



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2022.05.18

(21) Номер заявки  
201700187

(22) Дата подачи заявки  
2015.10.06

(51) Int. Cl. C12N 7/04 (2006.01)  
C12N 7/06 (2006.01)  
A61K 39/13 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01)

---

(54) ПОЛИО ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ СО СНИЖЕННОЙ ДОЗОЙ АНТИГЕНА D И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

---

(31) 3180/MUM/2014

(32) 2014.10.07

(33) IN

(43) 2017.12.29

(86) PCT/IN2015/000376

(87) WO 2016/063291 2016.04.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
СЕРУМ ИНСТИТЬЮТ ОФ ИНДИЯ  
ПРАЙВИТ ЛИМИТИД (IN)

(72) Изобретатель:  
Дхири Раджив Мхаласакант, Пизал  
Самбхаджи Шанкар, Зади Джагдиш  
Камаладжи, Сабали Раджендра  
Нараян (IN)

(74) Представитель:  
Шерстин А.Ю. (RU)

(56) TANO ET AL.: "Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine derived from live-attenuated Sabin strains", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 41, 27 September 2007 (2007-09-27), pages 7041-7046, XP022276655, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2007.07.060 abstract page 7042 - page 7046; figure 1; tables 1-4

T. WILTON ET AL.: "Effect of Formaldehyde Inactivation on Poliovirus", JOURNAL OF VIROLOGY., vol. 88, no. 20, 6 August 2014 (2014-08-06), pages 11955-11964, XP055255525, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01809-14 abstract

BURRAGE T. ET AL.: "Structural differences between foot-and-mouth disease and poliomyelitis viruses influence their inactivation by aziridines", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 18, no. 22, 1 May

2000 (2000-05-01), pages 2454-2461, XP004192990, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00542-3 abstract page 2455; figures 1-5; tables 1-2

T. PREUSS ET AL.: "Comparison of two different methods for inactivation of viruses in serum", CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY., vol. 4, no. 5, 1 September 1997 (1997-09-01), pages 504-508, XP055255497, US ISSN: 1071-412X abstract page 504 - page 505; figure 1

LATOYA JONES BRAUN ET AL.: "The Role of Adjuvant in Mediating Antigen Structure and Stability", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 101, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 1391-1399, XP055257051, WASHINGTON, US ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.23039 page 1391 page 1398, left-hand column

TANYA CLAPP ET AL.: "Vaccines with Aluminum-containing Adjuvants: Optimizing Vaccine Efficacy and Thermal Stability", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 100, no. 2, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 388-401, XP055257057, WASHINGTON, US ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.22284 page 388 - page 389, line 9 page 393, paragraph 2nd full

WO-A1-2008028956

MARTIN JAVIER ET AL.: "Characterization of formaldehyde-inactivated poliovirus preparations made from live-attenuated strains", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 84, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 1781-1788, XP002308423, ISSN: 0022-1317 cited in the application abstract page 1782; figures 1-3 page 1784 - page 1187; tables 1-4

FERGUSON M. ET AL.: "ANTIGENIC STRUCTURE OF POLIOVIRUS IN INACTIVATED VACCINES", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 74, no. 4, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 685-690, XP009040909, ISSN: 0022-1317 cited in the application abstract tables 1-4

---

(57) Изобретение представляет собой способ получения полио вакцинной композиции со сниженной дозой антигена D, содержащей полиовирусные частицы серотипов 1, 2 или 3 в различных комбинациях. Полио вакцинная композиция предназначена для введения с использованием режима введения однократной дозы или двукратной дозы, содержащая от 2,5 до 5 ДЕ полиовирусного штамма Сэбина серотипа 1, 8 до 16 ДЕ полиовирусного штамма Сэбина серотипа 2, и от 5 до 10 ДЕ полиовирусного штамма Сэбина серотипа 3 на дозу вакцины.

---

Сдерживание распространения полиомиелита в существенной степени объясняется применением пероральной полиомиелитной вакцины (ППВ), созданной на основе живых аттенуированных штаммов Сэбина вируса полиомиелита. Однако для применения ППВ имеются ограничения в период после ликвидации. Поэтому важную роль в стратегии ВОЗ по ликвидации полиомиелита играет разработка инактивированной полиовакцины Сэбина (сИПВ). Применение аттенуированных штаммов Сэбина вместо диких штаммов Солка вируса полиомиелита позволит обеспечить дополнительную безопасность в период производства вакцины. Кроме того, в целях предотвращения появления циркулирующих полиовирусов вакцинного происхождения (цПВВП), после ликвидации полиомиелита применение ППВ должно быть прекращено, и вместо них следует начать применять ИПВ. Такие цПВВП являются заразными и могут стать нейровирулентными (аналогично диким полиовирусам), что приведет к развитию вакциноассоциированного паралитического полиомиелита. Существует потенциальная вероятность того, что эти штаммы снова "засеют" мир полиовирусами, что сведет на нет все достижения в области ликвидации полиомиелита.

ИПВ доставляется путем внутримышечных (ВМ) или глубоких подкожных (ГП) инъекций. В настоящее время ИПВ доступен на рынке в виде отдельной безадыювантной композиции или в виде различных комбинаций, в т.ч. ДС-ИПВ (с дифтерийным и столбнячным токсинами) и шестивалентных вакцин КДС-НерВ-Ниб-ИПВ (дополнительно защищающих от коклюша, гепатита В и гемофильического гриппа b). Текущая допустимая стандартная доза вакцин полиомиелита содержит антигены D трех типов в следующем количестве: 40 единиц инактивированного полиовируса типа 1 (Mahoney), 8 единиц инактивированного полиовируса типа 2 (MEF-1) и 32 единицы инактивированного полиовируса типа 3 (Saukett) (например, *Infanrix-IPV<sup>TM</sup>*). Существующие препараты отдельных ИПВ не содержат адъювант.

Большинство экспертов соглашаются в том, что применение ИПВ в мировом масштабе является предпочтительным в связи с подтвержденной эффективностью и безопасностью. Тем не менее, в сравнении с ППВ, соотношение цена-результат для ИПВ существенно выше. Это объясняется следующими основными причинами: (i) требуется большее количество вируса на дозу; (ii) требуется дополнительная последующая обработка (т.е. концентрация, очистка и инактивация), а также соответствующая проверка качества; (iii) происходит потеря антигена или затрудняется его последующее восстановление; (iv) требуются меры по локализации. До настоящего времени финансовый объект являлся основным препятствием для такого нововведения как ИПВ в странах с доходом среднего уровня и ниже. Стоимость производства сИПВ в настоящее время оценивается как эквивалентная стоимости производства ИПВ, которая в 20 раз превышает аналогичный показатель для ППВ. Будущая мировая потребность в ИПВ после ликвидации полиовирусов может возрасти с текущего уровня 80 млн доз до 450 млн доз в год. Соответственно, с высокой вероятностью потребуются способы расширения поставок ИПВ.

Эффективные композиции вакцин со сниженной дозой, обеспечивающие защиту от инфекции при сниженной дозе антигена ИПВ, необходимы в том случае, если поставок обычной вакцины недостаточно для удовлетворения мировой потребности, или в случае, когда стоимость изготовления обычной вакцины не позволяет продавать вакцину по цене, доступной для развивающихся стран. Кроме того, воздействие пониженной дозы ИПВ, по сравнению с существующими на рынке композициями, может быть более безопасным. Таким образом, требуется рассмотреть различные стратегии, позволяющие сделать цены на ИПВ более доступными.

В случае с вакцинами от пандемического гриппа применение адъювантов позволило снизить дозы, повысить доступность и снизить стоимость вакцины. В связи с этим, было сделано предположение, что адъювантная композиция вакцины сИПВ снизит стоимость и увеличит количество доступных доз сИПВ в мире.

