

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043311**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.12**

**(21)** Номер заявки  
**202190778**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.10.04**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/13** (2006.01)  
**A61K 39/29** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩАЯ  
УМЕНЬШЕННУЮ ДОЗУ ИНАКТИВИРОВАННОГО ПОЛИОВИРУСА, И СПОСОБ ЕЁ  
ПОЛУЧЕНИЯ**

**(31)** 201821038850

**(32)** 2018.10.12

**(33)** IN

**(43)** 2021.08.05

**(86)** PCT/IN2019/050737

**(87)** WO 2020/075184 2020.04.16

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕРУМ ИНСТИТЮТ ОФ ИНДИЯ  
ПРАЙВАТ ЛТД (IN)**

**(72)** Изобретатель:  
**Шарма Индер Жит, Ракеш  
Кумар, Килвани Джаганатан  
Сембураккианна, Доддапанени  
Манохар, Шитоле Анил Вянкатрао  
(IN)**

**(74)** Представитель:  
**Вахнин А.М. (RU)**

**(56)** WO-A1-2017048038  
WO-A1-2010046934  
WO-A2-2012093406

MARTA C. NUNES ET AL.: "Review  
of a new fully liquid, hexavalent vaccine:  
Hexaxim", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL  
THERAPY, vol. 13, no. 4, 27 February  
2013 (2013-02-27), pages 575-593, XP055659272,  
ASHLEY, LONDON; GB ISSN: 1471-2598,  
DOI:10.1517/14712598.2013.774368, table 4

US-B1-6790445

US-A1-2004258700

BRICKLEY ELIZABETH B. ET AL.:  
"Maximising the impact of inactivated polio vaccines",  
LANCET INFECTIOUS DISEASES, ELSEVIER  
LTD, US, vol. 17, no. 7, 25 April 2017 (2017-04-25),  
pages 680-681, XP085118906, ISSN: 1473-3099,  
DOI:10.1016/S1473-3099(17)30236-0, page 680

WO-A1-2019016654

KUTUB MAHMOOD ET AL.: "Hexavalent  
IPV-based combination vaccines for public-sector  
markets of low-resource countries", HUMAN  
VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, vol.  
9, no. 9, 19 September 2013 (2013-09-19), pages  
1894-1902, XP055512954, US, ISSN: 2164-5515,  
DOI: 10.4161/hv.25407, the whole document

**(57)** изобретение относится к полностью жидкой иммуногенной композиции, содержащей комбинацию антигенов/иммуногенов. Данная иммуногенная композиция содержит оптимальное количество антигенов/иммуногенов для обеспечения защиты от ряда заболеваний. Композиция демонстрирует улучшенную иммуногенность и стабильность. Также настоящее изобретение относится к способу получения вакцинной композиции.

**043311 B1**

**043311 B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, более конкретно оно относится к способу получения композиции многодозовой комбинированной вакцины, содержащей группу антигенов/иммуногенов и консервант. Настоящее изобретение также относится к улучшенной методологии в области производства комбинированной вакцины.

### **Уровень техники**

Комбинированная вакцина, которая может обеспечить иммуногенность против большого количества заболеваний, всегда имеет преимущество перед моновалентной вакциной, поскольку она снижает количество вводимых инъекций, уменьшает осложнения, связанные с множественными внутримышечными инъекциями, снижает затраты на введение и производство, снижает затраты на хранение, снижает риск отложенной или пропущенной вакцинации и улучшает соблюдение пациентом режима вакцинации за счет сокращения количества отдельных вакцинаций. Кроме того, полностью жидкие препараты комбинированной вакцины имеют явные преимущества по сравнению с препаратами, требующими восстановления. Было установлено, что среднее время приготовления полностью жидкой вакцины составляет почти половину по сравнению с не полностью жидкой вакциной. Почти весь медицинский персонал (97,6%) заявили, что они предпочли бы использовать полностью жидкую вакцину в своей повседневной практике (см. Soubeyrand B. et al., Assessment of preparation time with fully-liquid versus non-fully liquid paediatric hexavalent vaccines. A time and motion study; Vaccine 2015; 33:3976-82).

Известные в настоящее время и доступные комбинированные вакцины могут не содержать подходящих составов соответствующих антигенов в соответствующих иммуногенных формах для достижения желаемых уровней безопасности, эффективности и иммуногенности в восприимчивой человеческой популяции для ряда заболеваний за одно введение. Количество различных комбинаций вакцин, которые могут быть созданы с помощью всего лишь нескольких дополнительных антигенов, является значительным. Добавляя от 1 до 4 других антигенных компонентов (например, Н1В (лиофилизированный или жидкий), НВВ, IPV, HAV) к DTwP или DTaP, можно получить 44 возможных различных комбинации вакцин. Это число увеличилось бы до тысяч, если рассматривать отдельные компоненты от разных производителей. Поскольку каждая отдельная новая комбинированная вакцина (с учетом различий в компонентах в зависимости от источника) должна разрабатываться отдельно для демонстрации безопасности, стабильности, совместимости и эффективности, разработка всех этих вакцин становится сложной задачей.

### **Антигены комбинированной вакцины**

#### **Антигены дифтерии и столбняка**

Дифтерия и столбняк представляют собой острые инфекции, вызываемые *Corynebacterium diphtheriae* и *Clostridium tetani* соответственно. В обоих случаях причиной клинического заболевания является мощный экзотоксин этих бактерий. Вакцины, обеспечивающие защиту от этих бактерий, содержат токсины, которые химически модифицированы с образованием анатоксинов, химически модифицированного токсина, который больше не токсичен, но по-прежнему является антигенным. Токсины дифтерии и столбняка продуцируются при выращивании *Corynebacterium diphtheriae* и *Clostridium tetani* в среде, содержащей бычий экстракт. Токсины инактивируются с использованием следующей обработки, которая включает в себя нагревание, воздействие УФ, формалина/формальдегида, глутаральдегида, ацетилэтиленимина и т.д. для получения анатоксинов [дифтерийный анатоксин (D) и столбнячный анатоксин (T)]. Опасения в отношении губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE), трансмиссивной губчатой энцефалопатии (TSE), болезни Крейтцфельда-Якоба (CJD и вариант CJD) могут возникать из-за того, что компоненты животного происхождения, используемые в питательной среде, содержащей бычий экстракт, распространяются через вакцину (см. WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products; 2003 & EMEA/CPMP/BWP/819/01; 24 April 2001).

#### **Антигены коклюша**

Введение в 1940-х гг. цельноклеточных вакцин, состоящих из организмов *Bordetella pertussis*, инактивированных химически и нагреванием, привело к резкому снижению заболеваемости коклюшем, вызываемым *B. pertussis*.

Цельноклеточные вакцины АКДС обычно связаны с несколькими местными побочными эффектами (например, эритемой, отеком и болью в месте инъекции), лихорадкой и другими легкими системными проявлениями (например, сонливостью, раздражительностью и анорексией) (см. Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. Paediatrics 1981; 68:650-60) и Long SS, DeForest A, Penridge Pediatric Associates, et al., Longitudinal study of adverse reactions following Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in infancy. Paediatrics 1990; 85:294-302). Более серьезные системные проявления (например, судороги {с лихорадкой или без нее} и гипотонические-гипореактивные эпизоды) встречаются реже (соотношение один случай на 1750 введенных доз) у детей, получавших цельноклеточную вакцину АКДС (см. Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. Paediatrics 1981; 68:650-60). Острая энцефалопатия встречается еще реже (соотношение 0-10,5 случаев на один миллион введенных доз). Эксперты согласны с тем, что

цельноклеточная коклюшная вакцина в некоторых редких случаях вызывает стойкое повреждение головного мозга (см. Institute of Medicine; DPT vaccine and chronic nervous system dysfunction, a new analysis; Washington D.C., National Academy Press, 1994).

Несколько отчетов, в которых упоминается взаимосвязь между цельноклеточной вакцинацией против коклюша, реактогенностью и серьезными побочными эффектами, привели к снижению приемлемости вакцины и, как следствие, к возобновлению эпидемий (Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H., and Brawson, N.S.B. (1981). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children: *Brit Med. J.* 282: 1595-1599).

Побочные реакции, связанные с цельноклеточными вакцинами против коклюша (wP), являются препятствием для их дальнейшего использования во всем мире, поэтому в промышленно развитых странах комбинированные вакцины на основе wP постепенно были заменены бесклеточными комбинированными вакцинами против коклюша.

Совсем недавно были разработаны вакцины против коклюша с определенными компонентами. Ранее сообщалось о полностью жидких шестивалентных бесклеточных вакцинах против коклюша (DTaP IPV PRP-T-HBsAg) (EP 1028750).

Infanrix® Hexa (GSK) в настоящее время является единственной доступной на мировом рынке гексавалентной комбинированной вакциной для детей, содержащей Salk IPV. Этот продукт (DTaP3-IPV-HBV//Hib) продается в виде шприца, предварительно заполненного пятивалентным продуктом, упакованного вместе с лиофилизированным конъюгатом антиген Hib PRP-T в отдельном флаконе для восстановления с остальной частью вакцины перед использованием.

Вторая гексавалентная вакцина, Hexyon® (также называемая Hexacima® и Hexaxim®), представляет собой полностью жидкую гексавалентную вакцину от Sanofi Pasteur; однако это также бесклеточная вакцина. Эта вакцина, вероятно, будет нацелена на частные рынки в Европе и во всем мире.

Компания Bharat Biotech International разрабатывает гептавалентную комбинированную вакцину, которая состоит из DT, бесклеточного коклюша, Sabin IPV (тип 1: 40 DU, тип 2: 8 DU, тип 3: 32 DU), одного штамма инактивированного ротавируса (штамм G9, т.е. Штамм 116E), конъюгата PRP Haemophilus influenza типа b с TT и рекомбинантной вакцины против гепатита B.

Однако возникают опасения по поводу долгосрочной эффективности бесклеточных (aP) коклюшных вакцин, особенно в условиях развивающихся стран. В недавних исследованиях делается предположение, что иммунитет к коклюшу ослабевает в подростковом возрасте, и что это является причиной увеличения случаев заболевания у младенцев в возрасте до шести месяцев, прежде чем они будут полностью вакцинированы. Эффективность вакцины оценивалась в 24% у детей в возрасте от 8 до 12 лет, иммунизированных в младенчестве aP вакциной. Обсервационное исследование, проведенное в Австралии, также выявило более высокие показатели заболеваемости среди подростков, которым в младенчестве вводили aP вакцину, по сравнению с теми, кто получал wP вакцину (относительный риск 3,3, 95-процентный доверительный интервал 2,4-4,5).

С точки зрения стоимости антигены aP исторически превышали стоимость антигенов wP в 10-30 раз из-за различий в производстве и стоимости лицензионных отчислений и, следовательно, это представляет собой экономическое бремя для развивающихся стран. В результате стоимость гексавалентных вакцин на основе wP лучше подходит для использования в государственном секторе стран с низким уровнем ресурсов.

Следовательно, использование цельноклеточных коклюшных вакцин (wP) в гексавалентных вакцинах, предназначенных для развивающихся стран, стало важным из-за стоимости и возникающих опасений по поводу долгосрочной эффективности aP вакцин, особенно в условиях развивающихся стран.

По сравнению с лучшими цельноклеточными коклюшными вакцинами (wP) aP вакцины не так эффективны в программах массовой иммунизации (Vickers et al., 2006; Cherry 2012).

