

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037283**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.04

(21) Номер заявки
201890502

(22) Дата подачи заявки
2016.09.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/115 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ МНОГОКРАТНОГО ДОЗИРОВАНИЯ

(31) 10-2015-0131157

(32) 2015.09.16

(33) KR

(43) 2018.08.31

(86) PCT/KR2016/010313

(87) WO 2017/048038 2017.03.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭлДжи КЕМ, ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Чхой Сок Ён, Но Ён Э, Ким Ын Джи
(KR)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)

(56) US-A-6013264

SORIA, A. et al., 'Anti-infective vaccines (skin and mucocutaneous complications)', Therapeutics in Dermatology, 2013, inner pages 1-2, Retrieved from the Internet: <<http://www.therapeutique-dermatologique.org/spip.php?article61659&lang=en#paragraphe-4>> See summary; page 1.

US-A1-20100222333

US-A1-20140112950

KR-B1-1019920009729

(57) Настоящее изобретение относится к многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины, где (1) поливалентная комбинированная вакцина содержит цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную противополиомиелитную вакцину Сэбина (sIPV); и (2) композиция содержит 2-феноксизтанол (2-PE) и формальдегид (НСНО) в качестве консервантов; и к способу получения многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины. Было подтверждено, что комбинация 2-феноксизтанолa и формальдегида по настоящему изобретению является превосходным консервантом, способным поддерживать антимикробную активность, и что ее можно эффективно использовать для получения многодозовой композиции, сохраняющей антимикробную активность комбинированной вакцины так, что композицию по настоящему изобретению можно эффективно использовать в производстве многодозовой комбинированной вакцины.

B1

037283

037283

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины, где поливалентная комбинированная вакцина содержит цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV); и композиция содержит 2-феноксиэтанол (2-PE) и формальдегид (НСНО) в качестве консервантов; и к способу получения многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины.

Предшествующий уровень техники

Комбинированные вакцины представляют собой вакцины, содержащие два или более антигенов, и используются для предупреждения по меньшей мере одного инфекционного заболевания или для предупреждения инфекционных заболеваний, вызванных разными изоформами или серотипами одного и того же микроорганизма. Комбинированные вакцины, позволяющие одновременное введение дифтерийных, столбнячных и других антигенов, использовались с середины 20 века.

Хотя количество и полный диапазон антигенов, содержащихся в вакцинах, варьируется в соответствии с предполагаемой для применения возрастной группой (то есть младенцев, детей младшего возраста, детей, подростков и взрослых), в последнее время комбинированные вакцины на основе DTwP (адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина) и DTaP (коклюшно-дифтерийно-столбнячный анатоксин) широко используются во всем мире. В частности, вакцины на основе DTwP экспортируют в менее развитые страны через международные организации, такие как ООН.

Для получения вакцины против дифтерии (D) дифтерийный токсин детоксифицируют формалином с получением дифтерийного анатоксина, который используют в качестве вакцины. Симптомы дифтерии, инфекции верхних дыхательных путей, могут включать развитие без особой причины неотделяемой пленки в области миндалин, глотки и носа, что тем самым вызывает боль в горле и небольшое повышение температуры. Иногда дифтерия также может вызывать инфекции кожи, конъюнктивы и репродуктивных органов.

Для получения вакцины против столбняка (T) столбнячный токсин детоксифицируют формалином с получением столбнячного анатоксина, который используют в качестве вакцины. Возбудителем столбняка является *Clostridium tetani*, спорообразующие анаэробные грамположительные бактерии *Bacillus*. Столбняк представляет собой неврологическое расстройство, при котором *Clostridium tetani* выделяет экзотоксин, тем самым вызывая сильные мышечные спазмы. Патоген проникает через раны в кожу или слизистые оболочки, тем самым вызывая столбняк, и симптомы возникают медленно и постепенно переходят в более тяжелые мышечные сокращения.

Для получения цельноклеточной вакцины против коклюша (wP) возбудитель коклюша детоксифицируют с помощью термообработки/формалина и т.д. и полученный возбудитель коклюша используют в качестве вакцины, которая называется цельноклеточной вакциной против коклюша. Бесклеточная вакцина против коклюша (aP) представляет собой вакцину, полученную с использованием только белков коклюша в качестве антигенов. Возбудитель коклюша представляет собой *Bordetella pertussis*, грамположительную плеоморфную *Bacillus*, которую сложно культивировать. Коклюш может встречаться во всех возрастных группах, но чаще у детей в возрасте 5 лет или менее, и госпитализированными пациентами чаще всего являются новорожденные младенцы в возрасте менее одного месяца, а относительная доля госпитализированных пациентов уменьшается по мере увеличения возраста. Клинические симптомы коклюша могут продолжаться в течение 6-10 недель, когда нет осложнений. Примеры осложнений могут включать судороги, пневмонию, энцефалопатию и т.д. и могут привести к смерти.

Вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) представляет собой вакцину, имеющую структуру вирусоподобной частицы (VLP), полученной посредством генетических манипуляций с поверхностными антигенами вируса гепатита В (HBsAg). Гепатит В представляет собой заболевание, вызванное атакой вируса гепатита В на клетки печени, что приводит к потере функций печени, циррозу печени или раку печени.

Вакцина против *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), представляет собой конъюгированную вакцину, полученную путем конъюгирования белка-носителя с полирибозилрибитолфосфатом (PRP), который представляет собой полисахарид на поверхностной оболочке *Haemophilus influenzae* типа b. Примерно 95% инвазивных заболеваний, таких как менингит и сепсис, вызваны *Haemophilus influenzae* типа b, и, таким образом, *Haemophilus influenzae* является основным возбудителем бактериального менингита у младенцев, и в частности уровень инфекции является наиболее высоким у маленьких детей в возрасте от 6 месяцев до 5 лет.

Инактивированная полиовирусная вакцина Сэбина для инъекции представлена в двух разных типах: инактивированная полиовирусная вакцина на основе штамма Сэбина (ослабленный тип) (sIPV) и инактивированная полиовирусная вакцина на основе штамма Солка (дикого типа) (wIPV). Ослабленная пероральная полиомиелитная вакцина была разработана в 1961 году доктором Альбертом Сэбином и живые ослабленные виды, разработанные доктором Сэбином, называются штаммами полиовируса Сэбина. Недавно инактивированный полиовирус Сэбина, который был получен путем инактивации штаммов полиовируса Сэбина формалином, был разработан в форме для инъекций и также доступен в коммерче-

ских продуктах. Вакцина sIPV включает 3 разных типа штаммов; тип 1, тип 2 и тип 3. В 1955 доктору Джонасу Солку удалось инактивировать полиовирус дикого типа, что позволило использовать его в композиции инъекционного типа, называемый штаммом Солка, который включает тип 1 Mahoney, тип 2 MEF и тип 3 Saukett. До сих пор широко использовалась вакцина wIPV. Однако согласно политике ВОЗ по ликвидации полиовируса дикого типа sIPV изучали и разработали в виде коммерческих продуктов.