Различные исследовательские группы во всем мире анализировали возможность экономии дозы в вакцинах (вакцины от гриппа, в частности, с применением нескольких адъювантов, а именно, квасцы, эмульсии, агонисты TLR (MPL, CpG, poly-IC, имиквимод), dmLT, 1,25-дигидроксивитамин D3, SAF01, поли[ди(карбоксилатофеноксифосфазен)] (PCPP) и репликоны частиц венесуэльского лошадиного энцефалита (ВЛЭ). Применение большей части изученных типов адъювантов связано со следующими сложностями: i) отсутствие сведений о безопасности или отнесение к классу токсичных веществ регулятивными органами; (ii) наличие ограничений по способу применения; (iii) недостаточная воспроизводимость при изготовлении; (iv) стабильность адъюванта.

Адъюванты в виде эмульсии (MF-59, AS03, AF3), как сообщалось ранее, дают высокий эффект снижения дозы (более чем в 30 раз) в вакцинах от гриппа и гепатита В. Эти адъюванты действуют посредством создания депо в месте инъекции, что обеспечивает постепенный выпуск антигенного материала и стимулирование продуцирующих антитела плазматических клеток. Однако такие адъюванты считаются слишком токсичными для широкой профилактической вакцинации людей, и обычно их применение ограничивается тяжелыми и (или) неизлечимыми состояниями, такими как рак, с более высокой степенью допустимости побочных эффектов.

Кроме того, соли алюминия считаются безопасными и в настоящее время уже используются в комбинированных вакцинах, содержащих сИПВ; для их разработки существует меньше препятствий, и их производство является менее дорогостоящим.

Однако в настоящее время нет сведений о возможности существенного снижения дозы с помощью адьювантов на основе алюминия.

Одним из наиболее критически важных этапов в производстве вакцин от патогенных микроорганизмов, в частности, вирусных вакцин, является вирусная инактивация. В случае вирусной инактивации в качестве агента инактивации при изготовлении вакцин наиболее часто используется формалин. Формальдегид инактивирует вирус путем необратимого перекрестного сшивания первичных аминогрупп в поверхностных белках с другими близлежащими атомами азота в белке или ДНК посредством СН<sub>2</sub>-связи. Потенциальная проблема, связанная с применением формалина для вирусной инактивации, состоит в том, что при этом применяется ряд химических реакций, приводящих к образованию продуктов, способных вызвать перекрестное сшивание вирусных белков и скопление вирусных частиц. Это может снижать эффективность инактивации и также может привести к частичному разрушению иммуногенности антигена в вакцине. Соответственно, ранее сообщалось, что инактивация полиовирусов формалином может влиять на вирусную иммуногенность, а также на антигенность. (См. "Журнал общей вирусологии, Мораг Фергюсон и др." 1993), 74, 685-690. Что еще более важно, ранее описанные способы инактивации формальдегидом частично проводились в присутствии фосфатного буфера, при этом наблюдались существенные потери антигена D наряду с модификацией эпитопа для штаммов Сэбина типов I/II/III (восстановление антигена D после инактивации: 22% для типа I, 15% для типа II, 25% для типа III), таким образом, не удавалось обеспечить соответствие эпитопа. Поэтому возможно, что антитела, произведенные реципиентами инактивированных формалином полиовирусов (в присутствии фосфатного буфера), не способствуют защитной иммунной реакции.

Комбинируя инактивацию формалином с инактивацией ультрафиолетовыми лучами, ученые попытались устранить ограничения, присущие УФ-инактивации и инактивации формалином, взятым по отдельности, соответственно, при инактивации особенно устойчивых полиовирусов. См., например, "Опыт производства вакцин от полиовирусов, МакЛин и др.", Прогр. Мед. Вирол, т. 1, стр. 122-164 (1958.) 122-164 (1958.)

Тейлор и др. (Ж. Иммунол. (1957) 79:265-75) описывают инактивацию вируса полиомиелита формалином и УФ-лучами, взятыми в сочетании. Молнер и др. (Ам. здравоохран. (1958) 48:590-8), описывают создание измеримого уровня циркулирующих антител в крови испытуемых, привитых полиомиелитной вакциной, инактивированной УФ-лучами и формалином. Труффелли и др. (Прикл. микробиол. (1967) 15:516-27) сообщают об инактивации аденовируса и онкогенного обезьяньего вируса 40 у хомяков в процессе трехэтапной инактивации формалином, УФ-лучами и β-пропиолактоном (BPL). Майями (Микробиол. иммунол. (1986) 30:213-23) описывает подготовку иммуногенов вируса Сендай с помощью УФ-лучей и формалина. Однако ранее рассмотренные перспективные альтернативы для формальдегида, такие как β-пропиолактон (BPL), по сообщениям, давали иммунокомплексную реакцию при комбинировании с другими компонентами антирабической вакцины. Кроме того, было показано, что при этом формировались плоскоклеточные карциномы, лимфомы и гепатомы у мышей.

#### Сущность изобретения

Таким образом, в особенности желательно использовать благоприятные состояния инактивации формальдегидом, позволяющие поддерживать структурную целостность антигенных структур штаммов Сэбина, а также применять безопасные и рентабельные адьюванты, которые могут привести к значительному снижению дозы (т.е. в 8-10 раз) сИПВ (ИПВ Сэбина) в составе вакцины, и тем самым снизить стоимость изготовления, увеличить поставки вакцин и сделать вакцины доступными для развивающихся стран.

На текущий момент авторами изобретения сделано удивительное открытие, состоящее в том, что потери антигена D после инактивации формальдегидом могут вызываться присутствием фосфатного буфера, который вызывает неожиданное нежелательное скопление вирусов полиомиелита. Настоящее изобретение дает усовершенствованный процесс инактивации формальдегидом в присутствии TRIS-буфера, что позволяет обеспечить минимум модификаций эпитопа и соответственно сократить потери антигена D. Впоследствии могут быть получены вакцинные композиции с существенно сниженной дозой ИПВ Сэбина, по меньшей мере, в 8 раз для типа I и в 3 раза для типа III.

Согласно настоящему изобретению предложен способ получения композиции, содержащей энтеровирусные частицы, включающий следующие этапы:

- a) производство среды, содержащей энтеровирусные частицы;
- b) очищение энтеровирусных частиц от среды;
- c) стабилизация очищенных энтеровирусных частиц;
- d) инактивация формалином энтеровирусных частиц, при которой в течение, по меньшей мере, части процесса инактивации используют буфер, отличный от фосфатного буфера, в концентрации, достаточной для предотвращения или уменьшения скопления энтеровирусных частиц в целях снижения потерь антигена D после инактивации в 8-10 раз по сравнению с применением фосфатного буфера; и
- e) адсорбция энтеровирусных частиц на адьюванте в виде соли алюминия, при которой адсорбция в процентах на алюминии составляет по меньшей мере 95%.

Согласно настоящему изобретению буфер на этапе (d) выбирают из группы, состоящей из TRIS, TBS, MOPS, HEPES и бикарбонатного буферов.

Согласно настоящему изобретению используют TRIS буфер с рН около 6,8-7,2 и в концентрации в диапазоне 30-70 мМ, предпочтительно 40 мМ.

Согласно настоящему изобретению упомянутый адъювант в виде соли алюминия, описанный на этапе (e), выбирают из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, и смеси этих двух веществ.

Согласно настоящему изобретению упомянутый адъювант в виде соли алюминия является гидроксидом алюминия с концентрацией от 1,5 мг/0,5 мл до 2,5 мг/0,5 мл, предпочтительно от 2,100 мг/0,5 мл до 2,4 мг/0,5 мл при рН около 6,5.