Недавние исследования вспышек среди высокоиммунизированных групп населения показали, что продолжительность защиты aP вакцин слишком коротка (Klein et al., 2012; Misegades et al., 2012), что приводит к снижению иммунитета у детей старшего возраста и подростков и, соответственно, к росту числа случаев заболевания в этой возрастной группе (Skowronski et al., 2002; Klein et al., 2012). Это резко отличает aP вакцины от wP вакцин, которые обеспечивают защиту даже в подростковом возрасте (Klein et al., 2012). В результате этих недостатков в странах, которые перешли на aP вакцину в 1990-х годах, у нас теперь есть поколение детей, которые не только хуже защищены от коклюша, но также могут быть менее восприимчивы к бустерной иммунизации, поскольку вакцина, которой ребенок был примирован, может определять его иммунный ответ на более позднюю бустерную вакцинацию (Podda et al., 1995; Mascart et al., 2007; Sheridan et al., 2012; Liko, Robison and Cieslak 2013; Smits et al., 2013).

Одним из наиболее важных факторов, влияющих на реактогенность wP, является присутствие липополисахарида (LOS), эндотоксина внешней мембраны бактерий.

Инактивация токсинов в wP вакцинах может осуществляться различными методами, но в конечном продукте не должно обнаруживаться активного термолабильного токсина. В массовом процессе изготовления цельноклеточной коклюшной вакцины (wP) для инактивации токсинов wP многими производителе-

лями применяется термическая обработка/обработка формалином. В нескольких сообщениях упоминается использование тимеросала для инактивации wP. Однако использование тимеросала вызывает потерю антигенности IPV (Vaccine 1994 Volume 12, No. 9 851- 856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine), и поэтому в случае комбинированной вакцины, содержащей IPV, может возникнуть необходимость в том, чтобы для сохранения своей эффективности с течением времени IPV находился в отдельной ампуле от ампулы с wP, содержащей тимеросал, или изменение способа общей исходной инактивации возбудителя коклюша. Некоторые антигены, например, активный РТ, также могут служить модификаторами иммунного ответа, и наблюдались значительные различия в иммунных ответах на различные антигены между разными вакцинами (ВОЗ, 1993).

Химическая экстракция LOS привела к значительному снижению содержания эндотоксина (20%) и резкому снижению токсичности, связанной с эндотоксинами (до 97%), в зависимости от используемого теста *in vitro* или *in vivo*. Экстракция LOS не повлияла на целостность продукта и, что более важно, не повлияла на эффективность и/или стабильность ДТР. Более того, почти не наблюдались различия в анти-телном и Т-клеточном ответах (см. Waldely Oliveira Dias et al., An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin; Human Vaccines & Immunotherapeutics 9:2, 339-348; February 2012).

### **Антигены гепатита В**

Существуют различные штаммы вируса гепатита. Гепатит В представляет собой заболевание, вызываемое вирусом гепатита В (HepВ), который поражает печень человека и вызывает воспаление, называемое гепатитом. Вакцина против этого заболевания содержит один из белков оболочки вируса, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg). В настоящее время доступны вакцины, которые использовались для массовой иммунизации, например, продукт Recombivax HB® и Comvax® от Merck, Engerix-B® и Pediarix® от Glaxo SmithKline Biologicals. Комбинированная вакцина, содержащая компонент гепатита В, была связана как с более высокой эффективностью, так и с более высокой комплаентностью по сравнению с одноантигенной вакциной HepВ (см. Kurosky et al., Effect of Combination Vaccines on Hepatitis B Vaccine Compliance in Children in the United States; The Pediatric Infectious Disease Journal. 36(7):e189-e196, JUL 2017). В нескольких источниках упоминается адсорбция поверхностного антигена гепатита В на фосфате алюминия в сочетании с другими антигенами. Нехавас® представляет собой комбинированную вакцину, которая была отозвана с рынка из-за низкой иммуногенности компонента гепатита В. Следовательно, существует потребность в композиции комбинированной вакцины, содержащей антиген гепатита В с адекватной или повышенной иммуногенностью.

### **Антигены Haemophilus influenzae (Hib)**

Haemophilus influenzae представляет собой грамотрицательную коккобациллу, которая является нормальной частью флоры верхних дыхательных путей. Haemophilus influenzae типа b (Hib b) является основной причиной инвазивных инфекций, передаваемых через кровь, у детей младшего возраста и основной причиной менингита в первые два года жизни. Иммунизация против Haemophilus influenzae началась в Канаде в 1987 г. с полисахаридной вакцины [полирибозерибитолфосфат (PRP)]-Полирибозилирибитолфосфат (PRP) капсулы Hib является основным фактором вирулентности для организма. Антитела к PRP вносят основной вклад в бактерицидную активность сыворотки, а повышение уровня антител связано со снижением риска инвазивного заболевания. PRP является Т-клеточно-независимым антигеном и, следовательно, характеризуется:

- a) индукцией слабого антительного ответа у младенцев и детей в возрасте до 18 месяцев,
- b) вариabельным и количественно меньшим антительным ответом, чем у Т-клеточно-зависимого антигенов,
- c) выработкой более высокой доли иммуноглобулина М (IgM) и
- d) неспособностью вызвать бустерный ответ.

Первоначальные вакцины, основанные только на компоненте PRP, оказались неэффективными у младенцев. Дальнейшие усилия были направлены на создание конъюгированной вакцины PRP, в которой PRP конъюгирован с белками, называемыми белками-носителями, такими как белок внешней мембраны *Neisseria meningitidis*, дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин и CRM 197. Включение компонентов Hib-конъюгата в комбинированные вакцины было связано со снижением иммуногенности Hib. Кроме того, Hib-конъюгаты нестабильны в водной среде и не могут выдержать длительного хранения в этой форме. Следовательно, полисахарид PRP *Haemophilus influenzae b* (Hib) часто готовят в виде сухого твердого вещества, которое перед введением восстанавливают жидким составом других антигенов. Например, в Infanrix® hexa (WO 99/48525).

### **Антиген полиомиелита**

Доступны разные виды вакцины:

Живая аттенуированная (ослабленная) пероральная вакцина против полиомиелита (OPV), разработанная доктором Альбертом Сабином в 1961 г. OPV, содержащая штаммы Sabin, вводится перорально.

Инактивированная (убитая) вакцина против полиомиелита (IPV), разработанная в 1955 г. доктором Йонасом Солком. IPV, содержащий штаммы Salk, вводится в виде инъекции.

Недавно инактивированный полиовирус Sabin, который был получен путём инактивации полиови-

руса штаммов Sabin формалином, был создан для инъекций, а также он стал доступен в коммерческих продуктах.

Как живые аттенуированные (OPV), так и инактивированные (IPV) вакцины против полиомиелита оказались эффективными в борьбе с полиомиелитом во всем мире. Вакцина против полиомиелита может содержать штаммы Salk или Sabin.

В 1955 г. доктору Джонасу Солку удалось инактивировать полиовирус дикого типа, что позволило использовать его в лекарственной форме инъекционного типа, и он назвал его штаммом Salk, который включает тип 1 Mahoney, тип 2 MEF и тип 3 Saukett, которые использовались в вакцине против полиомиелита. Штаммы Sabin включают в себя штаммы Sabin 1 и Sabin 2.

Приемлемая в настоящее время стандартная доза полиовакцины (вакцин) содержит 40 единиц антигена D инактивированного полиовируса типа 1 (Mahoney), 8 единиц антигена D инактивированного полиовируса типа 2 (MEF-I) и 32 единицы антигена D инактивированного полиовируса типа 3 (Saukett) например Infanrix-hexa® (WO 99/48525).

IPV в настоящее время доступна либо в виде отдельного препарата без адъюванта, либо в различных комбинациях, включая вакцины DT-IPV (с дифтерийным и столбнячным анатоксинами) и шестивалентные вакцины IPV (дополнительно с коклюшем, гепатитом B, Haemophilus influenzae b и адъювантом), например Infanrix® hexa (WO 99/48525).

Однако по сравнению с OPV общая стоимость производства IPV значительно выше. Это в основном связано со следующими причинами:

- (i) необходимость большего количества вируса на дозу;
- (ii) необходимость дополнительной последующей обработки (т.е. концентрация, очистка и инаktivация) и связанное с этим QC-тестирование;
- (iii) потеря антигена или плохое извлечение при последующей обработке и
- iv) сдерживание.

До сих пор финансовые проблемы были основным препятствием для инноваций и внедрения IPV в странах с низким и средним уровнем доходов.

В будущем глобальный спрос на IPV после ликвидации полиовирусов может увеличиться с нынешнего уровня в 80 млн доз до 450 млн доз в год. Следовательно, вероятно, потребуются подходы к "растягиванию" поставок IPV.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что уменьшенная доза IPV обеспечивает не меньшую/эквивалентную защиту от полиомиелита по сравнению со стандартной дозой антигена IPV. Эффективные вакцинные композиции с уменьшенными дозами, которые обеспечивают защиту от инфекции с использованием более низкой дозы антигена IPV, желательны в ситуациях, когда поставки традиционной вакцины недостаточны для удовлетворения глобальных потребностей или когда стоимость производства традиционной вакцины не позволяет вакцине продаваться по цене, доступной для развивающихся стран. Также воздействие более низкой дозы IPV, по сравнению с существующими продаваемыми на рынке композициями, может быть более безопасным. Таким образом, необходимо оценить различные стратегии, позволяющие сделать IPV доступной по более доступным ценам. Следовательно, комбинированная вакцина, содержащая уменьшенную дозу IPV, может сделать ее ещё более дешевой и простой в применении.

В случае вакцин против пандемического гриппа использование адъювантов позволило снизить дозу, повысить доступность и снизить стоимость вакцины. Поэтому было высказано предположение, что состав вакцины IPV с адъювантом снизит стоимость, а также увеличит количество доступных доз IPV во всем мире.

Кроме того, соли алюминия, считающиеся безопасными и уже используемые в комбинированных вакцинах, содержащих IPV, имеют наименьшие препятствия для разработки и недороги в производстве. Однако известно, что алюминиевые адъюванты не позволяют значительно снизить дозу.

Кроме того, цельноклеточный коклюшный антиген, присутствующий в гексавалентной вакцине, оказался сильным иммуностимулятором. Из-за иммуностимулирующего эффекта адъюванта фосфата алюминия и цельноклеточной коклюшной вакцины авторы настоящего изобретения предполагают получить хороший иммунный ответ при снижении дозы IPV.

#### Другие антигены

К другим антигенам, которые могут быть включены в комбинированную вакцину, относятся Haemophilus influenzae (серотипы a, c, d, e, f и неинкапсулированные штаммы), гепатит (штаммы A, C, D, E, F и G), Neisseria meningitis A, B, C, W, X, Y, грипп, пневмококки, стрептококки, сибирская язва, денге, малярия, корь, эпидемический паротит, краснуха, БЦЖ, японский энцефалит, ротавирус, оспа, желтая лихорадка, брюшной тиф, опоясывающий лишай, вирус ветряной оспы и другие.

