей мере 20-28 ч;
 - регулировка рН смеси, полученной на стадии (d), до 5,8-6,8 гидроксидом натрия/карбонатом натрия/фосфатом натрия; и
 - хранение компонента III, полученного на стадии (е), при 2-8°C до последующего использования;
- Д) подготовка инактивированного цельноклеточного коклюшного антигена, которая включает следующие стадии:
- инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 134;
 - инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 509;
 - инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 25525;
 - инактивация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 6229;
 - последующее смешивание инактивированных штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229, полученных на стадиях (а), (b), (с) и (d), соответственно в соотношении 1:1:0,25:0,25, и
 - адсорбция на адьювант на основе алюминия, при этом в процессе не используют тимеросал, а инактивированный цельноклеточный коклюшный антиген остается не комковатым и гомогенным, что приводит к снижению реактогенности и специфической активности до свыше 4,5 IU на дозу в течение более длительного времени;
- Е) подготовка Hib-антигена, которая включает в себя следующие стадии:
- ферментация *Haemophilus influenzae* типа b;
 - инактивация *Haemophilus influenzae* типа b, полученного на стадии (а), при температуре 37°C в течение 2 ч в присутствии 0,1% формальдегида;
 - очистка полисахарида полирибозилрибитол фосфата (PRP) Hib, полученного на стадии (b);
 - конъюгация очищенного продукта со стадии (с) и анатоксина столбняка (ТТ) с использованием реакции конъюгатного цианилирования цианогенбромидом в присутствии линкера дигидразида адипиновой кислоты (ADH);
 - очистка конъюгата со стадии (d);
 - фильтрация очищенного конъюгата со стадии (е) через фильтр с размером пор 0,22 мкм, где процентное содержание свободного PRP составляет не более 5% в общем количестве очищенного объемного конъюгата Hib;
- Ф) добавление 80% от общего количества обычного физиологического раствора (NaCl) в сосуд/контейнер для смешивания;
- добавление компонента - I, содержащего анатоксин дифтерии, в сосуд/контейнер для смешивания;
 - добавление компонента - II, содержащего анатоксин столбняка, к компоненту - I со стадии (а) с

перемешиванием при комнатной температуре;

с) добавление инактивированного цельноклеточного антигена коклюша к смеси, полученной на стадии (b), с перемешиванием при комнатной температуре;

d) добавление компонента - III, содержащего поверхностный антиген гепатита В, к смеси, полученной на стадии (c), с перемешиванием при комнатной температуре;

e) добавление Нib-антигена к смеси, полученной на стадии (d), при 6-16°C;

f) добавление IPV-антигена к смеси, полученной на стадии (e), при 6-16°C;

g) добавление 2-феноксизанола к смеси, полученной на стадии (f), при 6-16°C;

h) регулировка pH смеси, полученной на стадии (g), до 6,0-7,0 гидроксидом натрия/карбонатом натрия; и

i) добавление оставшихся 20% от общего количества обычного физиологического раствора (NaCl), чтобы довести объем до нужного объема при перемешивании.