Согласно настоящему изобретению общее содержание алюминия в трехвалентной вакцине составляет 0,8-1,2 мг, предпочтительно 0,8 мг  $Al^{3+}$  на дозу 0,5 мл, со следующими характерными показателями: по меньшей мере 0,4 мг  $Al^{3+}$  для типа 1, по меньшей мере 0,2 мг  $Al^{3+}$  для типа 2, по меньшей мере 0,2 мг  $Al^{3+}$  для типа 3.

Согласно настоящему изобретению композиция, включающая энтеровирусные частицы, является вакциной.

Согласно настоящему изобретению энтеровирусные частицы являются энтеровирусом полиовирусом.

Согласно настоящему изобретению энтеровирусные частицы содержат полиовирусы Сэбина серотипов 1, 2 и 3.

Согласно настоящему изобретению энтеровирусные частицы содержат полиовирусы Солка серотипов ИПВ типа 1 (Mahoney), ИПВ типа 2 (MEF-1); и (или) ИПВ типа 3 (Saukett).

Согласно настоящему изобретению вакцина является инактивированной полиовакциной (ИПВ) со сниженной дозой.

Согласно настоящему изобретению противополиомиелитная инактивированная вакцина со сниженной дозой содержит:

i) инактивированный полиовирус типа 1 с дозировкой менее 15 единиц антигена D вместо стандартной дозы 42ДЕ; и (или)

ii) инактивированный полиовирус типа 2 с дозировкой менее 18 единиц антигена D; и (или)

iii) инактивированный полиовирус типа 3 с дозировкой менее 15 единиц антигена D вместо стандартной дозы 32ДЕ.

Согласно настоящему изобретению упомянутая противополиомиелитная инактивированная вакцина со сниженной дозой может быть выбрана из группы:

i) композиции с однократной дозой штаммов Сэбина с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.5-16-10;

ii) композиции с двукратной дозой штаммов Сэбина с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.5-16-10;

iii) композиции с однократной дозой штаммов Сэбина с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.2.5-8-5;

iv) Композиции с двукратной дозой штаммов Сэбина с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.2.5-8-5;

v) композиции с однократной дозой штаммов Сэбина с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.5-8-10;

vi) композиции с двукратной дозой штаммов Сэбина с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.5-8-10;

vii) композиции с однократной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.7.5-16-10;

viii) композиции с двукратной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.7.5-16-10;

ix) композиции с однократной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.8-2-5;

x) композиции с двукратной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.8-2-5;

xi) композиции с однократной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.10-2-5;

xii) композиции с двукратной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.10-2-5;

xiii) композиции с однократной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.10-2-12;

xiv) композиции с двукратной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из пп.10-2-12;

xv) композиции с однократной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной

ной из пп.5-2-5;

xvi) композиции с двукратной дозой штаммов Солка с комбинацией типа 1, типа 2, типа 3, выбранной из п.5-2-5.

Согласно настоящему изобретению при приготовлении инактивированной полиовакцины со сниженной дозой, содержащий полиовирусы Солка или Сэбина, выполняют следующие этапы:

- a) производство среды, содержащей полиовирусы;
- b) очищение полиовирусов от среды;
- c) стабилизацию очищенных полиовирусов путем введения среды М-199, содержащей глицин;
- d) инактивацию полиовирусов с помощью формальдегида 0,025% при 37°C в течение 5-13 дней с использованием TRIS буфера в концентрации от 30 до 60 мМ для предотвращения или уменьшения скопления частиц полиовируса, в целях снижения потери антигена D после инактивации в 8-10 раз по сравнению с применением фосфатного буфера; и
- e) адсорбцию инактивированных полиовирусов на адъюванте гидроксиде алюминия, с концентрацией 2-2,5 мг/доза, где адсорбция на гидроксиде алюминия превышает 95% для типа 1, типа 2 и типа 3.

Согласно настоящему изобретению при приготовлении инактивированной полиовакцины со сниженной дозой, содержащей полиовирусы Солка или Сэбина, выполняют следующие этапы:

- a) производство среды, содержащей полиовирусы;
- b) очищение полиовирусов от среды;
- c) стабилизацию очищенных полиовирусов путем введения среды М-199, содержащей глицин;
- d) инактивацию полиовирусов с помощью формальдегида 0,025% при 37°C в течение 5-13 дней с использованием TRIS буфера в концентрации от 30 до 60 мМ для предотвращения или уменьшения скопления частиц полиовируса, в целях снижения потери антигена D после инактивации в 8-10 раз по сравнению с применением фосфатного буфера; и
- e) адсорбцию инактивированных полиовирусов на адъюванте гидроксиде алюминия, с концентрацией 2-2,5 мг/доза, где адсорбция на гидроксиде алюминия превышает 95% для типа 1 и типа 3.

Согласно настоящему изобретению упомянутая противополиомиелитная инактивированная вакцина со сниженной дозой штамма Солка или Сэбина не содержит штаммов типа 2.

Согласно настоящему изобретению поливалентная вакцина, состоящая из ИПВ со сниженной дозой, может содержать один или более антигенов из патогена, выбранного из следующего списка: гемофильный грипп (*Haemophilus influenzae*) b, менингококк (*Neisseria Meningitidis*) типа A, менингококк типа C, менингококк типа W, менингококк типа Y, менингококк типа X, менингококк типа B, стрептококк пневмонии (*Streptococcus pneumoniae*), стрептококк агалактия (*Streptococcus agalactiae*), сальмонелла тифи (*Salmonella typhi*), гепатит A, гепатит B, РС-вирус, гепатит C, дифтерийный токсин, столбнячный токсин, цельноклеточный коклюш, бесклеточный коклюш, золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), сибирская язва, холерный вибрион, вирус Зика, вирус Эбола, чикунгунья, лихорадка денге, малярия, корь, свинка, краснуха, бацилла Кальметта-Герена, японский энцефалит, ротавирус, оспа, шигеллез, желтая лихорадка, тиф, вирус мозаики цветной капусты, опоясывающий лишай, ветряная оспа, ВПЧ, ВПГ и ВИЧ.

#### **Перечень фигур, чертежей и иных материалов**

Фиг. 1: алюминия фосфата гель, подготовленный в 0,9%-ном растворе NaCl (Зависимость pH от дзета-потенциала при различных концентрациях алюминия фосфата геля).

Фиг. 2 - алюминия фосфата гель, подготовленный в WFI (Зависимость pH от дзета-потенциала при различных концентрациях алюминия фосфата геля).

Фиг. 3 - алюминия гидроксида гель, подготовленный в 0,9%-ном растворе NaCl (Зависимость pH от дзета-потенциала при различных концентрациях алюминия гидроксида геля).

Фиг. 4 - алюминия гидроксида гель, подготовленный в WFI (Зависимость pH от дзета-потенциала при различных концентрациях алюминия гидроксида геля).