Диапазон и тип антигенов, используемых в комбинированной вакцине, зависят от возраста целевой группы населения, такого как младенцы, дети до трех лет, дети, подростки и взрослые. Известна самая ранняя известная комбинированная вакцина, которая может предотвращать заражение Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium Diphtheriae и, возможно, инактивированным полиовирусом

(IPV), и/или вирусом гепатита В, и/или инфекцией *Haemophilus influenzae* типа В (см., например, WO 93/24148, WO 97/00697, WO 2000/030678, WO 2008/028956, US 6013264 и WO 2005089794).

Однако хорошо задокументированный феномен антигенной конкуренции усложнил и затруднил разработку поливалентных вакцин. Этот феномен относится к наблюдению, что введение нескольких антигенов вместе часто приводит к снижению ответа на определенные антигены по сравнению с иммунным ответом на эти антигены при раздельном введении.

Между тем, многодозовая вакцина должна содержать консервант, чтобы избежать заражения вредными микроорганизмами. Для вакцин, экспортируемых в менее развитые страны, предпочтительны многодозовые вакцины, содержащие консервант, с учетом условий в странах, где будут использоваться эти вакцины, методов распространения и т.д. Примеры используемых консервантов включают в себя бензетония хлорид (фемерол), тиомерсал, фенол, формальдегид и 2-феноксиэтанол (2-РЕ), известные в данной области техники. Консерванты, подходящие для вакцин, должны быть экологически безопасными, эффективными против бактерий, дрожжей и других грибов и не должны отрицательно влиять на иммунный эффект вакцины.

Тиомерсал представляет собой производное этилртути, которое широко используется во многих вакцинах в качестве консерванта. Тиомерсал известен тем, что предотвращает рост контаминирующих микроорганизмов и поддерживает стерильные условия во время хранения или использования вакцин, и многие комбинированные вакцины, прошедшие преквалификацию ВОЗ (PQ), содержат тиомерсал в качестве консерванта. Однако имеются сообщения об определенных аллергических реакциях (примерно у 16% населения) на тиомерсал, в основном в виде местных реакций гиперчувствительности замедленного типа, включая покраснение и отек в месте инъекции.

Кроме того, в инактивированной вакцине против полиомиелита в качестве консерванта вместо тиомерсала обычно используется 2-РЕ поскольку известно, что использование тиомерсала в качестве консерванта в инактивированной вакцине против полиомиелита снижает эффективность вакцины на 50% или более в течение недели, даже при хранении в холодильнике. (Vaccine 1994 Volume 12 No.9 851 - 856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine).

В комбинированных вакцинах (включая D, T, wP, Hib, HBsAg и IPV) также используется 2-РЕ в концентрации 5 мг/мл (WO 2010046934, WO 2008020322 и WO 2012093406).

Однако было обнаружено, что 2-РЕ имеет более слабую антимикробную активность, чем тиомерсал, против дрожжей и грибов в комбинированной вакцине на основе DPT при температуре 2-8°C. Повышение консервирующей эффективности комбинированной вакцины путём увеличения количества 2-РЕ для соответствия требуемым критериям является одним из возможных вариантов. Однако повышение концентрации 2-РЕ может вызвать проблемы с безопасностью у маленьких детей, которым будут вводиться комбинированные вакцины, и тем самым привести к нормативным препятствиям для утверждения такой вакцины (вакцин).

Следовательно, было бы выгодно улучшить консервирующую эффективность комбинированной вакцины путём комбинирования 2-РЕ по меньшей мере с одним другим консервантом, который отвечает критериям безопасности и нормативным требованиям. Примеры консервантов, отличных от 2-РЕ, которые могут быть использованы, включают в себя бензетония хлорид (фемерол), сложные эфиры парабена, фенол, формальдегид, известные в данной области техники.

Было обнаружено, что метил- и пропилпарабены, бензиловый спирт прошли антимикробные испытания в соответствии с USP, BP и EP. Кроме того, эти консерванты нетоксичны, но эффективны. Токсичность парабенов относительно невысока из-за легкости и скорости, с которой организм избавляется от этих препаратов. LD<sub>50</sub> метилпарабена у мышей при внутрибрюшинном введении составляет 1 г/кг. Смесь метил- и пропилпарабенов никогда не использовалась в коммерческих вакцинах.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что консервирующая эффективность смеси 2-феноксиэтанола и сложных эфиров парабенов (например, метил-, пропилпарабенов) относительно более эффективна по сравнению с одним 2-феноксиэтанолом.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что иммуногенность, реактогенность, стабильность и поддержание правильной формы антигенов в композиции комбинированной вакцины зависят от способа составления композиции, которая включает в себя:

- a) процесс получения индивидуальных антигенов;
- b) последовательность добавления антигенов;
- c) использование определенных адъювантов в определенном количестве для определенных антигенов;
- d) индивидуальную адсорбцию или комбинированную адсорбцию антигенов на адъювантах, где комбинированная адсорбция имеет свои преимущества с точки зрения простоты процесса, а к недостаткам относится то, что первые предварительно адсорбированные антигены могут десорбироваться частично или полностью во время добавления последующих антигенов. Антигены, добавленные на последнем этапе, могут не адсорбироваться полностью, поскольку предыдущие антигены могут привести к насыщению адсорбционной способности. Слабо адсорбированные антигены могут десорбироваться при хранении;

- е) степень адсорбции антигена на адьювантах;
- ф) использование минимальной концентрации квасцов;
- г) использование оптимальной концентрации и типа консерванта;
- h) использование различных параметров, включая перемешивание, температуру и рН.

#### **Задачи изобретения**

Некоторые из задач настоящего изобретения, которым удовлетворяет по меньшей мере один вариант осуществления, являются следующими:

Задачей настоящего изобретения является решение одной или нескольких проблем предшествующего уровня техники или, по меньшей мере, предоставление полезной альтернативы.

Другой задачей настоящего изобретения является создание полностью жидкой комбинированной вакцины, подходящей для предотвращения и профилактики инфекций, вызванных дифтерией, столбняком, коклюшем, полиомиелитом, *Haemophilus influenzae* и гепатитом В, или для предотвращения, облегчения или отсрочки появления или прогрессирования их клинические проявления.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является создание полностью жидкой комбинированной вакцины, содержащей различные антигены инактивированного полиовируса (IPV) в уменьшенных дозах, которая демонстрирует не меньшую/эквивалентную защиту от полиомиелита по сравнению со стандартной дозой антигена IPV.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является создание полностью жидкой комбинированной вакцины, содержащей по меньшей мере один парабен, то есть метил- или пропилпарабеновый консервант и 2-феноксизтанол (2-PE), для улучшения консервирующей эффективности многодозовой комбинированной вакцины.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является разработка улучшенного способа получения такой композиции/рецептуры комбинированной вакцины, где вакцина демонстрирует улучшенную иммуногенность, сниженную реактогенность, улучшенную стабильность и, кроме того, отвечает критерию серопротекции для каждого из указанных иммуногенных компонентов.

Другие задачи и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными из следующего описания, которое не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения.

#### **Сущность изобретения**

Композиция комбинированной вакцины, содержащая уменьшенную дозу антигена инактивированного полиовируса (IPV) в комбинации с другими антигенами/иммуногенами и по меньшей мере один сложный эфир парабена, то есть метил- или пропилпарабен и 2-феноксизтанол (2-PE), используемые в качестве консерванта, где консервирующая эффективность многодозовой комбинированной вакцины улучшена, и способ ее получения.

Настоящее изобретение относится к композиции комбинированной вакцины, содержащей:

а) Высокоочищенные дифтерийный анатоксин (D) и столбнячный анатоксин (T), полученные с использованием полусинтетической среды, впоследствии детоксифицированные и индивидуально адсорбированные на адьюванте фосфат алюминия, что приводит к усилению иммуногенности.

б) Инактивированный цельноклеточный компонент *B. pertussis* (wP), полученный с использованием комбинации тепловой и химической инактивации, специфических штаммов *Bordetella pertussis* в определенном соотношении, что приводит к пониженной реактогенности и повышению эффективности.

с) Капсульный полисахаридный антиген (PRP) *Haemophilus influenzae* типа b (Hib), конъюгированный с белком-носителем (CP)

д) Уменьшенную дозу IPV (инактивированного полиовируса) Salk или Sabin, демонстрирующую сравнимую эффективность по сравнению со стандартной дозой, полученную с использованием улучшенных методов инактивации формальдегидом и, при необходимости, адсорбции на адьюванте фосфат алюминия.

е) Поверхностный антиген гепатита В (HepB) индивидуально адсорбированный на адьюванте фосфат алюминия, что приводит к усилению иммуногенности.

ф) Минимальное количество квасцов, что обеспечивает пониженную реактогенность.

г) По меньшей мере один сложный эфир парабена, то есть метил- или пропилпарабен, отличный от 2-феноксизтанола (2-PE), в качестве консерванта.

#### **Подробное описание изобретения**

Хотя настоящее изобретение может быть реализовано различными вариантами осуществления, определенные варианты осуществления изобретения приводятся в следующем подробном обсуждении с пониманием того, что настоящее обсуждение может рассматриваться как пример принципов изобретения и не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения до того, что проиллюстрировано и раскрыто в этом описании. Варианты осуществления изобретения предоставлены для того, чтобы всесторонне и полностью передать объем настоящего изобретения специалисту в данной области техники. Раскрыты многочисленные детали, относящиеся к конкретным компонентам и способам, чтобы обеспечить полное понимание вариантов осуществления настоящего изобретения. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что детали, представленные в вариантах осуществления изобретения, не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах

осуществления изобретения хорошо известная композиция, хорошо известные способы и хорошо известные методики подробно не описываются.

Терминология, используемая в настоящем изобретении, предназначена только для цели объяснения конкретного варианта его осуществления, и такая терминология не должна рассматриваться как ограничивающая объем настоящего изобретения. Используемые в настоящем изобретении формы единственного числа могут также включать в себя формы множественного числа, если контекст явно не предполагает иное.

Термины "первый", "второй", "третий" и т.д. не следует рассматривать как ограничивающие объема настоящего изобретения, поскольку вышеупомянутые термины могут использоваться только для различения одного элемента, компонента, области, слоя или раздела от другого компонента, области, слоя или раздела. Такие термины, как "первый", "второй", "третий" и т.д., когда они используются здесь, не подразумевают конкретную последовательность или порядок, если это явно не указано в настоящем изобретении. Настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции и способу ее получения.

Термин "вакцина" необязательно может быть заменен термином "иммуногенная композиция" и наоборот.

"Единицы D-антигена" (также называемые "международными единицами" или МЕ):

Антигенная форма D полиовируса индуцирует защитные нейтрализующие антитела. Упомянутые здесь единицы D-антигена (например, в вакцинах настоящего изобретения) представляют собой измеренные общие единицы D-антигена каждого неадсорбированного типа антигена IPV в общей массе до составления окончательной вакцины, которые добавляются в каждую дозу составленной вакцины для человека (обычно 0,5 конечный объем мл). Надежные методы измерения единиц D-антигена хорошо известны в данной области техники и опубликованы, например, Европейской фармакопеей. Например, единицы D-антигена можно измерить с помощью теста ИФА, как описано ниже в примере 1 ("Количественная оценка D-антигена с помощью ИФА"). Европейская фармакопея предоставляет тестовый образец (биологический эталонный препарат Европейской фармакопеи, доступный в секретариате Европейской фармакопеи, например, под кодом Р 2160000) для стандартизации таких методов между производителями (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-2). Таким образом, величина единицы D-антигена хорошо известна в данной области техники.