При этом в многодозовых вакцинных инъекциях необходимо использовать консервант, чтобы избежать загрязнения микроорганизмами. Для комбинированных вакцинных продуктов, экспортируемых ООН и т.д. в менее развитые страны, предпочтительными являются многодозовые вакцины, содержащие консервант, с учетом климата стран, в которых должны использоваться вакцины, способов распределения, расходов и т.д. Примеры консервантов для использования в вакцинных продуктах могут содержать тимеросал, 2-РЕ, фенол и т.д., и обычные дозы консервантов известны в данной области. Например, тимеросал используют в концентрации 100 мкг/мл и 2-РЕ используют в концентрации 5 мг/мл, а многодозовые вакцинные продукты, содержащие эти консерванты, могут быть приготовлены в виде коммерческих продуктов только после прохождения тестов на противомикробную активность, описанных в части В Европейской Фармакопеи (EP-B) или в Фармакопее США (USP).

Тимеросал (тимеросал, тиомерсал или мертиолат) представляет собой производное диэтилртути, которое использовали в качестве консерванта для многодозовых вакцинных инъекций с начала 1930-х годов. Тимеросал использовали для предотвращения роста загрязняющих микроорганизмов и поддержания стерильных условий во время хранения или использования вакцинных продуктов и многих пентавалентных комбинированных вакцин (включающих D, T, P, Hib и HBsAg), которые получили предварительное одобрение ВОЗ (PQ), содержат тимеросал в качестве консерванта.

2-РЕ в основном используется в качестве консерванта для косметических средств и кожных фармацевтических продуктов, а также в качестве консерванта для вакцинных инъекций.

В инактивированной полиовакцине (ниже IPV) обычно используют 2-РЕ в качестве консерванта. Согласно предыдущей информации, когда инактивированная полиовакцина содержит тимеросал, эффективность этой вакцины имеет тенденцию уменьшаться на 50% или более в течение недели, даже при хранении в холодильнике, и поэтому все IPV вакцинные продукты не содержат тимеросал в качестве консерванта, а вместо него используется 2-РЕ в концентрации 5 мг/мл (Vaccine 1994 Volume 12 No. 9 851-856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine).

По этим причинам сообщалось, что в шестивалентных комбинированных вакцинах (включающих D, T, wP, Hib, HBsAg и IPV), которые все еще находятся на стадии разработки и не используются в коммерческих продуктах, также используют 2-РЕ в концентрации 5 мг/мл (US 2011-0195087, WO 2004-110480 и WO 2012-093406).

Таким образом, авторы настоящего изобретения предприняли усилия по проведению тестов противомикробной способности консерванта 2-РЕ, который обычно используют в вакцинах IPV в данной области в концентрации 5 мг/мл, при разработке шестивалентных комбинированных вакцин (включающих вакцины D, T, P, Hib, HBsAg и IPV). Однако неожиданно они не смогли получить удовлетворительных результатов, соответствующих критериям, описанным в части В Европейской Фармакопеи. При этом опрощенное вынужденное увеличение количества 2-РЕ (консерванта) для удовлетворения требуемым критериям может вызвать проблемы безопасности у маленьких детей, которые являются субъектами получения комбинированных вакцин, а также могут влиять на производство и стабильность конечных продуктов и поэтому к принятию такого решения следует подходить тщательно.

Описание изобретения

Техническая проблема

Авторы настоящего изобретения обнаружили комбинацию для каждой дозы 2-РЕ и формальдегида в качестве консервантов для шестивалентных комбинированных вакцин, включающих вакцины D, T, P и IPV, которые удовлетворяют критериям противомикробной способности, при минимизации их содержания, и тем самым осуществили настоящее изобретение.

Техническое решение

Целью настоящего изобретения является предложение многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины, где (1) поливалентная комбинированная вакцина содержит вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV); и (2) композиция содержит 2-феноксиэтанол (2-РЕ) и формальдегид (НСНО) в качестве консервантов.

Другой целью настоящего изобретения является предложение способа получения многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцинации.

Положительные эффекты изобретения

Было подтверждено, что комбинированное применение 2-РЕ и формальдегида в соответствии с настоящим изобретением может служить прекрасным консервантом, способным сохранять противомикробную активность комбинированной вакцины и может также эффективно использоваться для получения многодозовой композиции, способной сохранять противомикробную активность поливалентной

комбинированной вакцины. Соответственно, 2-РЕ и формальдегид можно эффективно использовать в области многодозовых комбинированных вакцинных препаратов.

Лучший вариант осуществления изобретения

Для достижения вышеуказанных целей в одном аспекте настоящего изобретения предлагается многодозовая иммуногенная композиция для поливалентной комбинированной вакцины, где (1) поливалентная комбинированная вакцина содержит вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV); и (2) композиция содержит 2-феноксиэтанол (2-РЕ) и формальдегид (НСНО) в качестве консервантов.

В типичном воплощении в настоящем изобретении предлагается многодозовая иммуногенная композиция, которая дополнительно содержит в качестве поливалентной комбинированной вакцины вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib).

В другом типичном воплощении композиция содержит 2-РЕ в количестве от 7 до 9,5 мг/мл.

В еще одном типичном воплощении композиция содержит формальдегид в количестве от 120 до 180 мкг/мл.

В еще одном типичном воплощении композиция содержит 2-РЕ в количестве от 7 до 9,5 мг/мл и формальдегид в количестве от 120 до 180 мкг/мл.

В еще одном типичном воплощении композиция содержит фармацевтически приемлемый адъювант, где адъювант представляет собой фосфат алюминия, гидроксид алюминия или их комбинацию.

В еще одном типичном воплощении композиция содержит адъювант в количестве 1,25 мг/мл или менее.

В еще одном типичном воплощении композиция содержит фармацевтически приемлемый транспортёр, эксципиент, связывающее вещество, носитель, консервант, буферный агент, изотонический агент, эмульгатор или увлажнитель.

В еще одном типичном воплощении композиция имеет рН от 5,5 до 8.