#### **Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения**

Важным объектом настоящего изобретения является тот факт, что вышеупомянутый усовершенствованный процесс инактивации формалином и адсорбции на соли алюминия включает в себя следующие этапы:

- a) добавление очищенного основного вещества ИПВ Сэбина к TRIS буферу (30-50 мМ) с pH от 6,8 до 7,2;
- b) добавление среды М-199, содержащей глицин (5 г/л), в смесь (a),
- c) добавление 0,025%-ного формальдегида с помешиванием,
- d) инкубирование смеси, полученной в этапе (c), при 37°C в течение 5-13 дней на магнитной мешалке,
- e) обработка смеси после инкубирования посредством промежуточной фильтрации (0,22 мкм) на 7 день и конечной фильтрации на 13 день,
- f) хранение основного вещества, полученного после этапа (e), при 2-8°C,
- g) выполнение анализа D-Ag ELISA для определения единиц антигена D,
- h) взятие требуемого объема, обработанного в автоклаве Al(OH)<sub>3</sub> для получения конечной концен-

трации Alum ( $Al^{+++}$ ) 0,8-1,2 мг/доза в контейнере емкостью 50 мл,

i) добавление основного вещества сИПВ со скорректированным D-Ag, и доведение до нужного объема разбавителем (10x M-199+0,5% глицина),

j) корректировка конечного pH в композиции и получение конечной композиции с pH от 6 до 6,5,

к) обработка основного вещества композиции посредством магнитного перемешивания в течение ночи при 2-8°C, где инактивация формалином в этапе (а) не происходит в присутствии фосфатного буфера.

Первый вариант осуществления настоящего изобретения состоит в том, что упомянутый буфер, используемый при инактивации формальдегидом, может быть выбран из группы, состоящей из TRIS-, TBS-, MOPS-, HEPES- и бикарбонатного буферов.

Преимущественный объект первого варианта осуществления состоит в том, что указанная инактивация формальдегидом может происходить в присутствии TRIS-буфера или TBS (TRIS-забуференный раствор) с концентрацией, выбранной из следующих значений: 30, 40 и 50 мм, предпочтительно 40 мм, и с показателем pH, выбранным из следующих значений: 6,8; 6,9; 7; 7,1 и 7,2, предпочтительно от 6,8 до 7,2, где для указанной инактивации не используется фосфатный буфер.

Второй вариант осуществления настоящего изобретения состоит в том, что адсорбция инактивированного формалином сИПВ может быть произведена на гидроксиде алюминия, с концентрацией, выбранной из следующих значений: 1,5 мг/доза, 1,8 мг/доза, 2,2 мг/доза, предпочтительно от 2 до 2,4 мг/доза, и с показателем pH, выбранным из следующих значений: 6,2; 6,3; 6,4 и 6,5, предпочтительно 6,5.

Третий вариант осуществления настоящего изобретения состоит в том, что упомянутый усовершенствованный процесс инактивации формалином и адсорбции на гидроксиде алюминия может приводить к восстановлению антигена D после инактивации в диапазоне от 50 до 80%, а процентный показатель адсорбции на гидроксиде алюминия может находиться в диапазоне от 85 до 99%. Одним из объектов третьего варианта осуществления является то, что настоящее изобретение обеспечивает усовершенствованный процесс инактивации формалином и адсорбции на гидроксиде алюминия, что приводит к снижению дозы, по меньшей мере, в 8 раз для штамма Сэбина типа I, и, по меньшей мере, в 3 раза для типа III по сравнению со стандартной дозой 40ДЕ-8ДЕ-32ДЕ. Вторым объектом третьего варианта осуществления состоит в том, что настоящее изобретение обеспечивает усовершенствованные способы инактивации формальдегидом и адсорбции на гидроксиде алюминия, в результате чего вакцинная композиция содержит:

i) инактивированный полиовирус типа 1 в дозировке по меньшей мере 5 единиц антигена D;

ii) инактивированный полиовирус типа 2 в дозировке по меньшей мере 8 единиц антигена D; и

iii) инактивированный тип полиовируса 3 в дозировке по меньшей мере 10 единиц антигена D.

Четвертый вариант осуществления настоящего изобретения состоит в том, что упомянутый адьювант из соли алюминия является гидроксидом алюминия с концентрацией в диапазоне от 1,5 мг/0,5 мл до 2,5 мг/0,5 мл, предпочтительно от 2,100 мг/0,5 мл до 2,4 мг/0,5 мл при pH приблизительно 6,5.

Одним из объектов четвертого варианта осуществления является то, что общее содержание алюминия в трехвалентной вакцине (типа 1, 2 и 3) может составлять 800-1000 мкг, предпочтительно 800 мкг  $Al^{3+}$  на дозу 0,5 мл, со следующими характерными показателями: по меньшей мере, 400 мкг  $Al^{3+}$  для типа 1, по меньшей мере, 200 мкг  $Al^{3+}$  для типа 2, по меньшей мере, 200 мкг  $Al^{3+}$  для типа 3.

Другой объект четвертого варианта осуществления состоит в том, что указанная композиция полиомиелитной вакцины со сниженной дозой может состоять из штаммов типа 1 и типа 3 без типа 2, при этом дозовый объем может составлять от 0,1 до 0,4 мл.

Композиции вакцин со сниженной дозой, приготовленные описанными в изобретении способами, могут быть следующими: i) "Отдельная сИПВ", в которой антигены могут включать сИПВ типа 1 или сИПВ типа 2, или сИПВ типа 3, или сИПВ типа 1 и 2, или сИПВ типа 1 и 3, или сИПВ типа 2 и 3, или сИПВ типа 1, 2 и 3, или ii) "Комбинированные вакцины, содержащие сИПВ", в которых указанные отличные от ИПВ антигены комбинированных вакцин могут быть выбраны из следующего списка, без ограничения: дифтерийный токсин, столбнячный токсин, антиген(ы) цельноклеточного коклюша, антиген(ы) бесклеточного коклюша, поверхностный антиген гепатита В, антиген(ы) гемофильного гриппа, антиген(ы) менингококка (*Neisseria meningitidis*) А, антиген(ы) менингококка С, антиген(ы) менингококка W-135, антиген(ы) менингококка Y, антиген(ы) менингококка X, буллы или очищенные антиген(ы) менингококка В, антиген(ы) гепатита А, антиген(ы) сальмонеллы тифи, антиген(ы) стрептококка пневмонии.

Отличные от ИПВ антигены могут быть адсорбированы на соли алюминия, такой как гидроксид алюминия, на соли алюминия, такой как фосфат алюминия, или на смеси гидроксида алюминия с фосфатом алюминия, либо могут быть не адсорбированы.

Полиовирус может быть выращен в клеточной культуре. Клеточная культура может быть клеточной линией VERO или РМКС (стабильная клеточная линия, полученная из обезьяньей почки). Клетки VERO могут быть удобными микроносителями культуры. После выращивания вирионы могут быть очищены с применением различных способов, таких как ультрафильтрация, диафильтрация и хроматография. До введения пациентам вирусы должны быть инактивированы и это может быть достигнуто посредством обработки формальдегидом.

Композиции могут быть представлены во флаконах, либо в готовых заполненных шприцах. Шприцы могут поставляться с иглами или без игл. Шприц будет содержать одну дозу состава, в то время как флакон может содержать одну или несколько доз (например, 2 дозы).

В одном варианте осуществления доза предназначена для человека. В дальнейшем варианте осуществления доза будет предназначена для взрослого, подростка, ребенка старшего или младшего возраста, младенца младше года, при этом она может вводиться посредством инъекции.

Вакцины, приготовленные по настоящему изобретению, могут быть упакованы в форме однократной дозы или в форме многократной дозы (например, 2 дозы).

Упомянутая композиция с многократной дозой может быть выбрана из группы, состоящей из 2 доз, 5 доз и 10 доз. Для форм с многократной дозой более предпочтительны флаконы, чем заполненные шприцы. Эффективные дозовые объемы могут быть установлены по традиционной схеме, но стандартная для человека доза в композиции для инъекции имеет объем 0,5 мл.

### Примеры

Пример 1. Очищение ИПВ Сэбина (сИПВ).

1) Тангенциальная проточная фильтрация вдоль потока (TFF).

Очищенный пул был доведен до концентрации 10X посредством тангенциальной проточной фильтрации вдоль потока с помощью кассет 100 Kda (0,5 м<sup>2</sup>) и затем подвергнут диафильтрации в объеме, в 3 раза превышающем полученный объем, фосфатным буфером (40 мМ, рН: 7.0).