Используемый здесь термин "доза" обычно означает одно введение вакцины настоящего изобретения, которое обычно представляет собой одну инъекцию. Типичная доза для человека составляет 0,5 мл. Конечно, в схему введения вакцины можно включать различные дозы.

Используемый здесь термин "IPV" или иммуногенная композиция, содержащая эти компоненты, предназначен для обозначения инактивированного полиовируса типа 1 (например, Mahoney, который предпочтительно используется), типа 2 (например, MEF-1) или типа 3 (например, Saukett), или серотипов Sabin 1, 2, 3 - комбинации двух или всех трех из этих типов. Примером полной (или стандартной) дозы (40-8-32 единиц D-антигена IPV на основе Salk типов 1, 2 и 3 соответственно) иммуногенной композиции IPV для целей настоящего изобретения может служить Poliovac® (Serum Institute of India Pvt. Ltd.). Таким образом, если здесь указано, что в иммуногенной композиции настоящего изобретения имеет место одно-, двух-, трехкратное уменьшение дозы (снижение) по сравнению со стандартной дозой IPV на основе Salk, то это означает, что в каждой дозе указанной вакцины содержатся единицы D-антигена, приравненные к X% уменьшения дозы 40, 8 и/или 32 единицы D-антигена типов 1, 2 и/или 3 IPV соответственно (при измерении для каждого типа антигена IPV в общей массе).

Используемый здесь термин "сахарид" может обозначать полисахарид или олигосахарид и включает в себя оба этих типа сахаридов. Капсульный сахаридный антиген может представлять собой полно-размерный полисахарид или может представлять собой бактериальные "сахариды определенного размера" и "олигосахариды" (которые, естественно, имеют небольшое количество повторяющихся единиц, или которые представляют собой полисахариды, уменьшенные по размеру для удобства манипуляций с ними, но все же способные вызывать защитный иммунный ответ у хозяина).

В соответствии с первым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция комбинированной вакцины включает в себя группу антигенов/иммуногенов, выбранных из, но без ограничений, дифтерийного анатоксина (D), столбнячного анатоксина (Т), цельноклеточного B. pertussis (wP), Haemophilus influenzae типа b (Hib), конъюгата PRP-CP, гепатита В (HepB), уменьшенной дозы инактивированного полиовируса (IPV), и дополнительно содержит комбинацию 2-феноксизанола и по меньшей мере одного консерванта на основе сложного эфира парабена.

В соответствии со вторым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция комбинированной вакцины может дополнительно содержать один или несколько антигенов, выбранных из группы, состоящей из, но без ограничений, антигенов Haemophilus influenzae (серотипы a, c, d, e, f и неинкапсулированные штаммы), гепатита (штаммы A, C, D, E, F и G), Neisseria meningitidis A, B, C, Y, W-135 или X, гриппа, золотистого стафилококка, антигена(ов) Salmonella typhi, бесклеточного антигена коклюша, модифицированной аденилатциклазы, малярийного антигена (RTS, S), антигенов пневмококков, стрептококков, сибирской язвы, денге, малярии, кори, эпидемического паротита, краснухи, БЦЖ, вируса папилломы человека, японского энцефалита, денге, лихорадки Зика, Эболы, чикунгуньи, ротавируса,

оспы, желтой лихорадки, флавивируса, опоясывающего лишая, вируса ветряной оспы соответственно.

В соответствии с третьим вариантом осуществления настоящего изобретения штаммы IPV, используемые в композиции комбинированной вакцины, включают в себя инаktivированные штаммы Sabin, выбранные из группы типа 1, типа 2 и типа 3, или инаktivированные штаммы Salk, выбранные из группы типа 1 Mahoney, типа 2 MEF и типа 3 Saukett.

В одном из аспектов третьего варианта осуществления изобретения полиовирус можно выращивать следующим способом:

Клеточная линия CCL81-VERO (почки обезьяны) используется в качестве клеток-хозяев для выращивания полиовирусов полиомиелита, то есть штаммов Sabin и Salk.

После инфицирования клеток-хозяев желаемым штаммом полиовируса и инкубации в течение 72 ч среду, содержащую вирус и остатки клеток, объединяют и собирают в один контейнер.

Фильтрат подвергают тангенциальной поточной фильтрации с кассетой на 100 кДа; диафильтруют с использованием фосфатного буфера и очищают с помощью анионообменной хроматографии.

Перед введением пациентам вирусы должны быть инаktivированы соответствующими методами инаktivации.

Однако авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что высокая процентная потеря D-антигена после инаktivации формальдегидом может быть связана с присутствием фосфатного буфера, который неожиданно вызывает нежелательную агрегацию частиц полиовируса.

Следовательно, важным аспектом настоящего изобретения является улучшенный способ инаktivации формалином, включающий в себя следующие этапы:

- a) очищенный пул вируса подвергают замене буфера с фосфатного буфера на трис-буфер в диапазоне (от 30 до 50 mM) с pH от 7 до 7,5;
- b) к указанной выше смеси добавляют среду M-199, содержащую глицин (5 г/л);
- c) добавляют 0,025% формальдегида и затем перемешивают;
- d) затем смесь инкубируют при температуре 37°C в течение 5-13 суток при непрерывном перемешивании массы вируса на магнитной мешалке;
- e) смесь после инкубации подвергают промежуточной тангенциальной поточной фильтрации (100 кДа, 0,1 м<sup>2</sup>) на 7 сутки и окончательной фильтрации после инаktivации;
- f) затем отфильтрованный объем хранят при температуре 2-8°C;
- g) проводят ИФА D-Ag для определения единиц D-антигена.

В соответствии с четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения штаммы IPV, используемые в композиции комбинированной вакцины, включают в себя уменьшенную дозу инаktivированных штаммов Sabin, выбранных из группы типа 1, типа 2 и типа 3, или инаktivированных штаммов Salk, выбранных из группы типа 1 Mahoney, типа 2 MEF и типа 3 Saukett.

В соответствии с пятым вариантом осуществления настоящего изобретения IPV (штаммы Sabin или Salk) не может адсорбироваться индивидуально на каком-либо адьюванте и впоследствии добавляться к конечной композиции комбинированной вакцины.

В соответствии с предпочтительным аспектом пятого варианта осуществления изобретения IPV (штаммы Sabin или Salk) может адсорбироваться на адьюванте, более предпочтительно алюминиевой соли в форме фосфата или гидроксида алюминия, присутствующей в комбинированной вакцине, где процент адсорбции антигена IPV для IPV типа 1 может находиться в диапазоне 10-30%, IPV типа 2 может находиться в диапазоне 60-100%, а IPV типа 3 может находиться в диапазоне 0-25%.

В соответствии с шестым вариантом осуществления настоящего изобретения компонент(ы) IPV (штаммы Sabin или Salk) может быть индивидуально адсорбирован на адьюванте, выбранном из группы, состоящей из соли алюминия (Al<sup>3+</sup>), такой как гидроксид алюминия (Al(OH)<sub>3</sub>) или фосфат алюминия (AlPO<sub>4</sub>), квасцы, фосфата кальция, MPLA, 3D-MPL, QS21, CpG-содержащего олигонуклеотидного адьюванта, липосомы или эмульсии типа масло в воде или их комбинации (например, до или после смешивания с другими компонентами, если они есть). В случае адсорбции один или несколько компонентов IPV могут адсорбироваться отдельно или вместе в виде смеси на гидроксиде алюминия (Al(OH)<sub>3</sub>) или фосфате алюминия.

Компонент(ы) IPV (штаммы Sabin или Salk) может быть адсорбирован на соли алюминия с помощью следующей процедуры:

Взятие желаемого объема автоклавированного Al(PO)<sub>4</sub> или Al(OH)<sub>3</sub> для получения конечной концентрации квасцов (Al<sup>3+</sup>) от 0,1 до 0,8 мг на дозу в контейнере на 50 мл.

Добавление общей массы IPV с определенным количеством единиц D-антигена и доведение объема разбавителем (10×M-199 + 0,5% глицин),

Доведение значения pH конечной композиции и получение конечной композиции с pH от 6 до 7,5.

В одном из аспектов шестого варианта осуществления изобретения адсорбция IPV, инаktivированного формалином, может осуществляться на квасцах (Al<sup>3+</sup>) с концентрацией, выбранной из 0,1 мг на дозу, 0,2 мг на дозу, 0,3 мг на дозу, 0,4 мг на дозу, 0,5 мг на дозу, 0,6 мг на дозу, 0,7 мг на дозу и 0,8 мг на дозу, предпочтительно от 0,1 мг на дозу до 1,25 мг на дозу для каждого серотипа и при значении pH, выбранном из 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 и 6,8, предпочтительно 6,5.

В ещё одном аспекте шестого варианта осуществления изобретения процент восстановления D-антигена после инактивации формалином в присутствии Триса может составлять 50, 60, 70 или 80%, а процент адсорбции после адсорбции на фосфате алюминия может составлять от 70 до 80%, от 80 до 90% или от 90 до 99% или от 95 до 99%.

В соответствии с седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения дифтерийный токсин (экзотоксин) и столбнячный токсин (экзотоксин) были получены из *Corynebacterium diphtheriae* и *Clostridium tetani* соответственно и впоследствии детоксифицированы с использованием подходящего метода инактивации. Полученные таким образом дифтерийный анатоксин (D) и столбнячный анатоксин (T) можно очистить с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Полученный таким образом очищенный DT в дальнейшем использовали для приготовления комбинированной вакцины.

В одном из аспектов седьмого варианта осуществления изобретения дифтерийный токсин получают путём выращивания *Corynebacterium diphtheriae* в полусинтетической среде, состоящей из следующих ингредиентов в оптимальных концентрациях в любой из следующих комбинаций:

Комбинация 1:

Гидролизат казеина, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, сульфат магния, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, сульфат меди, сульфат цинка, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлористого кальция, дигидроортофосфат калия, гидрофосфат дикалия, сульфат железа и вода для инъекций.

Комбинация 2:

Гидролизат казеина, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, сульфат магния, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлористого кальция, дигидроортофосфат калия, гидрофосфат дикалия, сульфат железа и вода для инъекций.

Комбинация 3:

Гидролизат казеина, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, сульфат меди, сульфат цинка, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлористого кальция, дигидроортофосфат калия, гидрофосфат дикалия и вода для инъекций.

Комбинация 4:

Дрожжевой экстракт, моногидрат мальтозы, ледяная уксусная кислота, лактат натрия, сульфат магния, β-аланин, пимелиновая кислота, никотиновая кислота, сульфат меди, сульфат цинка, хлорид марганца, L-цистин, дигидрат хлористого кальция, дигидроортофосфат калия, гидрофосфат дикалия, сульфат железа и вода для инъекций.

В соответствии со вторым аспектом седьмого варианта осуществления изобретения столбнячный токсин получают путём выращивания *Clostridium tetanus* в полусинтетической среде, состоящей из следующих ингредиентов в оптимальных концентрациях в любой из следующих комбинаций:

Комбинация 1:

Гидролизат казеина, хлорид кальция, гидрофосфат дикалия, безводная декстроза, хлорид натрия, сульфат магния, рибофлавин, гидрохлорид тиамин, гидрохлорид пиридоксина, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина B12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и вода для инъекций.