В еще одном типичном воплощении поливалентная комбинированная вакцина содержит вакцину против дифтерии (D) в количестве от 10 ФЕ(флоккулирующих единиц)/мл до 50 ФЕ/мл; вакцину против столбняка (T) в количестве от 5 до 30 ФЕ/мл; цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) в количестве от 20 ЕМ (единиц мутности)/мл до 50 ЕМ/мл; вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) в количестве от 5 до 30 мкг/мл; конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), в количестве от 5 до 20 мкг/мл; и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), которая включает тип 1, тип 2 и тип 3, где тип 1 содержится в количестве от 5 до 100 ДЕ (D-антигенных единиц)/мл, тип 2 содержится в количестве от 10 до 100 ДЕ/мл и тип 3 содержится в количестве от 20 до 120 ДЕ/мл.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины, включающий (а) смешивание вакцины против дифтерии (D), вакцины против столбняка (T) и цельноклеточной вакцины против коклюша (wP) или бесклеточной вакцины против коклюша (aP) с фосфатом алюминия, гидроксидом алюминия или их комбинацией; (б) добавление вакцины против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированной вакцины *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированной полиовакцины Сэбина (sIPV) к смеси со стадии (а) и перемешивание; и (в) добавление 2-РЕ и формальдегида к смеси со стадии (б), смешивание и доведение конечного рН смеси до 5,5-8.

Ниже настоящее изобретение пояснено более подробно.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается многодозовая иммуногенная композиция для поливалентной комбинированной вакцины, где:

(1) поливалентная комбинированная вакцина содержит вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV);

(2) композиция содержит 2-феноксиэтанол (2-РЕ) и формальдегид (НСНО) в качестве консервантов.

В частности, поливалентная комбинированная вакцина может дополнительно содержать вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib).

При использовании здесь термин "многодозовая" относится к иммуногенной композиции, содержащей вакцину в количестве, превышающем единичную дозу введения, которую можно вводить одному субъекту или субъектам в количестве более одного на разных стадиях введения в зависимости от времени.

При использовании здесь термин "поливалентная комбинированная вакцина" относится к комбинации двух или более вакцин, которая может вызывать иммуногенность против антигенов и может включать две или более вакцин, которые вызывают иммуногенность по отношению к другим областям в том же антигене, или может включать вакцину(ы) к двум или более антигенам. Для целей настоящего изобретения поливалентная комбинированная вакцина по настоящему изобретению может содержать вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша

(wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), и в частности шестивалентную комбинированную вакцину, дополнительно содержащую вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), но не ограничивается ими.

Поливалентная комбинированная вакцина может быть использована в жидкой форме, но не ограничена ею.

В настоящем изобретении токсин дифтерии детоксифицируют формалином с получением дифтерийного анатоксина, который используют в качестве вакцины. Симптомы дифтерии, инфекции верхних дыхательных путей, могут включать развитие без особой причины неотделяемой пленки в области миндалин, глотки и носа, что тем самым вызывает боль в горле и небольшое повышение температуры. Иногда дифтерия также может вызывать инфекции кожи, конъюнктивы и репродуктивных органов.

В настоящем изобретении столбнячный токсин детоксифицируют формалином с получением столбнячного анатоксина, который используют в качестве вакцины. Возбудитель столбняка представляет собой *Clostridium tetani*, спорообразующую анаэробную грамположительную *Bacillus*. Столбняк представляет собой неврологическое расстройство, при котором *Clostridium tetani* выделяет экзотоксин, тем самым вызывая сильные мышечные спазмы. Патоген проникает через раны в кожу или слизистые оболочки, тем самым вызывая столбняк, и симптомы возникают медленно и постепенно переходят в более тяжелые мышечные сокращения.

В настоящем изобретении цельноклеточная вакцина против коклюша и (wP) представляет собой вакцину, в которой возбудитель коклюша детоксифицируют термообработкой/формалином и т.д., и затем полученный возбудитель коклюша используют в качестве вакцины. В то же время бесклеточная вакцина против коклюша (aP) представляет собой вакцину, полученную с использованием только белков коклюша в качестве антигенов. Возбудитель коклюша представляет собой *Bordetella pertussis*, грамположительную плеоморфную *Bacillus*, которую трудно культивировать.

В настоящем изобретении инактивированная полиовирусная вакцина Сэбина имеет два разных типа: инактивированная полиовирусная вакцина на основе штамма Сэбина (ослабленный тип) (sIPV) и инактивированная полиовирусная вакцина на основе штамма Солка (дикого типа) (wIPV). Ослабленная пероральная полиовакцина для перорального введения была разработана ранее и живые ослабленные виды, разработанные доктором Сэбином, называются штаммами полиовируса Сэбина. Недавно инактивированный полиовирус Сэбина, который был получен путем инактивации штаммов полиовируса Сэбина формалином, был разработан в форме для инъекций и также начата его разработка в составе коммерческих продуктов. Вакцина sIPV включает 3 разных типа штаммов; тип 1, тип 2 и тип 3. До сих пор вакцина wIPV широко используется. Однако согласно политике ВОЗ по ликвидации полиовируса дикого типа, sIPV изучали и разработали в виде коммерческих продуктов.

В настоящем изобретении вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) представляет собой вакцину, имеющую структуру вирусоподобной частицы (VLP), полученную посредством генетических манипуляций с поверхностными антигенами вируса гепатита В (HBsAg). Гепатит В представляет собой заболевание, вызванное атакой вируса гепатита В на клетки печени, что приводит к потере функций печени, циррозу печени или раку печени.

В настоящем изобретении вакцина против *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), представляет собой конъюгированную вакцину, полученную посредством конъюгирования белка-носителя с полирибозилрибитолфосфатом (PRP), который представляет собой полисахарид на поверхностной оболочке *Haemophilus influenzae* тип b. Примерно 95% инвазивных заболеваний, таких как менингит и сепсис, вызваны *Haemophilus influenzae*, тип b, и, таким образом, *Haemophilus influenzae* представляет собой основной возбудитель бактериального менингита у младенцев.

При этом в настоящем изобретении в многодозовой вакцинной инъекции необходимо использовать консервант, чтобы избежать загрязнения микроорганизмами во время процесса многократного введения и при хранении. Для комбинированных вакцинных продуктов, экспортируемых в менее развитые страны при помощи ООН и т.д., предпочтительными являются многодозовые вакцины, содержащие консервант, с учетом климата стран, в которых используют эти вакцины, способов распределения, расходов и т.д.

Примеры консерванта для использования в вакцинных продуктах могут содержать тимеросал, 2-РЕ, фенол и т.д., и обычные дозы консервантов известны в данной области.

Композиция по настоящему изобретению может содержать 2-РЕ и формальдегид в качестве консервантов. В частности, композиция по настоящему изобретению может содержать 2-РЕ в количестве от 7 до 9,5 мг/мл или может содержать формальдегид в количестве от 120 до 180 мкг/мл, и в частности может содержать 2-РЕ в количестве от 7 до 9,5 мг/мл и формальдегид в количестве от 120 до 180 мкг/мл.