2) Колоночная хроматография.

Очищение было проведено методом ионообменной хроматографии (IEC). 10-кратный TFF-концентрат был пропущен через DEAE сефарозу быстрого потока (слабоосновный анионит), в колонке хк-26 с использованием Акта Explorer (GE Healthcare). Отрицательно заряженные примеси, как было обнаружено, оставались на колонке, в то время как вирус полиомиелита собирался в потоке через фосфатный буфер 40 мМ.

3) Замена на TRIS-буфер.

В целях сведения к минимуму потерь антигена в достаточно трудоемкой процедуре инактивации (13 дней), для очищенного вирусного пула была произведена замена фосфатного буфера на TRIS-буфер (40 мМ, рН: 7) с помощью системы TFF (100 KDa; 0,1 м<sup>2</sup>) для очищенного вирусного пула была произведена замена тремя объемами TRIS-буфера.

Таблица 1

-	Содержание антигена D (Фосфатный буфер 40 мМ при инактивации)	Содержание антигена D (TRIS-буфер 40 мМ при инактивации)
Тип 1	52,70 ДЕ/мл	408,19 ДЕ/мл
Тип 2	22,63	180,20
Тип 3	4,21	21,50

В случае, когда способы инактивации формальдегидом, в частности производились в присутствии фосфатного буфера, существенные потери антигена D наблюдались для штамма Сэбина типа I. Между тем было обнаружено, что инактивация формальдегидом в присутствии TRIS-буфера привела к минимальной потере антигена D.

Таблица 2. При инактивации используются различные концентрации TRIS-буфера

	30мМ	40мМ	50мМ
Тип 1	500ДЕ/мл	576,80 ДЕ/мл	585 ДЕ/мл
Тип 2	140 ДЕ/мл	165,16 ДЕ/мл	155 ДЕ/мл
Тип	16 ДЕ/мл	21,17 ДЕ/мл	19 ДЕ/мл

TRIS-буфер при концентрации 40 мМ оказался наиболее эффективным в объекте сохранения содержания антигена D для сИПВ 1, 2 и 3.

С) Определение содержания антигена D посредством анализа ELISA.

День 1. Нанесение на планшет:

1. В физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) пипеткой вносилось 100 мкл бычьей антиполиомиелитной сыворотки на лунку.

2. Титрационный микропланшет был запечатан и инкубирован в течение ночи при комнатной температуре.

День 2. Блокировка:

1. Планшеты были промыты (Промывочный/разбавляющий буфер -0,05% твин 20 в PBS с концентрацией 1X) 3 раза.

2. Блокирующий буфер (1% BSA в PBS) вносился пипеткой, по 300 мкл на лунку.

3. Планшет был запечатан и инкубирован в течение 45 мин при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Введение пробы:

1. Планшет был промыт 3 раза.
2. Разбавитель проб вносился по 100 мкл во все лунки, кроме лунки ряда А.
3. Стандарт вносился по 100 мкл в первые две лунки в колонках 2 и 3.
4. Проба вносилась по 100 мкл в первые две лунки в колонках 4-12.
5. Предварительное разбавление пробы до надлежащей концентрации.
6. Разбавитель проб вносился по 100 мкл в первые две лунки в колонке 1.
7. Последовательное двукратное разбавление в колонке было произведено путем передачи 100 мкл из каждой лунки в соседнюю лунку той же колонки и вывода 100 мкл из последней лунки.

8. Инкубирование при  $37^\circ\text{C}$  в течение 2 ч.

9. Планшеты были оставлены на ночь при  $4^\circ\text{C}$ .

День 3. Введение моноклональных антител:

1. Планшет был промыт 3 раза.
2. Были введены моноклональные антитела по 100 мкл, разбавленные (1:240) для конкретного типа.
3. Планшеты были запечатаны и инкубированы в течение 2 ч при  $37^\circ\text{C}$ .

Конъюгаты:

1. Планшет был промыт 3 раза.
2. Были введены конъюгаты по 100 мкл, разбавленные (тип 1 - 1:2400, тип 2 - 1:1500, тип 3 - 1:4800).
3. Планшет был запечатан и инкубирован в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ .

Введение субстрата:

1. Был введен ТМВ субстрат по 100 мкл во все лунки.
2. Смесь была инкубирована при комнатной температуре в течение 10 мин.
3. Реакция была остановлена путем введения 100 мкл 2 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
4. Чтение планшета было произведено на 450/630 нм.
5. Была вычислена концентрация антигена D, с помощью программного обеспечения КС4.

Пример 3. Адсорбция СИПВ.

1. 1%  $\text{Al}(\text{OH})_3$  и  $\text{AlPO}_4$ , обработанные в автоклаве, использовались для подготовки композиций.
2. Требуемый объем  $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{AlPO}_4$  был взят для получения необходимой концентрации алюминия в стеклянном флаконе 100 мл.
3. Была введена основная часть инактивированного полиовируса с известным показателем D-Ag, затем объем был доведен до требуемого разбавителем.
4. pH конечной композиции был скорректирован до 6,5 с помощью 1N  $\text{HCl}/\text{NaOH}$ .
5. Основная часть композиции была выдержана на магнитной мешалке в течение ночи при  $2-8^\circ\text{C}$ .

Пример 4. Исследования предварительной композиции.

Различные концентрации  $\text{Al}(\text{OH})_3$  и  $\text{AlPO}_4$  были подготовлены в 0,9% солевом растворе и в WFI для проверки размера и дзета-потенциала в зависимости от изменения pH.

Было отмечено, что дзета-потенциал  $\text{AlPO}_4$  уменьшается (отрицательное направление) с увеличением pH от 5 до 7,5 в присутствии WFI, а также в солевом растворе (см. фиг. 1 и 2).

В то же время, дзета-потенциал  $\text{Al}(\text{OH})_3$  в солевом растворе остается неизменным независимо от pH, и концентрации соли  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (см. фиг. 3 и 4).

Пример 5. Исследования адсорбции СИПВ на фосфате алюминия и гидроксиде алюминия.



Таблица 3. Адсорбция штаммов Сэбина типа 1, 2 и 3 (Титр 1060/доза) на солях алюминия (фосфат алюминия и гидроксид алюминия)

	Проба	Титр (на дозу)	Вирусные частицы (в К)	% свободных в SUP	% адсорбированных на геле
Тип 1, АlОН <sub>3</sub>	Контроль	5,45	284	НП	
	А1+++ 125 мкг/доза	4,15	14	4,98	95,02
	А1++ + 250 мкг/доза	3,85	7	2,49	97,51
	А1++ + 500 мкг/доза	3,8	6,3	2,24	97,78
Тип 1, АlРО <sub>4</sub>	Контроль	5,84	691	НП	
	А1++ + 125 мкг/доза	3,49	3	0,43	99,57
	А1++ + 250 мкг/доза	3,09	1,2	0,17	99,83
	А1++ + 500 мкг/доза	2,94	0,87	0,12	99,87
Тип 2, АlОН <sub>3</sub>	Контроль	5,49	309	НП	
	А1++ + 125 мкг/доза	3,59	3,89	1,25	98,75
	А1++ + 250 мкг/доза	3,49	3,09	1	99
	А1++ + 500 мкг/доза	3,49	3,09	1	99
Тип 2, АlРО <sub>4</sub>	Контроль	5,49	309	НП	
	А1++ + 125 мкг/доза	3,15	1,41	0,45	99,5
	А1++ + 250 мкг/доза	3,09	1,23	0,39	99,6
	А1++ + 500 мкг/доза	3,09	1,23	0,39	99,6
Тип 3, АlОН <sub>3</sub>	Контроль	5,59	389	НП	
	А1++ + 125 мкг/доза	4,14	13,8	3,54	96,47
	А1++ + 250 мкг/доза	3,94	8,7	2,23	97,77
	А1++ + 500 мкг/доза	3,54	3,4	0,87	99,13
Тип 3, АlРО <sub>4</sub>	Контроль	5,59	389	НП	
	А1++ + 125 мкг/доза	5,34	218	56,04	43,96
	А1++ + 250 мкг/доза	5,24	173	44,47	55,53
	А1++ + 500 мкг/доза	5,16	144	37,01	62,9

НП - неприменимо.