Комбинация 2:

Гидролизат казеина, хлорид кальция, β-аланин гидрофосфат дикалия, безводная декстроза, хлорид натрия, сульфат магния, сульфат железа, рибофлавин, гидрохлорид тиамин, гидрохлорид пиридоксина, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина B12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и вода для инъекций.

Комбинация 3:

Гидролизат казеина, хлорид кальция, гидрофосфат дикалия, безводная декстроза, хлорид натрия, сульфат цинка, рибофлавин, гидрохлорид тиамин, гидрохлорид пиридоксина, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина B12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и вода для инъекций.

Комбинация 4:

Гидролизат казеина, хлорид кальция, гидрофосфат дикалия, безводная декстроза, хлорид натрия, сульфат магния, хлорид марганца, рибофлавин, гидрохлорид тиамин, гидрохлорид пиридоксина, пантотенат кальция, никотиновая кислота, L-цистин, хлорид железа, раствор витамина B12, биотин, конц. HCl, NaOH, абсолютный этанол и вода для инъекций.

В ещё одном аспекте седьмого варианта осуществления изобретения дифтерийный и столбнячный токсин детоксифицировали с использованием одного или комбинации следующих способов инактивации, которые включают в себя нагревание, обработку УФ, формалином/формальдегидом, ацетилэтиленимином и т.д.

В соответствии с восьмым вариантом осуществления настоящего изобретения антиген гепатита (Нер), используемый в композиции комбинированной вакцины, включает в себя антигены гепатита, полученные с поверхности штамма гепатита В (HBsAg).

В одном из аспектов девятого варианта осуществления изобретения HBsAg может быть получен одним из следующих способов:

Путём очистки антигена в форме частиц из плазмы носителей хронического гепатита В, так как большие количества HBsAg синтезируются в печени и попадают в кровоток во время инфекции HBV.

Путём экспрессии белка при помощи методов рекомбинантной ДНК.

В соответствии с девятым вариантом осуществления настоящего изобретения дифтерийный анатоксин (D), столбнячный анатоксин (T), поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) индивидуально адсорбируются на адъюванте, выбранном из группы, состоящей из соли алюминия ( $Al^{3+}$ ), такой как гидроксид алюминия ( $Al(OH)_3$ ) или фосфат алюминия ( $AlPO_4$ ), квасцы, фосфата кальция, MPLA, 3D-MPL, QS21, CpG-содержащего олигонуклеотидного адъюванта, липосомы или эмульсия типа масло в воде или их комбинации.

Предпочтительно, чтобы дифтерийный анатоксин (D), столбнячный анатоксин (T) и поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) индивидуально адсорбировались на фосфате алюминия.

В одном из аспектов девятого варианта осуществления изобретения антиген дифтерийного анатоксина (D), адсорбированный на фосфате алюминия, имеет процент адсорбции не менее 50%.

В другом аспекте девятого варианта осуществления изобретения антиген столбнячного анатоксина (T), адсорбированный на фосфате алюминия, имеет процент адсорбции по меньшей мере 40%.

В ещё одном аспекте девятого варианта осуществления изобретения поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), адсорбированный на фосфате алюминия, имеет процент адсорбции не менее 70%.

В соответствии с десятым вариантом осуществления настоящего изобретения антиген Hib, используемый в комбинированной вакцине настоящего изобретения, получен из капсульного полисахарида штамма 760705 *Haemophilus influenzae* типа В (Hib).

В соответствии с одним аспектом десятого варианта осуществления изобретения антиген PRP Hib конъюгирован с белком-носителем, выбранным из группы белков-носителей, состоящей, но без ограничений, из CRM<sub>197</sub>, дифтерийного анатоксина, комплекса внешней мембраны *Neisseria meningitidis*, фрагмента С столбнячного анатоксина, коклюшного анатоксина, белка D *H. influenzae*, LT *E. coli*, ST *E. coli* и экзотоксина А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекса внешней мембраны с (OMP), поринов, трансферринсвязывающих белков, пневмолизина, пневмококкового поверхностного белка А (PspA), пневмококкового поверхностного адгезина А (PsaA), пневмококковых PhtD, пневмококковых поверхностных белков BVH-3 и BVH-11, защитного антигена (РА) *Bacillus anthracis* и детоксифицированного фактора, вызывающего отек, (EF) и летального фактора (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумина, гемоцианина лимфы фисуреллы (KLH), сывороточного альбумина человека, бычьего сывороточного альбумина (BSA) и очищенного производного туберкулина (PPD), синтетических пептидов, белков теплового шока, белков коклюша, цитокинов, лимфокинов, гормонов, факторов роста, искусственных белков, содержащих множественные CD4<sup>+</sup> Т-клеточные эпитопы человека для различных патогенных антигенов, таких как N 19, белков захвата железа, токсина А или В из белков *C. difficile* и *S. agalactiae*.

Предпочтительно PRP Hib конъюгирован со столбнячным анатоксином (TT) при помощи CNBr химии, химии восстановительного аминирования, химии цианилирования или любой другой химии, уже раскрытой в Kniskern et al., "Conjugation: design, chemistry, and analysis" в Ellis et al., Development and clinical uses of *Haemophilus influenzae* type B conjugate vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69.

В соответствии со вторым аспектом десятого варианта осуществления изобретения белок-носитель присутствует в композиции настоящего изобретения как в свободной, так и в конъюгированной форме, неконъюгированная форма предпочтительно составляет не более 20% от общего количества белка-носителя в композиции в целом и более предпочтительно в количестве менее 5% по массе.

В соответствии с третьим аспектом десятого варианта осуществления изобретения антиген Hib практически не адсорбирован на каком-либо адъюванте.

В соответствии с четвертым аспектом десятого варианта осуществления изобретения антиген Hib не подвергается спланированной или преднамеренной адсорбции на каком-либо адъюванте.

В соответствии с пятым аспектом десятого варианта осуществления изобретения процент адсорбции антигена Hib на любом адъюванте составляет менее 20%.

В соответствии с одиннадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения препарат цельноклеточного коклюшного антигена (wP), используемый в композиции комбинированной вакцины настоящего изобретения, предпочтительно получают из штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229, смешанных в определенном соотношении и впоследствии инактивированных с помощью улучшенных способов инактивации, в которых не используется тиомерсал, что приводит к снижению реактогенности и повышению активности, и антиген wP может быть адсорбирован или не адсорбирован на адъювантах на основе алюминия.

В соответствии с одним аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения препарат цельноклеточного коклюшного антигена (wP), используемый в композиции комбинированной вакцины настоящего изобретения, предпочтительно получают из штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229, смешанных в соотношении 1:1:0,25:0,25.

В соответствии со вторым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения препарат

цельноклеточного коклюшного антигена (wP), используемый в композиции комбинированной вакцины, инактивирован одним или несколькими из следующих способов инактивации, которые включают в себя нагревание, обработку УФ, формалином/формальдегидом, ацетилэтиленимином и т.д.

Предпочтительно препарат цельноклеточного коклюшного антигена (wP), используемый в композиции комбинированной вакцины, инактивирован с использованием комбинации тепловой и химической обработки. Тем не менее, предпочтительно проводить инактивацию нагреванием при температуре  $56\pm 2^{\circ}\text{C}$ , от 10 до 15 мин в присутствии формальдегида, при этом основная масса wP остается не комковатой и легко гомогенизируется, что приводит к снижению реактогенности и дает лучшую эффективность wP в течение более длительного времени.

В соответствии с третьим аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения препарат цельноклеточного коклюшного антигена (wP), используемый в композиции комбинированной вакцины, может быть адсорбирован или не адсорбирован на адъюванте на основе алюминия, таком как гидроксид алюминия, фосфат алюминия или их комбинация (например, до или после смешивания с другими компонентами, если они есть). В случае адсорбции один или несколько штаммов wP (т.е. 134, 509, 25525 и 6229) могут адсорбироваться по отдельности или вместе в виде смеси.

В соответствии с двенадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 1

| № п.п. | Компоненты композиции                                                    | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                                | 10-25 Lf*                       | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (T)                                                | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                        | 12-16 IOU**                     | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                              | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-ТТ                                       | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                         |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                               | 1–50 DU***                      | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 2 (единицы D-антигена)                                               | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 8 или 4 или 16 DU                                       |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                               | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия ( $\text{Al}^{3+}$ ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                          | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                             | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 10     | Пропилпарабен                                                            | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

\*Lf - Единицы флоккуляции

\*\*IOU - Международные единицы непрозрачности

\*\*\*DU - Единицы D-антигена

В соответствии с тринадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 2

| № п.п. | Компоненты композиции                                             | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                         | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                         | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                 | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                       | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                   |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | MEF-1 Тип 2 (единицы D-антигена)                                  | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 1,5 или 2 или 4 или 8 DU                                |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                   | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                      | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 10     | Пропилпарабен                                                     | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с четырнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 3

| № п.п. | Компоненты композиции                                             | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                         | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                         | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                 | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                       | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                  |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                        | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                        | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                   | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                      | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 10     | Пропилпарабен                                                     | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с пятнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 4

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 10     | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с шестнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 5

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 8 или 4 или 16 DU                                       |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |

В соответствии с семнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 6

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | MEF-1 Тип 2 (единицы D-антигена)                                        | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 1,5 или 2 или 4 или 8 DU                                |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |

В соответствии с восемнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 7

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |

В соответствии с девятнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 8

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-ТТ                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |

В соответствии с двадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 9

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-ТТ                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 8 или 4 или 16 DU                                       |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать первым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 10

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | MEF-1 Тип 2 (единицы D-антигена)                                        | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 1,5 или 2 или 4 или 8 DU                                |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать вторым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 11

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать третьим вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 12

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 13

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 8 или 4 или 16 DU                                       |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать пятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 14

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Maoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                       | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | MEF-1 Тип 2 (единицы D-антигена)                                        | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 1,5 или 2 или 4 или 8 DU                                |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать шестым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 15

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 16

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | Метилпарабен                                                            | 0,1 – 1,5 мг                    | Предпочтительно одно из 0,7 или 0,9 или 1 мг                                    |
| 9      | Пропилпарабен                                                           | 0,05 – 0,2 мг                   | Предпочтительно одно из 0,05 или 0,1 или 0,15 мг                                |

В соответствии с двадцать восьмым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 17

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 8 или 4 или 16 DU                                       |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |

В соответствии с двадцать девятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 18

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | MEF-1 Тип 2 (единицы D-антигена)                                        | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 1,5 или 2 или 4 или 8 DU                                |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |

В соответствии с тридцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 19

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксизтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |

В соответствии с тридцать первым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 20

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |
| 8      | 2-феноксиэтанол                                                         | 1 - 6 мг                        | Предпочтительно одно из 2 или 2,5 или 3 мг                                      |

В соответствии с тридцать вторым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 21

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 8 или 4 или 16 DU                                       |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |

В соответствии с тридцать третьим вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 22

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | MEF-1 Тип 2 (единицы D-антигена)                                        | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 1,5 или 2 или 4 или 8 DU                                |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |

В соответствии с тридцать четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 23

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Sabin                        |                                 |                                                                                 |
|        | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 1–50 DU                         | Предпочтительно одно из 5 или 10 или 20 DU                                      |
|        | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 10 или 16 или 32 DU                                     |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |

В соответствии с тридцать пятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция/рецептура многодозовой комбинированной вакцины включает в себя следующее.