В типичном воплощении получали композиции, содержащие шестивалентную комбинированную вакцину, которая содержит вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP), вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae* тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), и фосфат алюминия; и 2-РЕ и формальдегид в качестве консервантов в соответствии с концентрациями и измеряли противомикробную активность этих композиций. В результате, когда композиции содержали

2-РЕ в количестве 7,2 или 8,5 мг/мл и формальдегид в количестве 135 или 150 мкг/мл, было подтверждено, что они обладают противомикробной активностью, удовлетворяющей требованию части В Европейской Фармакопеи (ЕР-В).

Исходя из вышеизложенного было подтверждено, что, когда шестивалентная комбинированная вакцина содержала только 2-РЕ в концентрации, описанной выше, или содержала только формальдегид, шестивалентная комбинированная вакцина по настоящему изобретению не могла иметь противомикробную активность, удовлетворяющую требованиям части В Европейской Фармакопеи, тогда как комбинированное использование 2-РЕ и формальдегида обладает синергическим эффектом в отношении противомикробной активности, и, когда 2-РЕ и формальдегид используют в вышеуказанных концентрациях, шестивалентная комбинированная вакцина по настоящему изобретению может иметь противомикробную активность, удовлетворяющую требованиям части В Европейской Фармакопеи.

Между тем композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант, который может представлять собой фосфат алюминия, гидроксид алюминия или их комбинацию. В частности, композиция по настоящему изобретению может содержать адъювант в количестве 1,25 мг/мл или менее, и более конкретно в количестве от 0,5 до 1,25 мг/мл.

При использовании здесь термин "адъювант" относится к веществу, которое улучшает иммуногенность иммуногенной композиции по настоящему изобретению. Соответственно адъюванты часто присутствуют с целью усиления иммунных реакций и хорошо известны специалисту в данной области техники.

Иммуногенная композиция по настоящему изобретению может быть легко получена с использованием способов и методов, хорошо известных в данной области, и композиция может быть введена различными способами, предпочтительно парентерально или интраназально. Композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый транспортер, эксципиент, связывающее вещество, носитель, консервант, буферный агент, изотонический агент, эмульгатор или увлажнитель. Примеры композиций, подходящих для парентерального или интраназального введения, могут включать водный и неводный стерильный инъекционный раствор, который может содержать растворенное вещество, которое делает композицию антиоксиданта, буфера, бактериостатического агента и жидкого компонента тела интересующего субъекта изотонической; и водную и неводную стерильную суспензию, которая может содержать суспендирующий агент или загуститель. Активные иммуногенные ингредиенты часто смешивают с фармацевтически приемлемым эксципиентом, например водой, физиологическим раствором, декстрозой, глицерином, этанолом и т.д. Кроме того, иммуногенная композиция может содержать небольшое количество дополнительного вещества, например увлажнителя, эмульгатора, рН-буферного агента, связывающего агента, носителя или консерванта.

Композиция шестивалентной комбинированной вакцины может содержать буферный агент. Буфер в составе раствора по настоящему изобретению играет роль в поддержании рН раствора для предотвращения быстрого изменения рН, и предпочтительные примеры буфера могут включать фосфатный буфер, гистидиновый буфер, цитратный буфер, трис-буфер и т.д.

Композиция по настоящему изобретению содержит изотонический агент. Примеры изотонического агента могут включать аминокислоты, поливалентные спирты, хлорид натрия и т.д., и изотонический агент играет роль в поддержании подходящего осмотического давления *in vivo*, когда вакцину вводят в жидкой форме в организм.

Композиция по настоящему изобретению может содержать фармацевтически приемлемый эксципиент. Примеры эксципиента могут включать сахара и полиолы, поверхностно-активные вещества, полимеры и т.д. Примеры используемых сахаров и полиолов могут включать сахарозу, трегалозу, лактозу, мальтозу, галактозу, маннит, сорбит, глицерин и т.д. Примеры поверхностно-активных веществ могут включать неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и т.д. Примеры полимеров могут включать декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и т.д.

Эти вещества можно использовать отдельно или в комбинации из двух или более, но специалист в данной области может подходящим образом выбрать их для использования.

Композиция по настоящему изобретению может иметь рН от 5,5 до 8,0, но не ограничена этими значениями.

В типичном воплощении авторы настоящего изобретения получали иммуногенную композицию с использованием шестивалентной комбинированной вакцины, которая содержала вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP), вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV) и доводили рН композиции до 6,7.

Композиция по настоящему изобретению может включать поливалентную комбинированную вакцину, которая содержит вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP), вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), и в частности инактивированная полиовакцина Сэбина (sIPV) может включать тип 1, тип 2 и тип 3.

Поливалентная комбинированная вакцина может содержать вакцину против дифтерии (D) в коли-

честве от 10 до 50 ФЕ/мл; вакцину против столбняка (Т) в количестве от 5 до 30 ФЕ/мл; цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) в количестве от 20 до 50 ЕМ/мл; вакцину против гепатита В (HBsAg) в количестве от 5 до 30 мкг/мл; конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), в количестве от 5 до 20 мкг/мл; инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), которая включает тип 1, тип 2 и тип 3, где тип 1 может содержаться в количестве от 5 до 100 ДЕ/мл, тип 2 в количестве от 10 до 100 ДЕ/мл и тип 3 в количестве от 20 до 120 ДЕ/мл.

В типичном воплощении авторы настоящего изобретения получали иммуногенную композицию с использованием шестивалентной комбинированной вакцины, которая содержит вакцину против дифтерии (D) в количестве 30 ФЕ/мл; вакцину против столбняка (Т) в количестве 20 ФЕ/мл; цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) в количестве 36 ЕМ/мл; вакцину против гепатита В (HBsAg) в количестве 20 мкг/мл; конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), в количестве 10 мкг/мл; и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), где тип 1 содержался в количестве 10 ДЕ/мл, тип 2 в количестве 16 ДЕ/мл и тип 3 в количестве 32 ДЕ/мл; или иммуногенную композицию, которая содержит вакцину против дифтерии (D) в количестве 30 ФЕ/мл; вакцину против столбняка (Т) в количестве 20 ФЕ/мл; цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) в количестве 36 ЕМ/мл; вакцину против гепатита В (HBsAg) в количестве 20 мкг/мл; конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae* тип, b (Hib), в количестве 10 мкг/мл; и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV), где тип 1 содержится в количестве 60 ДЕ/мл, тип 2 в количестве 64 ДЕ/мл и тип 3 в количестве 90 ДЕ/мл.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения многодозовой иммуногенной композиции для поливалентной комбинированной вакцины, включающий:

(а) смешивание вакцины против дифтерии (D), вакцины против столбняка (Т) и цельноклеточной вакцины против коклюша (wP) или бесклеточной вакцины против коклюша (aP) с фосфатом алюминия, гидроксидом алюминия или их комбинацией;

(б) добавление вакцины против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированной вакцины *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированной полиовакцины Сэбина (sIPV) к смеси со стадии (а) и перемешивание;

(в) добавление 2-РЕ и формальдегида к смеси со стадии (б), перемешивание и доведение конечного значения рН смеси до 5,5-8.