Было обнаружено, что полиовирус Сэбина типа 3 подвергается адсорбции только на 50-60% с использованием алюминия фосфата (AlPO<sub>4</sub>). При этом, полиовирус Сэбина типа 3 адсорбируется, по меньшей мере, на 90% с использованием Al(OH)<sub>3</sub>. Таким образом, гидроксид алюминия оказывается более эффективным по сравнению с фосфатом алюминия в отношении адсорбции штаммов Сэбина типа 1, 2 и 3.

Пример 6. Исследования иммуногенности сИПВ, адсорбированных на солях алюминия.

Для проверки иммунной реакции адьювантного сИПВ на крысах был выполнен тест SNT (тест нейтрализации сыворотки). Сыворотка была отделена и использована для проверки присутствия нейтрализующих антител для полиовируса определенного типа. Для подтверждения использовалась контрольная сыворотка. Также было выполнено обратное титрование, чтобы определить число добавленных критических вирусных частиц.

Экспериментальная модель на животных: крысы породы Вистар (возраст 8 недель, масса около 200 г), с соотношением самцов и самок в группе 50%/50%).

Способ инокуляции: внутримышечно.

Объем: 0,5 мл.

Забор крови: на 21 день.

Место забора: ретрорбитальный синус.

Таблица 4. Тип 1

№ крысы	Группа 1		Группа 2		Группа 3		Группа 4		Группа 5		Группа 6		Группа 7		Группа 15	
	Ком. ИПВ		5ДЕ 1,15 мг ОН		2,5ДЕ 1,15 мг ОН		1ДЕ 1,15 мг ОН		5ДЕ 1,8 мгР04		2,5ДЕ 1,8 мгР04		1ДЕ 1,8 мгРО		Контроль -ve	
	SNT +ve	Сывороточный титр	SNT	Сывороточный титр	SNT	Сывороточный титр	SNT	Сывороточный титр	SNT	Сывороточный титр	SNT +ve	Сывороточный титр	SNT	Сывороточный титр	SNT	Сывороточный титр
1	1	(1:2)	8	(1:256)	1	(1:2)	4	(1:16)	5	(1:32)	5	(1:32)	2	(1:4)	0	(<1:2)
2	1	(1:2)	5	(1:32)	1	(1:2)	7	(1:12)	8	(1:256)	4	(1:16)	1	(1:2)	0	(<1:2)
3	0	(<1:2)	7	(1:128)	3	(1:8)	0	(<1:2)	4	(1:16)	6	(1:64)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
4	0	(<1:2)	11	(1:2048)	2	(1:4)	2	(1:4)	1	(1:2)	5	(1:32)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
5	7	(1:128)	3	(1:8)	7	(1:128)	5	(1:32)	6	(1:64)	4	(1:16)	1	(1:2)	0	(<1:2)
6	4	(1:16)	7	(1:128)	7	(1:128)	1	(1:2)	5	(1:32)	6	(1:64)	3	(1:8)	0	(<1:2)
7	3	(1:8)	5	(1:32)	4	(1:16)	1	(1:2)	8	(1:25)	7	(1:128)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
8	1	(1:2)	7	(1:12)	3	(1:8)	2	(1:4)	6	(1:64)	0	(<1:2)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
9	3	(1:8)	8	(1:25)	2	(1:4)	3	(1:8)	8	(1:25)	4	(1:16)	4	(1:16)	0	(<1:2)
10	3	(1:8)	7	(1:128)	4	(1:16)	5	(1:32)	6	(1:64)	2	(1:4)	2	(1:4)	0	(<1:2)

Был обнаружен удивительный факт, что ИПВ Сэбина типа 1 адьювантные с использованием гидроксида алюминия с показателем 5ДЕ/доза давали лучшие показатели конверсии сыворотки по сравнению с ИПВ Солка с показателем 40ДЕ/доза и ИПВ Сэбина типа 1 адьювантными с использованием фосфата алюминия с показателем 5ДЕ/доза.

Таблица 5. Тип 2

№ крысы	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	Al(OH) <sub>3</sub> адьювантный					
	4ДЕ (0,6 мг ОН)		8ДЕ (0,6 мг ОН)		16ДЕ 0,6 мг ОН	
	SNT +ve	Сывороточный титр	SNT +ve	Сывороточный титр	SNT +ve	Сывороточный титр
1	3	(1:8)	4	(1:16)	7	(1:128)
2	4	(1:16)	6	(1:64)	5	(1:32)
3	0	(<1:2)	3	(1:8)	5	(1:32)
4	3	(1:8)	4	(1:16)	6	(1:64)
5	5	(1:32)	7	(1:128)	6	(1:64)
6	6	(1:64)	4	(1:16)	9	(1:512)
7	4	(1:16)	7	(1:128)	4	(1:16)
8	5	(1:32)	3	(1:8)	8	(1:256)
9	7	(1:128)	8	(1:256)	8	(1:256)
10	5	(1:32)	3	(1:8)	8	(1:256)

сИПВ типа 2 адьювантные с показателем 8ДЕ/доза давали показатели конверсии сыворотки, эквивалентные ИПВ Солка с показателем 8ДЕ/доза.

Таблица 6. Тип 3

№ крысы	Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	Al(OH) <sub>3</sub> адьювантный					
	10ДЕ 0,6 мг ОН		5ДЕ 0,6 мг ОН		2,5ДЕ 0,6 мг ОН	
	SNT +ve	Сывороточный титр	SNT +ve	Сывороточный титр	SNT +ve	Сывороточный титр
1	3	(1:8)	2	(1:4)	0	(<1:2)
2	0	(<1:2)	5	(1:32)	1	(1:2)
3	2	(1:4)	3	(1:8)	1	(1:2)
4	4	(1:16)	2	(1:4)	0	(<1:2)
5	4	(1:16)	2	(1:4)	1	(1:2)
6	4	(1:16)	1	(1:2)	1	(1:2)
7	9	(1:512)	0	(<1:2)	2	(1:4)
8	7	(1:128)	2	(1:4)	2	(1:4)
9	1	(1:2)	0	(<1:2)	1	(1:2)
10	5	(1:32)	7	(1:128)	1	(1:2)

Было обнаружено, что сИПВ типа 3 адьювантные с показателем 10ДЕ/доза, дают показатель конверсии сыворотки, эквивалентный ИПВ Солка с показателем 32ДЕ/доза.

Таблица 7. Максимальное снижение дозы для сИПВ типа 1, 2 и 3, наблюдаемое после проведения исследований

сИПВ	• Стандартная доза	*Доза СИЛ	Снижение дозы
Тип 1	40ДЕ	5ДЕ	~8-кратное
Тип 2	8ДЕ	8ДЕ	эквивалентное
Тип 3	32ДЕ	10ДЕ	~3-кратное

СИЛ: препарат ИПВ со сниженной дозой, произведенный компанией Serum Institute of India.