Таблица 24

| № п.п. | Компоненты композиции                                                   | Единица антигена на дозу 0,5 мл | Предпочтительное количество единиц антигена на дозу 0,5 мл (В любой комбинации) |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10-25 Lf                        | Предпочтительно одно из 10 или 20 или 25 Lf                                     |
| 2      | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02-10 Lf                        | Предпочтительно одно из 2 или 4 или 10 Lf                                       |
| 3      | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12-16 IOU                       | Предпочтительно одно из 12 или 14 или 16 IOU                                    |
| 4      | Антиген HBs                                                             | 7-15 мкг                        | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 15 мкг                                     |
| 5      | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 7-13 мкг PRP                    | Предпочтительно одно из 8 или 10 или 13 мкг PRP                                 |
| 6      | Инактивированный полиовирус (IPV) серотипа Salk                         |                                 |                                                                                 |
|        | Mahoney Тип 1 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 7,5 или 10 или 20 или 40 DU                             |
|        | Saukett Тип 3 (единицы D-антигена)                                      | 1 – 50 DU                       | Предпочтительно одно из 6 или 10 или 16 или 32 DU                               |
| 7      | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | 0,1 – 0,6 мг                    | Предпочтительно не более 0,3 или не более 0,55 или не более 0,63                |

В соответствии с тридцать шестым вариантом осуществления настоящего изобретения один или несколько антигенов конечной композиции комбинированной вакцины могут не быть в значительной степени адсорбированы на каком-либо адъюванте.

В соответствии с тридцать седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения значение pH иммуногенной композиции может находиться в диапазоне от pH 6,0 до pH 8,0; более предпочтительно в диапазоне от pH 6,0 до pH 7,5; ещё более предпочтительно в диапазоне от pH 6,2 до pH 7,2 и наиболее предпочтительно в диапазоне от pH 6,3 до pH 6,8.

В соответствии с тридцать восьмым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать буферный агент, выбранный из группы, состоящей из карбоната, фосфата, ацетата, сукцината, бората, цитрата, лактата, глюконата и тартрата, а также более сложных органических буферных агентов, включая фосфатный буферный агент, который содержит фосфат натрия и/или фосфат калия в соотношении, выбранном для достижения желаемого значения pH. В другом примере буферный агент содержит трис (гидроксиэтил) аминометан или "Трис", включенный в состав рецептуры для достижения желаемого значения pH. Ещё в другом примере буферный агент может представлять собой минимальную питательную среду с солями Хенкса. Другие буферы, такие как HEPES, пиперазин-N,N'-бис (PIPES) и 2-этансульфоновая кислота (MES) также предусмотрены настоящим изобретением. Буфер помогает стабилизировать иммуногенную композицию настоящего изобретения. Количество буфера может находиться в диапазоне от 0,1 до 100 mM, предпочтительно выбранное из 5 mM, 6 mM, 7 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM и 30 mM.

В ещё одном аспекте варианта осуществления изобретения, иммуногенная композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, выбранные из группы, состоящей из поверхностно-активных веществ, полимеров и солей. Примеры поверхностно-активных веществ могут включать в себя неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и т.д. Примеры полимеров могут включать в себя декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и т.д. Примеры солей могут включать в себя NaCl, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> и т.д. Предпочтительно солью может представлять собой NaCl. Обычно количество соли может находиться в диапазоне от 100 до 200 mM.

Аминокислоты, такие как гистидин, глицин, аргинин и лизин, могут быть добавлены для стабилизации иммуногенной композиции.

В соответствии с тридцать девятым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать один или несколько адъювантов, выбранных из группы, состоящей из соли алюминия (Al<sup>3+</sup>), такой как гидроксид алюминия (Al(OH)<sub>3</sub>) или фосфат алюминия (AlPO<sub>4</sub>), квасцы, фосфата кальция, MPLA, 3D-MPL, QS21, CpG-содержащего олигонуклеотида, липосомы или эмульсии типа масло в воде.

Предпочтительно композиция содержит в качестве адъюванта фосфат алюминия (AlPO<sub>4</sub>).

Предпочтительно композиция содержит в качестве адъюванта гидроксид алюминия (Al(OH)<sub>3</sub>).

В одном из аспектов тридцать девятого варианта осуществления изобретения антигены конечной композиции могут быть адсорбированы на геле фосфата алюминия *in situ* или готовом геле фосфата алюминия или на их комбинации.

В одном из предпочтительных аспектов тридцать девятого варианта осуществления изобретения композиция настоящего изобретения может содержать адъювант в количестве 2,5 мг на 0,5 мл или менее, а конкретно, в количестве от 1,5 мг на 0,5 мл до 0,1 мг на 0,5 мл.

В соответствии с сороковым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная

композиция может дополнительно содержать иммуностимулирующий компонент, выбранный из группы, состоящей из масляной и водной эмульсии, MF-59, липосомы, липополисахарида, сапонины, липида А, производных липида А, монофосфорилипиды А, 3-деацелированного монофосфорилипиды А, AS01, AS03, олигонуклеотида, олигонуклеотида, содержащего по меньшей мере один неметилированный CpG и/или липосому, адъюванта Фрейнда, полного адъюванта Фрейнда, неполного адъюванта Фрейнда, полимеров, сополимеров, таких как полиоксиэтилен-полиоксипропилен сополимеры, включая блок-сополимеры, полимера р 1005, адъюванта CRL-8300, мурамилдипептида, агонистов TLR-4, флагеллина, флагеллинов, полученных из грамотрицательных бактерий, агонистов TLR-5, фрагментов флагеллинов, способных связываться с рецепторами TLR-5, альфа-С-галактозилцерамида, хитозана, интерлейкина-2, QS-21, ISCOMS, смесей сквалена (SAF-1), Quil A, субъединицы холерного токсина В, полифосфазена и производных, препаратов клеточной стенки микобактерий, производных миколиновой кислоты, неионных поверхностно-активных блок-сополимеров, OMV, fHbp, комбинации сапонины со стеролами и липидами.

В соответствии с сорок первым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать консервант, выбранный из группы, состоящей из бензотетрагидрохлорида (фемерола), фенола, м-крезола, тиомерсала, формальдегида, бензалкония хлорида, бензилового спирта, хлорбутанола, п-хлор-м-крезола или бензилового спирта, или их комбинации. Вакцинная композиция может содержать консервант для однократной иммунизации или может содержать консервант для множественной иммунизации (то есть "многодозовый" набор). В многодозовых схемах предпочтительно включение консерванта. В качестве альтернативы (или в дополнение) к включению консерванта в многодозовые композиции, композиции могут быть помещены в контейнер, имеющий асептический адаптер для удаления материала. Обычно количество консерванта может находиться в диапазоне от 0,1 до 50 мг.

В соответствии с сорок вторым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты pH, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, ароматизаторы, красители и тому подобное, в зависимости от пути введения и желаемого препарата.

В соответствии с сорок третьим вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может быть полностью жидкой, но не ограничивается этим. Подходящие формы жидкого препарата могут включать в себя растворы, суспензии, эмульсии, сиропы, изотонические водные растворы, вязкие композиции и настойки, которые забуферены до желаемого значения pH.

Иммуногенная композиция настоящего изобретения может быть в форме трансдермальных препаратов, включая лосьоны, гели, спреи, мази или другие подходящие формы. Если желательно введение через нос или дыхательные пути (через слизистые оболочки) (например, аэрозольная ингаляция или инсуффляция), то композиции могут быть в форме и распределяться с помощью сжимаемого распылителя, распылителя насосного типа или аэрозольного распылителя. Аэрозоли обычно находятся под давлением, создаваемым с помощью углеводорода. Распылители насосного типа могут предпочтительно дозировать отмеренную дозу или дозу, имеющую конкретный размер частиц. Когда композиции находятся в форме растворов, суспензий и гелей, в некоторых вариантах осуществления изобретения иммуногенные композиции в дополнение к активному ингредиенту(ам) содержат большое количество воды (предпочтительно очищенной воды).

В соответствии с сорок четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения указанная комбинированная вакцина может быть стабильной при температуре 2-8°C в течение от 12 до 36 месяцев; при температуре 25°C от 2 до 6 месяцев; при температуре 37°C от 1 недели до 4 недель.

В соответствии с сорок пятым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может быть составлена для использования в способе ослабления наступления или предотвращения патологического состояния здоровья, включающего в себя дифтерию, столбняк, коклюш, инфекцию вирусом гепатита В, *Haemophilus influenzae* типа b, вирусом полиомиелита, включающим в себя введение иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции субъекту-человеку путём парентерального, подкожного или внутрикожного, внутримышечного или внутрибрюшинного или внутривенного введения, или инъекционного введения, или пролонгированного высвобождения из имплантатов, или введения в виде глазных капель или назального, ректального, буккального или вагинального, перорального или внутрижелудочного, или чрезслизистого, или подъязычного, альвеолярного или десневого, или обонятельного, или в слизистую оболочку дыхательных путей введения, или любого другого пути иммунизации.

В соответствии с сорок шестым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может быть получена в виде ампул с одной дозой или ампул с несколькими дозами (2 дозы, 5 доз или 10 доз в ампуле), или многодозового набора, или в виде предварительно заполненных шприцев, где указанная иммуногенная композиция может вводиться по схеме однократной дозы или, предпочтительно по схеме приема нескольких доз, при которой за первичным курсом вакцинации следует 1-3 отдельные дозы, вводимые с последующими интервалами времени через 1-3 года, если это необходимо. Режим дозирования также, по меньшей мере, частично будет определяться необходимостью бустерной

дозы, необходимой для создания защитного иммунитета.

Предпочтительно иммуногенная композиция может быть составлена для введения субъекту-человеку или детям в возрасте 2 лет или младше в соответствии со схемой приема двух доз, состоящей из первой дозы и второй дозы с последующими интервалами времени через 1-3 года.

Предпочтительно иммуногенную композицию можно вводить одновременно с другими лекарственными средствами или любой другой вакциной.

В соответствии с сорок седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения авторы обнаружили, что многодозовая полностью жидкая комбинированная вакцина с улучшенной иммуногенностью и пониженной реактогенностью может быть получена, когда вакцина производится способом, описанным ниже, с учетом:

- i) процесса получения индивидуальных антигенов,
- ii) последовательности добавления антигенов,
- iii) использования конкретных адъювантов в определенном количестве для определенных антигенов,
- iv) индивидуальной адсорбции или комбинированной адсорбции антигенов на адъювантах,
- v) степени адсорбции антигена на адъювантах,
- vi) использования минимальной концентрации квасцов,
- vii) использования оптимальной концентрации и типа консерванта и
- viii) использования различных параметров, включая перемешивание, температуру и pH.

#### **Биологический источник штаммов, используемых в комбинированной вакцине SIPL**

Дифтерийный анатоксин:

Штамм *Corynebacterium diphtheriae* PW8 CN2000 был получен из исследовательской лаборатории Wellcome, Лондон, Соединенное Королевство Центральным исследовательским институтом Национального контрольного органа (C.R.I.), Касаули, Химачал-Прадеш, Индия, в лиофилизированной форме в 1973 г.

Столбнячный анатоксин:

Штамм *Clostridium tetani* Harvard штамм № 49205 был получен из института Rijks Institute Voor de Volksgezondheid (Нидерланды) Национальным контрольным органом C.R.I., Касаули в лиофилизированной форме.