В настоящем изобретении поливалентная комбинированная многодозовая вакцина, вакцина против дифтерии, вакцина против столбняка, цельноклеточная вакцина против коклюша или бесклеточная вакцина против коклюша, вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированная вакцина *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), инактивированная полиовакцина Сэбина и т.д., являются такими же, как описано выше.

В типичном воплощении авторы настоящего изобретения добавляли вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (Т) и цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) и фосфат алюминия (Brenntag) в концентрации 1 мг/мл и тщательно все перемешивали. Затем в смесь добавляли вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV) в указанном порядке и смешивали. Наконец добавляли 2-РЕ и формальдегид в соответствии с концентрацией, хорошо перемешивали и конечное значение рН смеси довели до 6,7.

В другом типичном воплощении настоящего изобретения предложен способ предупреждения инфицирования субъекта, который включает введение субъекту иммуногенной композиции по настоящему изобретению.

Иммуногенную композицию по настоящему изобретению можно вводить любым эффективным и удобным способом, включая местное, пероральное, анальное, вагинальное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, интраназальное и внутрикожное введение.

При использовании здесь термин "субъект" относится к многоклеточному эукариотическому животному, которое включает (без ограничения ими) метазоа, млекопитающих, ovids, крупный рогатый скот, птиц, приматов и людей.

В настоящем изобретении вышеуказанная инфекция может относиться к инфекциям, вызванным вирусом коклюша, полиомиелита, дифтерии, столбняка, вирусом гепатита В и вирусом *Haemophilus influenzae*, тип b.

Осуществление изобретения

Ниже настоящее изобретение будет подробно описано с сопутствующими типичными воплощениями. Однако раскрытые здесь типичные воплощения представлены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Протоколы и критерии теста противомикробной активности вакцин.

В настоящем изобретении тестирование противомикробной активности выполняли в соответствии с критериями части В Европейской Фармакопей (ЕР-В), предъявляемыми ВОЗ к вакцинным продуктам, между Европейской Фармакопеей и Фармакопеей Соединенных Штатов (USP).

В конкретных деталях этого теста все четыре разных типа микроорганизмов, включающих два разных типа бактерий (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO. 9027, PA) и *Staphylococcus aureus* (ATCC NO.

6538, SA)), один тип дрожжей (*Candida albicans* (ATCC NO. 10231, CA)) и один тип грибов (*Aspergillus niger* (ATCC NO. 16404, AN)) инокулировали в количестве 10^5 - 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл в вакцинные препараты в 0 ч соответственно. Затем образцы собирали через 24 ч, на 7 сутки, на 14 сутки и на 28 сутки, культивировали в твердой среде и количество колоний подсчитывали между 3 и 5 сутками.

Критерии оценки противомикробной активности согласно части В Европейской Фармакопеи и Фармакопеи других стран по сравнению с результатами в соответствии с вышеприведенным методом показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1

	Критерии фармакопеи	Log- уменьшение (уменьшение log КОЕ/мл)				
		6 часов	24 часов	7 суток	14 суток	28 суток
Бактерии	EP-A	2	3			NR*
	EP-B	-	1	3	-	NI**
	USP	-	-	1	3	NI
	JP	-	-	-	3	NI
Грибы и дрожжи	EP-A	-	-	2	-	NI
	EP-B	-	-	-	1	NI
	USP	-	-	NI	NI	NI
	JP	-	-	-	NI	NI

*NR: не выделены

**NI: без увеличения

Как можно видеть из табл. 1 выше, критерии, предъявляемые Европейской Фармакопеей, являются более строгими, чем критерии Фармакопеи США или Фармакопеи Японии, и в частности Европейская Фармакопея разделена на части А и В в соответствии с препаратами. Критерии, предъявляемые ВОЗ, относятся к части В Европейской Фармакопеи (EP-B) (EP 5.1.3. Efficacy of antimicrobial preservation, USP 37-51, Antimicrobial effectiveness testing).

Авторы настоящего изобретения, разрабатывая шестивалентные комбинированные вакцины, содержащие вакцины D, T, wP, Hib, HBsAg и IPV, выполняли тестирование их противомикробной активности путем добавления к комбинированному вакцинному 2-РЕ, который традиционно использовался в качестве консерванта в вакцинах IPV в данной области, в концентрации 5 мг/мл. Однако неожиданно результат оказался неудовлетворительным, не соответствующим критериям оценки противомикробной активности.

При этом опрелечивое вынужденное увеличение количества 2-РЕ (консерванта) для удовлетворения требуемым критериям может вызвать проблемы безопасности у маленьких детей, которые являются субъектами получения комбинированных вакцин, а также могут влиять на производство и стабильность конечных продуктов, и поэтому к принятию такого решения следует подходить тщательно. Количество консерванта(ов), которое должно содержаться в вакцинах, следует выбрать таким образом, чтобы соответствовать требованиям, установленным Фармакопеей США, Европейской Фармакопеей, Фармакопеей ВОЗ или их комбинацией, в отношении безопасности вакцин.

В связи с этим авторы настоящего изобретения провели эксперименты в попытке разработать новую композицию, которая может удовлетворять требованиям по противомикробной активности, содержащей минимальное количество 2-РЕ в качестве консерванта шестивалентной комбинированной вакцины, которая содержит вакцины wP и IPV, и благодаря этому получили следующие результаты.

Пример 2. Получение шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей 2-РЕ в качестве консерванта.

Вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T) и цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) обрабатывали фосфатом алюминия (Brenntag) в концентрации 1 мг/мл и перемешивали с целью хорошего смешивания. Затем последовательно добавляли вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину Сэбина (sIPV) и перемешивали. Наконец добавляли 2-РЕ, перемешивали и доводили конечное значение pH полученного продукта до 6,7.

В частности, концентрация каждого ингредиента комбинированного вакцинного препарата была следующей: D - 30 ФЕ/мл; T - 20 ФЕ/мл; wP - 36 ЕМ/мл; вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) - 20 мкг/мл; Hib - 10 мкг/мл; IPV Сэбина (тип 1 - 60 ДЕ/мл; тип 2 - 64 ДЕ/мл; тип 3 - 90 ДЕ/мл).