Ввиду множества возможных вариантов осуществления, к которым могут быть применены принципы раскрываемого изобретения, следует понимать, что приведенные ниже описания, содержащие пред-

почтительные варианты осуществления, приводятся в качестве примера, но не в качестве исчерпывающего перечня. Множество изменений и модификаций может быть внесено в рамках вариантов осуществления, упомянутых здесь, без отступления от существа таковых. Варианты осуществления, упомянутые в настоящем документе, включают в себя все такие модификации.

#### Имунный ответ адъювантных полиовирусов Сэбина

Авторами изобретения установлено, что в случае адъювантных вирусов, когда применяются адъювант в виде гидроокиси алюминия  $Al(OH)_3$ , наблюдается превосходный эффект снижения дозы.

Если рассматривать режим однократной дозы для проведения иммунизации, то наилучшей комбинацией единиц антигена D для полиовирусов Сэбина типов 1, 2 и 3, соответственно, является комбинация 5-16-10.

Если рассматривать режим введения двух доз для проведения иммунизации, то наилучший иммунитет обеспечивает комбинация 2,5-8-5 единиц антигена D.

	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Единицы антигена D штамма Сэбина	5	16	10
	2.5	8	5
	7.5	16	10

#### Подтверждающие экспериментальные данные применительно к штамму Сэбина

№ Крысы	5 - 16 - 10 с добавл. $Al(OH)_3$						2.5 - 8 - 5 с добавл. $Al(OH)_3$						7.5 - 16 - 10 с добавл. $Al(OH)_3$					
	Стандарт. доз.			Двойн. доз.			Стандарт. доз.			Двойн. доз.			Стандарт. доз.			Двойн. Доз.		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	8	4	10	12	7	12	5	5	3	7	7	12	8	4	10	9	8	10
2	6	7	12	11	7	12	5	5	8	5	9	8	9	2	9	12	6	12
3	6	2	9	6	8	12	5	4	3	8	7	12	11	0	10	8	7	12
4	6	4	9	7	7	12	6	3	11	9	7	12	7	7	7	7	6	12
5	8	4	11	9	10	12	10	0	7	10	7	12	11	6	10	9	8	12
6	6	4	11	10	8	12	6	3	7	9	8	12	6	6	11	9	6	12
7	6	6	8	11	9	12	5	4	8	8	6	12	6	5	10	11	6	12
8	6	6	9	9	7	12	7	3	7	10	9	11	6	4	9	9	5	10
9	7	8	5	10	6	12	5	5	11	10	9	12	7	4	12	10	5	11
10	5	3	5	11	9	12	7	5	8	10	10	12	10	3	9	9	7	12

№ Крысы	Положит. контроль – Тривал. Солк ИПВ						Отрицат. контроль					
	Стандарт. доз.			Двойн. Доз.			Стандарт. доз.			Двойн. Доз.		
	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	1	4	2	4	7	9	0	0	0	0	0	0
2	0	3	0	3	4	8	0	0	0	0	0	0
3	0	5	4	2	4	9	0	0	0	0	0	0
4	0	5	3	6	7	7	0	0	0	0	0	0
5	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	0	0	0	0	0	0
6	2	6	5	1	7	6	0	0	0	0	0	0
7	0	6	2	7	10	9	0	0	0	0	0	0
8	0	5	1	5	8	8	0	0	0	0	0	0
9	0	4	2	5	7	9	0	0	0	0	0	0
10	4	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

#### Имунный ответ адъювантных полиовирусов Солка

Авторами изобретения установлено, что в случае адъювантных вирусов, когда применяются адъювант в виде гидроокиси алюминия  $Al(OH)_3$ , наблюдается превосходный эффект снижения дозы.

Если рассматривать режим однократной дозы для проведения иммунизации, то наилучшей комбинацией единиц антигена D для полиовирусов Солка типов 1, 2 и 3, соответственно, является комбинация 8-2-5.

Если рассматривать режим введения двух доз для проведения иммунизации, то наилучший иммунитет обеспечивает комбинация 2,5-8-5 единиц антигена D.

	Тип 1	Тип 2	Тип 3
Единицы	8	2	5
антигена	5	2	5
D штамма			
Солка			

Подтверждающие экспериментальные данные применительно к штамму Солка

Солк 8 - 2 - 5 с добавл. Al(OH) <sub>3</sub>						Солк 5 - 2 - 5 с добавл. Al(OH) <sub>3</sub>					
Стандарт. доз.			Двойн. доз.			Стандарт. доз.			Двойн. доз.		
Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
3	8	1	9	10	6	2	8	1	10	11	12
5	6	2	9	12	8	2	6	2	10	10	10
4	7	5	12	11	12	4	5	2	9	10	11
7	5	6	11	11	10	6	7	1	12	12	9
8	6	3	10	12	11	5	5	5	8	9	6
5	8	4	10	10	9	2	8	4	11	10	8
2	7	2	8	9	8	3	6	6	8	12	8
4	5	1	9	12	7	6	9	2	9	9	9
5	6	2	8	9	6	2	8	1	10	8	10
3	9	1	12	10	10	1	7	3	12	12	11
Положит. контроль - Тривал. Солк ИПВ						Отрицат. контроль					
Стандарт. доз.			Двойн. доз.			Стандарт. доз.			Двойн. доз.		
Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3	Тип 1	Тип 2	Тип 3
2	8	2	2	6	1	0	0	0	0	0	0
3	10	0	4	5	5	0	0	0	0	0	0
4	7	3	5	7	8	0	0	0	0	0	0
0	4	7	5	7	5	0	0	0	0	0	0
4	5	4	3	9	11	0	0	0	0	0	0
0	6	3	8	9	7	0	0	0	0	0	0
2	10	2	7	8	8	0	0	0	0	0	0
Н/п	Н/п	Н/п	9	10	9	0	0	0	0	0	0
3	8	4	3	7	6	0	0	0	0	0	0
1	9	6	3	8	8	0	0	0	0	0	0

1. Подтверждающие экспериментальные данные применительно к штамму Солка (10-2-5) стандарт. доз.

Полио вакцина Солка 10-2-5 с добавл. адьюванта		
Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	5	7
3	5	6
4	9	3
4	8	2
3	9	5
1	7	7
3	9	7
3	11	6
2	9	5
1	10	6

2. Подтверждающие экспериментальные данные применительно к штамму Солка (10-2-12) стандарт. доз.

Полио вакцина Солка 10-2-12 с добавл. адьюванта		
Тип 1	Тип 2	Тип 3
3	6	9
2	10	9
4	9	8
1	9	10
2	9	11
2	7	9
4	9	9
3	8	11
1	10	10
2	6	12

3. Подтверждающие экспериментальные данные применительно к штамму Солка (5-8-10) стандарт. доз.

Полио вакцина Солка 5-8-10 с добавл. адьюванта		
Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	8	9
2	10	7
1	9	8
0	11	10
2	9	11
1	10	8
0	9	9
3	11	12
0	9	10
1	8	7

4. Подтверждающие экспериментальные данные применительно к штамму Солка (7,5-16-10) стандарт. доз.

Полио вакцина Солка 7,5-16-10 с добавл. адьюванта		
Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	11	8
2	12	9
1	10	7
4	11	10
3	10	8
0	9	11
3	9	10
2	11	12
0	12	9
1	10	7

5.