Коклюш:

Производство партии коклюшной вакцины SIPL предполагает использование четырех штаммов *Bordetella pertussis*, а именно штаммов 134, 509, 6229 и 25525. Исходный материал штаммов 134 и 509 изначально был получен в институте Rijks Institute, Нидерланды и был получен через Национальный контрольный орган Центрального исследовательского института, Касаули, Химачал-Прадеш, Индия. Исходный материал штаммов 6229 и 25525 первоначально был получен из института Lister Institute, Англия.

Гепатит B:

Компания Rhein Biotech (Германия) сконструировала рекомбинантный штамм *Hansenulapolyomorpha*, содержащий ген поверхностного антигена HBsAg. Компания Rhein Biotech также создала основной банк клеток (MCB *Hansenulapolyomorpha* K3/8-1, штамм ADW, 12/94) и выполнила все тесты для определения характеристик в этом банке.

*Haemophilus influenzae* типа b:

Организмом-источником для получения клеточного субстрата является *Haemophilus influenzae* типа b, штамм 760705. Первоначально штамм был выделен у мальчика в возрасте 2 года и 2 месяца (родившегося 14-8-74) в ноябре 1976 г. Было проведено три пересева этого штамма перед помещением его на хранение при температуре -70°C в Академическом медицинском центре (АМС) Амстердамского университета. Этот штамм был передан SIPL в рамках сотрудничества SIPL и Нидерландского института вакцин (NVI, Нидерланды).

IPV:

Штамм и источник полиовируса Salk указаны ниже.

Полиовирус типа 1:

Штамм: Mahoney

Источник: Bilthoven Biologicals, Нидерланды.

Полиовирус типа 2:

Штамм: MEF1

Источник: Bilthoven Biologicals, Нидерланды.

Полиовирус типа 3:

Штамм: Saukett

Источник: Bilthoven Biologicals, Нидерланды.

В данном описании термин "содержать" или его варианты, такие как "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любого другого элемента, целого числа

или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов.

Использование термина "по меньшей мере" или "по меньшей мере один" предполагает использование одного или нескольких элементов, ингредиентов или количеств, поскольку использование может быть в варианте осуществления изобретения для достижения одной или нескольких желаемых задач или результатов. Хотя были описаны определенные варианты осуществления изобретения, эти варианты осуществления были представлены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема изобретения. Вариации или модификации состава данного изобретения в пределах объема изобретения могут быть сделаны специалистами в данной области техники после ознакомления с данным описанием. Такие вариации или модификации полностью соответствуют сущности настоящего изобретения.

Числовые значения, приведенные для различных физических параметров, размеров и количеств, являются только приблизительными значениями, и предполагается, что значения, превышающие числовое значение, присвоенное физическим параметрам, размерам и количествам, включены в объем изобретения, если иное не указано в описании.

Хотя в данном описании значительный акцент сделан на отличительных признаках предпочтительного варианта осуществления изобретения, следует понимать, что может быть добавлено много дополнительных признаков, и что в предпочтительный вариант осуществления изобретения можно внести множество изменений без отступления от принципов настоящего изобретения. Эти и другие изменения в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из данного описания, при этом следует четко понимать, что вышеизложенное описание следует интерпретировать только как иллюстрацию изобретения, а не как его ограничение.

### **Преимущества изобретения**

Настоящее изобретение, описанное выше, имеет несколько технических достижений и преимуществ, включая, но без ограничений, создание композиции комбинированной вакцины, содержащей D, T, wP, HBsAg, конъюгат PRP-TT Hib и IPV, а также способ ее получения. По сравнению с другой композицией комбинированной вакцины настоящее изобретение обеспечивает следующие преимущества:

1. Полностью жидкая комбинированная вакцина.
2. Сниженная доза антигена IPV по сравнению со стандартной дозой, демонстрирующая сравнимую эффективность по сравнению со стандартной дозой (40-8-32 DU).
3. Повышенная иммуногенность антигенов D, T, wP, HepB, Hib, IPV.
4. Повышенная стабильность при температуре 2-8°C и комнатной температуре, при испытании в течение 12 месяцев.
5. Высокоочищенные дифтерийные анатоксины (D) и столбнячные анатоксины (T), полученные с использованием полусинтетической среды, свободной от трансмиссивной губчатой энцефалопатии (TSE) или губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE).
6. Цельноклеточный антиген *B. pertussis* (wP) включает штаммы *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25 0,25, тем самым улучшая эффективность и иммуногенность против *B. pertussis*.
7. Усовершенствованный способ инактивации цельноклеточного компонента *B. pertussis* (wP) с использованием комбинации инактивации нагреванием и формальдегидом. В способе не используется тиомерсал, и цельноклеточный коклюшный антиген остается не комковатым, а однородным, что приводит к снижению реактогенности и дает лучшую эффективность в течение более длительного времени.
8. Низкое содержание свободного PRP (менее 7%) в общей массе конъюгата PRP-TT *Haemophilus influenzae* типа b.
9. Процент адсорбции антигена Hib на любом адъюванте составляет менее 20%.
10. Улучшенный профиль адсорбции антигена дифтерийного анатоксина (D), антигена столбнячного анатоксина (T) и поверхностного антигена гепатита В (HepB), адсорбированных индивидуально на адъюванте фосфат алюминия, тем самым повышая эффективность и иммуногенность.
11. Минимальное общее содержание квасцов ( $Al^{3+}$ ), что обеспечивает пониженную реактогенность.
12. Оптимизированная концентрация 2-феноксиэтанола (2-PE) и по меньшей мере одного сложного эфира парабена (метилпарабена или пропилпарабена) в качестве консерванта, что позволяет эффективно поддерживать антимикробную способность многодозовой полностью жидкой комбинированной вакцины.

### **Примеры**

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что композиции и методики, раскрытые в приведенных ниже примерах, представляют собой методики, предлагаемые авторами настоящего изобретения, которые хорошо проявили себя при практической реализации изобретения, и, таким образом, они могут рассматриваться как предпочтительные способы его реализации. Однако специалисты в данной области техники должны в свете настоящего раскрытия принять во внимание, что многие изменения могут быть внесены в конкретные раскрытые варианты осуществления изобретения с получением подобного или аналогичного результата, не выходя за рамки сущности и объема изобретения.

Пример 1. Различные комбинации вакцинных композиций в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 25

Комбинированная вакцина, содержащая IPV (штамм Salk типа 1 (Mahoney), или типа 2 (MEF), или типа 3 (Saukett))

| № п.п | Компоненты композиции                                                   | Комбинированная композиция в соответствии с настоящим изобретением [на дозу 0,5 мл] |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|       |                                                                         | 1                                                                                   | 2                        | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        | 7                        | 8                        | 9                        | 10                       | 11                       | 12                       |
| 1     | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10 Lf                                                                               | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 20 Lf                    | 20 Lf                    | 20 Lf                    | 20 Lf                    |
| 2     | Столбнячный анатоксин (T)                                               | 02 Lf                                                                               | 02 Lf                    | 02 Lf                    | 02 Lf                    | 02 Lf                    | 02 Lf                    | 02 Lf                    | 02 Lf                    | 4 Lf                     | 4 Lf                     | 4 Lf                     | 4 Lf                     |
| 3     | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12 IOU                                                                              | 12 IOU                   | 12 IOU                   | 12 IOU                   | 12 IOU                   | 12 IOU                   | 12 IOU                   | 12 IOU                   | 14 IOU                   | 14 IOU                   | 14 IOU                   | 14 IOU                   |
| 4     | Антиген HBs                                                             | 8 мкг                                                                               | 8 мкг                    | 8 мкг                    | 8 мкг                    | 8 мкг                    | 8 мкг                    | 8 мкг                    | 8 мкг                    | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   |
| 5     | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 8 мкг PRP                                                                           | 8 мкг PRP                | 8 мкг PRP                | 8 мкг PRP                | 8 мкг PRP                | 8 мкг PRP                | 8 мкг PRP                | 8 мкг PRP                | 10 мкг PRP               | 10 мкг PRP               | 10 мкг PRP               | 10 мкг PRP               |
| 6     | Инактивированный полиовирус (IPV)                                       |                                                                                     |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|       | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 7,5 или 10 или 20 или 40                                                            | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 |
|       | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1,5 или 2 или 4 или 8                                                               | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       |
|       | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 6 или 10 или 16 или 32                                                              | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   |
| 7     | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | Не более 0,55 мг                                                                    | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         |
| 8     | 2-феноксиэтанол                                                         | 2,5 мг                                                                              | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   |
| 9     | Метилпарабен                                                            | 0,9 мг                                                                              | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | --                       | --                       | --                       | --                       | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   |
| 10    | Пропилпарабен                                                           | 0,1 мг                                                                              | 0,1 мг                   | --                       | --                       | 0,1 мг                   | 0,1 мг                   | --                       | --                       | 0,1 мг                   | 0,1 мг                   | --                       | --                       |

| № п.п | Компоненты композиции                                                   | Комбинированная композиция в соответствии с настоящим изобретением [на дозу 0,5 мл] |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|       |                                                                         | 13                                                                                  | 14                       | 15                       | 16                       | 17                       | 18                       | 19                       | 20                       | 21                       | 22                       | 23                       | 24                       |
| 1     | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 20 Lf                                                                               | 20 Lf                    | 20 Lf                    | 20 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    | 25 Lf                    |
| 2     | Столбнячный анатоксин (T)                                               | 4 Lf                                                                                | 4 Lf                     | 4 Lf                     | 4 Lf                     | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    | 10 Lf                    |
| 3     | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 14 IOU                                                                              | 14 IOU                   | 14 IOU                   | 14 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   | 16 IOU                   |
| 4     | Антиген HBs                                                             | 15 мкг                                                                              | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   | 15 мкг                   |
| 5     | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 10 мкг PRP                                                                          | 10 мкг PRP               | 10 мкг PRP               | 10 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               | 13 мкг PRP               |
| 6     | Инактивированный полиовирус (IPV)                                       |                                                                                     |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |                          |
|       | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 7,5 или 10 или 20 или 40                                                            | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 | 7,5 или 10 или 20 или 40 |
|       | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 1,5 или 2 или 4 или 8                                                               | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       | 1,5 или 2 или 4 или 8    | --                       |
|       | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 6 или 10 или 16 или 32                                                              | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   | 6 или 10 или 16 или 32   |
| 7     | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | Не более 0,55 мг                                                                    | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         | Не более 0,55 мг         |
| 8     | 2-феноксиэтанол                                                         | 2,5 мг                                                                              | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   | 2,5 мг                   |
| 9     | Метилпарабен                                                            | --                                                                                  | --                       | --                       | --                       | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | 0,9 мг                   | --                       | --                       | --                       | --                       |
| 10    | Пропилпарабен                                                           | 0,1 мг                                                                              | 0,1 мг                   | --                       | --                       | 0,1 мг                   | 0,1 мг                   | --                       | --                       | 0,1 мг                   | 0,1 мг                   | --                       | --                       |

Дополнительно доводят pH композиции, как описано выше, примерно до 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и доводят объём путём добавления физиологического раствора (0,9%). Вакцина может содержать следы глутарового альдегида, формальдегида, неомицина, стрептомицина и полимиксина В, которые используются в процессе производства.