Комбинированные вакцины были получены в сравнительных примерах 1-3 в соответствии с концентрацией 2-РЕ, содержание 2-РЕ измеряли с использованием ВЭЖХ и результаты представлены в табл. 2 ниже. Содержание формальдегида измеряли путем анализа с использованием колориметрической реакции. Формальдегид ниже детоксифицирует или инактивирует вакцины против дифтерии (D), столбняка (T) и цельноклеточные вакцины против коклюша (wP) среди антигенов, составляющих шестива-

лентные комбинированные вакцины, и, таким образом, измеренные значения представляют собой формальдегид, происходящий из исходного раствора антигена, оставшийся в шестивалентных комбинированных вакцинах.

Таблица 2

	Целевая концентрация РЕ	Экспериментальное значение для РЕ	Экспериментальное значение для формальдегида
Сравнительный пример 1	5,2 мг/мл	5,2 мг/мл	37,0 мкг/мл
Сравнительный пример 2	6,5 мг/мл	6,7 мг/мл	37,5 мкг/мл
Сравнительный пример 3	7,8 мг/мл	8,0 мг/мл	37,3 мкг/мл

Как видно из табл. 2 выше, 2-РЕ в качестве консерванта содержался на уровне целевой концентрации, и было подтверждено, что формальдегид содержался в концентрации примерно 37 мкг/мл (табл. 2).

Пример 3. Анализ противомикробной активности.

Анализ противомикробной активности выполняли в соответствии с методом анализа, описанным в ЕР-В. Препараты шестивалентной комбинированной вакцины из сравнительных примеров 1-3 инокулировали в общей сложности четырьмя микроорганизмами, включающими два разных типа бактерий (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO. 9027, PA) и *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA)), один тип дрожжей (*Candida albicans* (ATCC NO. 10231, CA)) и один тип грибов (*Aspergillus niger* (ATCC NO. 16404, AN)) в количестве от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл в вакцинные препараты в 0 ч соответственно. Затем образцы бактерий собирали в 0 часов, в 24 ч, на 7 сутки и на 28 сутки, культивировали в твердой среде и подсчитывали количество колоний в промежутке между 3 и 5 сутками и рассчитывали логарифмическое сокращение колоний. Образцы дрожжей и грибов собирали в 0 ч, на 14 сутки и на 28 сутки, культивировали в твердой среде и подсчитывали количество колоний в промежутке между 3 и 5 сутками, затем рассчитывали логарифмическое сокращение колоний. Результаты представлены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

	Время отбора проб	Log сокращение (сокращение log КОЕ/мл)					
		Бактерии			Грибы и дрожжи		
		P.A.	S.A.	Критерии EP-B	C.A.	A.N.	Критерии EP-B
Сравнительный Пример 1 (2-PE: 5,0 мг/мл)	24 часа	*NR	0,5	1 или выше	-	-	-
	7 суток	NR	2,1	3 или выше	-	-	-
	14 суток	-	-	-	3,4	0,7	1 или выше
	28 суток	NR	NR	**NI	NR	NR	NI
Сравнительный Пример 2 (2-PE: 6,5 мг/мл)	24 часа	NR	0.6	1 или выше	-	-	-
	7 суток	NR	2.0	3 или выше	-	-	-
	14 суток	-	-	-	4,6	1,1	1 или выше
	28 суток	NR	NR	NI	NR	4,0	NI
Сравнительный Пример 3 (2-PE: 8,0 мг/мл)	24 часа	NR	0,7	1 или выше	-	-	-
	7 суток	NR	2.2	3 или выше	-	-	-
	14 суток	-	-	-	NR	1,0	1 или выше
	28 суток	NR	NR	NI	NR	NR	NI

*NR: не выделены

**NI: нет увеличения

Со ссылкой на табл. 3, шестивалентные комбинированные вакцины из сравнительных примеров 1-3, содержащие 2-PE в количестве от 5 до 8 мг/мл, не соответствовали критериям анализа противомикробной активности согласно EP-B в отношении *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA). Шестивалентные комбинированные вакцины из сравнительных примеров 1-3 соответствовали критериям анализа согласно EP-B в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO. 9027, PA) и *Candida albicans* (ATCC NO. 10231, CA), и шестивалентные комбинированные вакцины из сравнительных примеров 2 и 3 соответствовали критериям анализа согласно EP-B в отношении *Aspergillus niger* (ATCC NO. 16404, AN). В результате было подтверждено, что, когда комбинированные вакцины содержали 2-PE в количестве от 5 до 8 мг/мл, эти комбинированные вакцины не соответствовали противомикробной активности согласно EP-B. Вакцины, содержащие IPV, в данной области обычно содержат 2-PE в качестве консерванта в количестве 5 мг/мл. Однако, вопреки ожиданиям, шестивалентные комбинированные вакцины по настоящему изобретению не соответствуют требуемой противомикробной активности согласно EP-B даже при увеличении содержания 2-PE до 8,0 мг/мл.

Для скрининга консервантов был разработан метод скрининга консервантов, который может минимизировать содержание 2-PE в диапазоне консервантов, используемых в существующих вакцинных продуктах с использованием 2-PE с сертифицированной стабильностью антигена IPV в IPV-содержащих вакцинах. Из результатов, представленных в табл. 3, видно, что шестивалентные комбинированные вакцины, содержащие 2-PE, имеют слабую противомикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA), и, таким образом, скрининг консервантов проводили в отношении выбора консервант(ов), которые соответствуют критериям EP-B в 24 ч в отношении SA.

Пример 4. Получение шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей 2-РЕ и формальдегид в качестве консервантов.

Вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (Т) и цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) обрабатывали фосфатом алюминия (Brenntag) в концентрации 1 мг/мл и перемешивали для хорошего смешивания. Затем последовательно добавляли вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину и перемешивали. В заключение добавляли 2-РЕ и формальдегид, перемешивали и конечное значение pH полученного продукта доводили до 6,7.

В частности, концентрация каждого из ингредиентов комбинированного вакцинного препарата была следующей: D - 30 ФЕ/мл; Т - 20 ФЕ/мл; wP - 36 ЕМ/мл; вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) - 20 мкг/мл; Hib - 10 мкг/мл; и IPV Сэбина (тип 1 - 10 ДЕ/мл; тип 2 - 16 ДЕ/мл; и тип 3 - 32 ДЕ/мл).