Положит. образцовый контроль (ИПВ08-143)		
Тип 1	Тип 2	Тип 3
1	8	4
2	9	5
0	2	2
0	3	0
1	4	6
2	4	3
2	5	2
3	9	5
1	6	3
3	6	5

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения полиовакциновой композиции со сниженной дозой антигена D, содержащей полиовирусные частицы серотипов 1, 2 или 3 в различных комбинациях, при этом указанный способ содержит следующие этапы:

(a) получение полиовирусных частиц в клеточной культуре с использованием серотипов 1, 2 или 3 по отдельности в качестве посевного материала;

(b) отделение указанных полиовирусных частиц из культуральной среды посредством концентрирования с использованием тангенциальной проточной фильтрации, а также диафильтрации и ионообменной хроматографии на фосфатном буфере;

(c) замену фосфатного буфера на буфер, выбранный из группы, состоящей из буферов TRIS, TBS, MOPS, HEPES и бикарбонатного буфера, причём указанный TRIS буфер используют в концентрации 30-70 мМоль при pH от около 6,8 до 7,2;

(d) разбавление полученного таким способом указанного концентрата полиовирусных частиц введением в него среды M-199, содержащей глицин в количестве 0,5%;

(e) инактивацию указанных полиовирусных частиц введением формальдегида в количестве 0,025% и инкубирование полученной смеси при температуре 37°C в течение 13 дней, причём указанную инкубируемую смесь фильтруют с использованием фильтра, характеризующегося размером пор 0,22 мкм на день 7 инкубации и после окончания инкубации;

(f) определение титра единиц антигена D для полиовирусных частиц каждого серотипа;

(g) адсорбцию полиовирусных частиц различных серотипов с эффективностью по меньшей мере 95% с использованием адьюванта в виде соли алюминия или гидроксида алюминия, причём указанный гидроксид алюминия используют в концентрации от 1,5 мг на 0,5 мл дозы до 2,5 мг на 0,5 мл дозы при pH около 6,5;

(h) объединение указанных адсорбированных полиовирусных частиц с получением при этом вакцинной композиции определенной валентности.

2. Способ по п.1, в котором указанные полиовирусные частицы содержат полиовирусы Сэбина серотипов 1, 2 и 3.

3. Способ по п.1, в котором указанные полиовирусные частицы содержат полиовирусы Солка серотипов 1 ИПВ (штамм Mahoney), серотипа 2 ИПВ (штамм MEF-1) и/или серотипа 3 ИПВ (штамм Saukett).

4. Способ по п.1, в котором указанный TRIS буфер используют на этапе (c) в концентрации предпочтительно 40 мМоль при pH от около 6,8 до 7,2.

5. Способ по п.1, в котором указанный гидроксид алюминия используют на этапе (g) в концентрации предпочтительно от 2,1 мг на 0,5 мл дозы до 2,4 мг на 0,5 мл при pH около 6,5.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный фосфатный буфер заменяют TRIS буфером в этапе (c) при концентрации от 30 до 60 мМоль, а указанный гидроксид алюминия используют на этапе (g) в качестве указанного адьюванта в концентрации от 2,0 до 2,5 мг на дозу трёхвалентной вакцины.

7. Способ по пп.1 или 6, отличающийся тем, что общее содержание алюминия в указанной трёхвалентной вакцине составляет от 0,8 до 1,2 мг  $Al^{3+}$ , предпочтительно 0,8 мг  $Al^{3+}$  на 0,5 мл дозы, причём содержание  $Al^{3+}$  составляет по меньшей мере 0,4 мг  $Al^{3+}$  для серотипа 1, по меньшей мере 0,2 мг  $Al^{3+}$  для серотипа 2 и по меньшей мере 0,2 мг  $Al^{3+}$  для серотипа 3 штамма Сэбина.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный TRIS буфер используют в этапе (c) в концентрации от 30 до 60 мМоль, а указанный гидроксид алюминия используют на этапе (g) в качестве указанного адьюванта в концентрации от 2,0 до 2,5 мг на дозу двухвалентной вакцины, содержащей полиовирусные частицы штамма Сэбина серотипа 1 и серотипа 3.

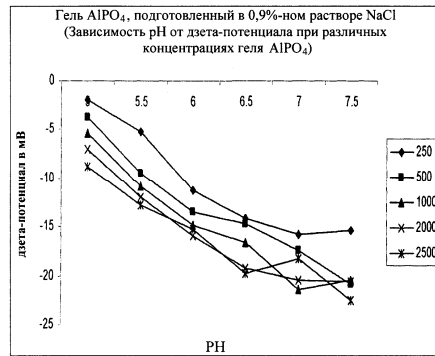
9. Полиовакцинная композиция, получаемая посредством способа по пп.1-8, предназначенная для введения с использованием режима введения однократной дозы или двукратной дозы, содержащая от 2,5 до 5 ДЕ полиовирусного штамма Сэбина серотипа 1, 8 до 16 ДЕ полиовирусного штамма Сэбина серотипа 2, и от 5 до 10 ДЕ полиовирусного штамма Сэбина серотипа 3 на дозу вакцины.

10. Полиовакцинная композиция по п.9, отличающаяся тем, что она содержит 5 ДЕ полиовируса серотипа 1, 16 ДЕ полиовируса серотипа 2 и 10 ДЕ полиовируса серотипа 3 на дозу вакцины.

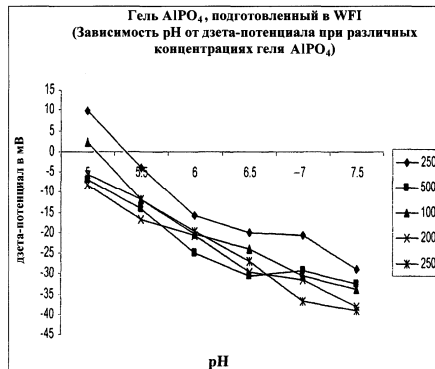
11. Полиовакцинная композиция по п.9, отличающаяся тем, что она содержит 2,5 ДЕ полиовируса серотипа 1, 8 ДЕ полиовируса серотипа 2 и 5 ДЕ полиовируса серотипа 3 на дозу вакцины.

12. Полиовакцинная композиция по п.9, отличающаяся тем, что она содержит 5 ДЕ полиовируса серотипа 1, 8 ДЕ полиовируса серотипа 2 и 10 ДЕ полиовируса серотипа 3 на дозу вакцины.

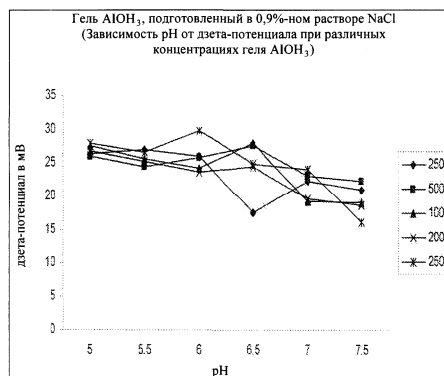
13. Полиовакцинная композиция по любому из пп.9-12, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит один или более антигенов из патогена, выбранного из группы, содержащей гемофильский грипп (*Haemophilus influenzae*) b, менингококк (*Neisseria Meningitidis*) типа А, менингококк типа С, менингококк типа W, менингококк типа X, менингококк типа Y, менингококк типа B, стрептококк пневмонии (*Streptococcus pneumoniae*), сальмонелла тифи (*Salmonella typhi*), гепатит А или гепатит В, дифтерийный токсин, столбнячный токсин, коклюшный антиген, или содержит цельноклеточную противокклюшную вакцину.



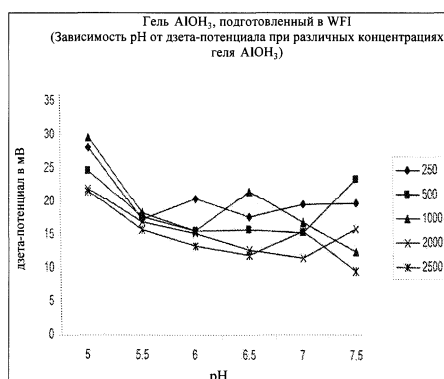
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