Различные концентрации 2-РЕ и формальдегида в экспериментальных примерах обобщены в табл. 4 ниже. В примерах 1, 4, 7 и 10 формальдегид дополнительно не добавляли. Концентрацию 2-РЕ измеряли посредством ВЭЖХ-анализа и концентрацию формальдегида измеряли методом колориметрической реакции. Результаты представлены в табл. 4 ниже.

Таблица 4

	Целевая концентрация 2-РЕ (мг/мл)	Экспериментальное значение для 2-РЕ (мг/мл)	Целевая концентрация формальдегида (мкг/мл)	Экспериментальное значение для формальдегида (мкг/мл)
Экспериментальный пример 1	5,0	5,1	-	37,3
Экспериментальный пример 2	5,0	5,0	100	91,0
Экспериментальный пример 3	5,0	5,0	150	140,9
Экспериментальный пример 4	6,0	5,8	-	37,5
Экспериментальный пример 5	6,0	5,6	100	91,5
Экспериментальный пример 6	6,0	6,0	150	142,3
Экспериментальный пример 7	7,2	6,9	-	37,2
Экспериментальный пример 8	7,2	7,1	100	91,8
Экспериментальный пример 9	7,2	7,2	150	142,9
Экспериментальный пример 10	8,5	8,2	-	37,3
Экспериментальный пример 11	8,5	8,3	100	93,7
Экспериментальный пример 12	8,5	8,5	130	127,1
Экспериментальный пример 13	8,5	8,5	150	142,8

Как можно видеть из табл. 4 выше, было подтверждено, что концентрации 2-РЕ и формальдегида в качестве консервантов содержались в шестивалентных комбинированных вакцинах в соответствии с целевыми значениями. В примерах 1, 4, 7 и 10 вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (Т)

и инактивированную полиовакцину (IPV), наряду с антигенами, составляющими шестивалентные комбинированные вакцины, дополнительно не содержащие 2-РЕ, детоксифицировали или инактивировали формальдегидом, и, таким образом, формальдегид, происходящий из исходного раствора антигенов, оставался в шестивалентных комбинированных вакцинах, и было подтверждено, что концентрация формальдегида составляла примерно 37 мкг/мл. После подтверждения концентрации консервантов проводили анализ противомикробной активности.

Пример 5. Скрининг противомикробной активности.

Для скрининга противомикробной активности *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA), который с трудом погибает в присутствии 2-РЕ, был выбран в качестве бактерий для скрининга на основании результата, подтвержденного в примере 3, и эксперимент проводили в направлении выбора комбинации каждой дозы 2-РЕ и формальдегида, которая соответствует критериям ЕР-В, путем оценки противомикробной активности с использованием образцов, собранных в 24 ч. Соответственно анализы проводили в соответствии с методом анализа согласно ЕР-В.

В частности, препараты шестивалентной комбинированной вакцины из экспериментальных примеров 1-13, полученные в примере 4, инокулировали *Staphylococcus aureus* (ATCC NO. 6538, SA) в количестве от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл в вакцинные препараты в 0 ч. Образцы собирали в 0 ч и 24 ч, культивировали в твердой среде, подсчитывали число колоний в промежутке между 3 и 5 сутками и рассчитывали логарифм сокращения колоний. Результаты показаны в табл. 5 ниже.

Таблица 5

	Целевая концентрация 2-РЕ (мг/мл)	Целевая концентрация формальдегида (мкг/мл)	Противомикробная активность в отношении SA (24 часа) Критерии ЕР-В
Экспериментальный пример 1	5,0	-	Не соответствует
Экспериментальный пример 2	5,0	100	Не соответствует
Экспериментальный пример 3	5,0	150	Не соответствует
Экспериментальный пример 4	6,0	-	Не соответствует
Экспериментальный пример 5	6,0	100	Не соответствует
Экспериментальный пример 6	6,0	150	Не соответствует
Экспериментальный пример 7	7,2	-	Не соответствует
Экспериментальный пример 8	7,2	100	Не соответствует
Экспериментальный пример 9	7,2	150	Соответствует
Экспериментальный пример 10	8,5	-	Не соответствует
Экспериментальный пример 11	8,5	100	Не соответствует
Экспериментальный пример 12	8,5	130	Соответствует
Экспериментальный пример 13	8,5	150	Соответствует

Как видно из табл. 5 выше, противомикробная активность в отношении SA соответствует критериям EP-B, начиная с комбинации каждой дозы 2-PE (7,2 мг/мл) и формальдегида (150 мкг/мл). Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что комбинация 2-PE и формальдегида в качестве консервантов демонстрировала синергический эффект в отношении противомикробной активности, и комбинация каждой дозы 2-PE (7,2 мг/мл) и формальдегида (150 мкг/мл) или выше была подходящей в качестве консервантов для многодозовых шестивалентных комбинированных вакцин.

Исходя из вышеуказанных результатов авторы настоящего изобретения продолжили разработку многодозовых шестивалентных комбинированных вакцин, содержащих 2-PE (5 мг/мл), который обычно использовали в существующих IPV-содержащих вакцинах, для решения проблемы отсутствия противомикробной активности.

Пример 6. Получение шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей 2-PE (8,5 мг/мл) и формальдегид (150 мкг/мл).

Шестивалентная комбинированная вакцина с новой композицией, то есть композицией из экспериментального примера 14, была получена на основании результата примера 5. В частности, шестивалентную комбинированную вакцину из экспериментального примера 14 получали посредством метода, описанного ниже. Вакцину против дифтерии (D), столбняка (T) и цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) обрабатывали фосфатом алюминия (Brenntag) в концентрации 1 мг/мл и перемешивали для хорошего смешивания. Затем последовательно добавляли вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину и перемешивали. В заключение добавляли 2-PE (8,5 мг/мл) и формальдегид (115 мкг/мл) до конечной концентрации 150 мкг/мл, перемешивали и доводили конечное значение pH полученного продукта до 6,7. В частности, концентрация каждого из ингредиентов препарата комбинированной вакцины была следующей: D - 30 ФЕ/мл; T - 20 ФЕ/мл; wP - 36 ЕМ/мл; вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) - 20 мкг/мл; Hib - 10 мкг/мл; IPV Сэбина (тип 1 - 60 ДЕ/мл; тип 2 - 64 ДЕ/мл; и тип 3 - 90 ДЕ/мл).

В результате проведения анализа противомикробной активности шестивалентной комбинированной вакцины из экспериментального примера 14 в соответствии с методом из примера 3, было подтверждено соответствие комбинированной вакцины критериям EP-B. Содержание консервантов анализировали после хранения комбинированной вакцины при 37°C в течение двух недель и выяснили, что полнота извлечения 2-PE и формальдегида составляла от 90 до 110%, таким образом, подтверждая, что комбинированная вакцина стабильно поддерживалась без потери консервантов.

Пример 7. Получение шестивалентной комбинированной вакцины и анализ противомикробной активности.

Конечный продукт шестивалентной комбинированной вакцины получали путем варьирования композиции инактивированной полиовакцины, которая является компонентом шестивалентной комбинированной вакцины, и продукт подвергали анализу противомикробной активности посредством метода из примера 3. При приготовлении вакцинного продукта вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T) и цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) обрабатывали фосфатом алюминия в концентрации 1 мг/мл и перемешивали для хорошего смешивания. Затем последовательно добавляли вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированную полиовакцину и перемешивали. В заключение добавляли 2-PE в концентрации 8,5 мг/мл и формальдегид до конечной концентрации 130 мкг/мл, перемешивали и доводили конечное значение pH полученного продукта до 6,7. В частности, концентрация каждого из ингредиентов препарата комбинированной вакцины была следующей: D - 30 ФЕ/мл; T - 20 ФЕ/мл; wP - 36 ЕМ/мл; вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) - 20 мкг/мл; Hib - 10 мкг/мл; и IPV (композиция инактивированной полиовакцины показана в табл. 6, ниже).

Таблица 6

	Инактивированная полиоvakцина Сэбина (ДЕ/мл)			Другие антигены	Консервант
	Тип 1	Тип 2	Тип 3		
				D: 30 ФЕ/мл; T: 20 ФЕ/мл; wP: 36 ЕМ/мл; вакцина против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg): 20 мкг/мл; Hib: 10 мкг/мл	2-РЕ: 8.5 мг/мл Формальдегид: 130 мкг/мл
Экспериментальный пример 15	10	64	32		
Экспериментальный пример 16	10	32	32		
Экспериментальный пример 17	10	16	32		

В результате анализа противомикробной активности комбинированной вакцины из экспериментальных примеров 15-17 были подвергнуты тесту на противомикробную активность в соответствии с методом из примера 3, и было подтверждено, что все они соответствуют требованиям критериев ЕР-В.

Таким образом, авторы настоящего изобретения обнаружили оптимизированную комбинацию для каждой дозы 2-РЕ и формальдегида в качестве консервантов, для многодозовой шестивалентной комбинированной вакцины, содержащей вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP), вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и улучшенную инактивированную полиоvakцину (IPV), что позволяет создать многодозовую композицию, способную поддерживать противомикробную активность шестивалентной комбинированной вакцины на основе цельноклеточной вакцины против коклюша (wP).

Объединяя приведенные выше результаты, было подтверждено, что комбинация 2-РЕ и формальдегида по настоящему изобретению является прекрасным консервантом, который может поддерживать противомикробную активность комбинированной вакцины и который также можно эффективно использовать для получения многодозовой композиции, способной поддерживать противомикробную активность поливалентной комбинированной вакцины.

Из вышесказанного специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, сможет понять, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без изменения технических принципов или существенных характеристик настоящего изобретения. В этом отношении воплощения, приведенные здесь в качестве примеров, предназначены только для иллюстративных целей, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Напротив, предполагается, что настоящее изобретение охватывает не только типичные воплощения, но также различные альтернативы, модификации, эквиваленты и другие воплощения, которые могут быть включены в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная поливалентная комбинированная вакцинная композиция для многократного дозирования, содержащая:

(1) поливалентную жидкую комбинированную вакцину, которая содержит вакцину против дифтерии (D), вакцину против столбняка (T), цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) и инактивированную противополиомиелитную вакцину Сэбина (sIPV); и

(2) 2-феноксиэтанол (2-РЕ) и формальдегид (НСНО) в качестве консервантов,

где композиция содержит 2-РЕ в количестве от 7 до 9,5 мг/мл и формальдегид в количестве от 120 до 180 мкг/мл.

2. Композиция по п.1, содержащая 2-феноксиэтанол в количестве от 7,2 до 8,5 мг/мл и формальдегид в количестве от 130 до 150 мкг/мл.

3. Композиция по п.1, в которой поливалентная комбинированная вакцина дополнительно содержит вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) и конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib).

4. Композиция по п.1, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый адъювант, представляющий собой фосфат алюминия, гидроксид алюминия или их комбинацию.

5. Композиция по п.4, которая содержит адъювант в количестве 1,25 мг/мл или менее.

6. Композиция по п.1, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемое связывающее вещество, носитель, буферный агент, изотонический агент, эмульгатор или увлажнитель.

7. Композиция по п.1, которая имеет рН 5,5-8.

8. Композиция по п.3, в которой поливалентная комбинированная вакцина содержит вакцину против дифтерии (D) в количестве от 10 ФЕ(флоккулирующих единиц)/мл до 50 ФЕ/мл; вакцину против столбняка (T) в количестве от 5 до 30 ФЕ/мл; цельноклеточную вакцину против коклюша (wP) или бесклеточную вакцину против коклюша (aP) в количестве от 20 ЕМ(единиц мутности)/мл до 50 ЕМ/мл; вакцину против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg) в количестве от 5 до 30 мкг/мл; конъюгированную вакцину *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), в количестве от 5 до 20 мкг/мл; инактивированную противополиомиелитную вакцину Сэбина (sIPV), которая содержит тип 1, тип 2 и тип 3, где тип 1 содержится в количестве от 5 ДЕ (D-антигенная единица)/мл до 100 ДЕ/мл, тип 2 содержится в количестве от 10 до 100 ДЕ/мл и тип 3 содержится в количестве от 20 до 120 ДЕ/мл.

9. Способ получения иммуногенной поливалентной комбинированной вакцинной композиции многократного дозирования, включающий:

(а) смешивание вакцины против дифтерии (D), вакцины против столбняка (T) и цельноклеточной вакцины против коклюша (wP) или бесклеточной вакцины против коклюша (aP) с фосфатом алюминия, гидроксидом алюминия или их комбинацией;

(б) добавление вакцины против гепатита В (антиген гепатита В, HBsAg), конъюгированной вакцины *Haemophilus influenzae*, тип b (Hib), и инактивированной противополиомиелитной вакцины Сэбина (sIPV) к смеси со стадии (а) и смешивание;

(в) добавление 2-феноксиэтанола (2-PE) до конечной концентрации 7 до 9,5 мг/мл и формальдегида до конечной концентрации 120 до 180 мкг/мл к смеси со стадии (б), смешивание и доведение конечного значения рН смеси до 5,5-8,0.

10. Способ по п.9, где композиция содержит 2-феноксиэтанол в количестве от 7,2 до 8,5 мг/мл и формальдегид в количестве от 130 до 150 мкг/мл.