Таблица 26

Комбинированная вакцина, содержащая IPV (Штамм Sabin: тип 1, тип 2 и тип 3)

| № п.п | Компоненты композиции                                                   | Комбинированная композиция в соответствии с настоящим изобретением [на дозу 0,5 мл] |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|       |                                                                         | 1                                                                                   | 2                | 3                | 4                | 5                | 6                | 7                | 8                | 9                | 10               | 11               | 12               |
| 1     | Дифтерийный анатоксин (D)                                               | 10 Lf                                                                               | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 20 Lf            | 20 Lf            | 20 Lf            | 20 Lf            |
| 2     | Столбнячный анатоксин (Т)                                               | 02 Lf                                                                               | 02 Lf            | 02 Lf            | 02 Lf            | 02 Lf            | 02 Lf            | 02 Lf            | 02 Lf            | 4 Lf             | 4 Lf             | 4 Lf             | 4 Lf             |
| 3     | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                       | 12 IOU                                                                              | 12 IOU           | 12 IOU           | 12 IOU           | 12 IOU           | 12 IOU           | 12 IOU           | 12 IOU           | 14 IOU           | 14 IOU           | 14 IOU           | 14 IOU           |
| 4     | Антиген HBs                                                             | 8 мкг                                                                               | 8 мкг            | 8 мкг            | 8 мкг            | 8 мкг            | 8 мкг            | 8 мкг            | 8 мкг            | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           |
| 5     | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                      | 8 мкг PRP                                                                           | 8 мкг PRP        | 8 мкг PRP        | 8 мкг PRP        | 8 мкг PRP        | 8 мкг PRP        | 8 мкг PRP        | 8 мкг PRP        | 10 мкг PRP       | 10 мкг PRP       | 10 мкг PRP       | 10 мкг PRP       |
| 6     | Инактивированный полиовирус (IPV)                                       |                                                                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|       | Тип 1 (единицы D-антигена)                                              | 5 или 10 или 20                                                                     | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  |
|       | Тип 2 (единицы D-антигена)                                              | 4 или 8 или 16                                                                      | --               | 4 или 8 или 16   | --               | 4 или 8 или 16   | --               | 4 или 8 или 16   | --               | 4 или 8 или 16   | --               | 4 или 8 или 16   | --               |
|       | Тип 3 (единицы D-антигена)                                              | 10 или 16 или 32                                                                    | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 |
| 7     | Общее содержание алюминия (Al <sup>3+</sup> ) (в виде фосфата алюминия) | Не более 0,55 мг                                                                    | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг |
| 8     | 2-феноксизтанол                                                         | 2,5 мг                                                                              | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           |
| 9     | Метилпарабен                                                            | 0,9 мг                                                                              | 0,9 мг           | 0,9 мг           | 0,9 мг           | --               | --               | --               | --               | 0,9 мг           | 0,9 мг           | 0,9 мг           | 0,9 мг           |
| 10    | Пропилпарабен                                                           | 0,1 мг                                                                              | 0,1 мг           | --               | --               | 0,1 мг           | 0,1 мг           | --               | --               | 0,1 мг           | 0,1 мг           | --               | --               |

| № п.п | Компоненты композиции                                             | Комбинированная композиция в соответствии с настоящим изобретением [на дозу 0,5 мл] |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|-------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|       |                                                                   | 13                                                                                  | 14               | 15               | 16               | 17               | 18               | 19               | 20               | 21               | 22               | 23               | 24               |
| 1     | Дифтерийный анатоксин (D)                                         | 20 Lf                                                                               | 20 Lf            | 20 Lf            | 20 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            | 25 Lf            |
| 2     | Столбнячный анатоксин (Т)                                         | 4 Lf                                                                                | 4 Lf             | 4 Lf             | 4 Lf             | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            | 10 Lf            |
| 3     | Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)                 | 14 IOU                                                                              | 14 IOU           | 14 IOU           | 14 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           | 16 IOU           |
| 4     | Антиген HBs                                                       | 15 мкг                                                                              | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           | 15 мкг           |
| 5     | Конъюгированный антиген Hib PRP-TT                                | 10 мкг PRP                                                                          | 10 мкг PRP       | 10 мкг PRP       | 10 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       | 13 мкг PRP       |
| 6     | Инактивированный полиовирус (IPV)                                 |                                                                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|       | Тип 1 (единицы D-антигена)                                        | 5 или 10 или 20                                                                     | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  | 5 или 10 или 20  |
|       | Тип 2 (единицы D-антигена)                                        | 4 или 8 или 16                                                                      | —                | 4 или 8 или 16   | —                | 4 или 8 или 16   | —                | 4 или 8 или 16   | —                | 4 или 8 или 16   | —                | 4 или 8 или 16   | —                |
|       | Тип 3 (единицы D-антигена)                                        | 10 или 16 или 32                                                                    | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 | 10 или 16 или 32 |
| 7     | Общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) (в виде фосфата алюминия) | Не более 0,55 мг                                                                    | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг | Не более 0,55 мг |
| 8     | 2-феноксиэтанол                                                   | 2,5 мг                                                                              | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           | 2,5 мг           |
| 9     | Метилпарабен                                                      | —                                                                                   | —                | —                | —                | 0,9 мг           | 0,9 мг           | 0,9 мг           | 0,9 мг           | —                | —                | —                | —                |
| 10    | Пропилпарабен                                                     | 0,1 мг                                                                              | 0,1 мг           | —                | —                | 0,1 мг           | 0,1 мг           | —                | —                | 0,1 мг           | 0,1 мг           | —                | —                |

Дополнительно доводят pH композиции, как описано выше, примерно до 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и доводят объём путём добавления физиологического раствора (0,9%). Вакцина может содержать следы глутарового альдегида, формальдегида, неомицина, стрептомицина и полимиксина В, которые используются в процессе производства.

Пример 2. Способ получения общей массы конъюгата *Haemophilus influenzae* типа b

Общий вид производственных этапов представлен на блок-схеме на фиг. 1. Каждый из 53 этапов способа кратко описан ниже:

Этап 1. Посевная культура этап I.

Встряхиваемая колба (S1):

Пробиру с рабочей партией посевного материала используют для инокуляции встряхиваемой колбы на этапе посевной культуры, колба содержит посевную среду, фильтрованную через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Используют одноразовую колбу из ПЭТГ 125 мл с рабочим объёмом 25 мл. Этот этап проводят в шейкере-инкубаторе с контролируемым перемешиванием ( $200 \pm 50$  об/мин) и температурой ( $36 \pm 2^\circ\text{C}$ ). После достижения соответствующего роста бактерий ( $OD_{590} \geq 1,0$ ) культуру переносят на следующий этап посевной культуры (этап S2), который описан в этапе 2. Для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы) проводят окрашивание по Граму в качестве производственного контроля.

Этап 2: Посевная культура этап II.

Встряхиваемая колба (S2):

Этап S2 посевной культуры состоит из 2-литровых колб Фернбаха (S2A и S2B) с рабочим объёмом 800 мл. Колба S2A используется для измерения  $OD_{590}$  до тех пор, пока  $OD_{590}$  не будет соответствовать критериям приемлемости, а колба S2B используется для инокуляции на этапе S3. В обе колбы загружают стерилизованную фильтром среду, которая идентична среде на этапе посевной культуры S1. Колба этапа S1 используется для инокуляции обеих встряхиваемых колб этапа II. Этот этап проводится в шейкере-инкубаторе с контролируемым перемешиванием ( $200 \pm 50$  об/мин) и температурой ( $36 \pm 2^\circ\text{C}$ ). После достижения соответствующего роста бактерий ( $OD_{590} \geq 1,0$ ) культуру переносят на следующий этап посевной культуры (этап S3), который описан в этапе 3. Для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы) проводят окрашивание по Граму в качестве производственного контроля.

Этап 3: Посевная культура этап III.

Ферментер:

Этап S3 посевной культуры состоит из ферментера объемом 120 л с рабочим объемом 35 л. В ферментер загружают среда, идентичную предыдущим этапам посевной культуры. Колбу этапа S2 используют для инокуляции ферментера посевной культуры. Рост проводят при температуре ( $36\pm 2^\circ\text{C}$ ), DO (растворенный кислород) (заданные значения 10%), перемешивании (300-600 об/мин), аэрации (1-5 л/мин) и противодавлении (0,2 бар) в ферментере посевной культуры. После достижения соответствующего роста бактерий ( $\text{OD}_{590} \geq 1.0$ ) культуру переносят на следующий производственный этап (этап S4), который описан в этапе 4. Для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы) проводят окрашивание по Граму в качестве производственного контроля.

Этап 4: Ферментация в объеме 1200 л

Производственный ферментер на 1200 л имеет рабочий объем 800 л. В него загружают основные компоненты среды и стерилизуют паром на месте. Затем после пропускания через фильтр с размером 0,22 мкм добавляют различные добавки. Ферментер инокулируют культурой этапа S3, полученной на этапе 3. Ферментацию проводят при контролируемом уровне растворенного кислорода (20% - заданное значение), температуре ( $36\pm 2^\circ\text{C}$ ), pH (7,1-7,4), перемешивании (40-400 об/мин), аэрации (50-300 л/мин) и противодавлении (0,2 бар). В процессе ферментации два раза добавляют питательные вещества. За ростом следят путем измерения  $\text{OD}_{590}$  ( $\text{OD}_{590} \geq 3,5$ ) и ферментацию считают завершенной после достижения стационарной фазы. Во время роста и стационарной фазы полисахаридный продукт секретируется и накапливается в культуральной жидкости. Для обеспечения чистоты культуры (грамотрицательные коккобациллы) проводят окрашивание по Граму в качестве производственного контроля.

Этап 5: Обработка формалином

Снижение бионагрузки достигается на этом этапе за счет использования химического агента (формалина). Добавляют 0,1% формалина и ферментированный бульон инкубируют в течение 2 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$ . После обработки формалином емкость быстро охлаждают до температуры  $<15^\circ\text{C}$ . Добавление формалина одобрено для снижения бионагрузки. Это подтверждается посевом на культуральные чашки после инкубационного периода. Бульон с уменьшенной бионагрузкой готов к сбору, как описано в этапе 6.

Этап 6: Сбор культуры путем непрерывного центрифугирования

Непрерывное центрифугирование используют в качестве основного этапа сбора культуры. Этот этап выполняется для отделения неочищенного бульона, содержащего полисахарид, от инактивированной биомассы. Центрифугу непрерывного действия используют с целью удаления  $>90\%$  биомассы, по данным измерения снижения  $\text{OD}_{590}$ . Центрифуга работает при приблизительно 15000 g и потоке жидкости 200-500 л/ч. Центрифугированный супернатант дополнительно обрабатывают, как описано в этапе 7.

Этап 7: Глубинная фильтрация через фильтр 50LP

Центрифугированный супернатант пропускают через глубинный фильтр 50LP для удаления грубого материала, такого как остатки клеток. Этот этап позволяет продукту проходить через фильтрат и дополняется дополнительным глубинным фильтром, как описано в этапе 8.

Этап 8: Глубинная фильтрация через фильтр 90LP

Фильтрат из глубинного фильтра 50LP затем пропускают через глубинный фильтр 90LP (номинальное значение 0,22 мкм) для дальнейшего удаления любого нерастворимого материала, который, возможно, не был задержан предыдущим глубинным фильтром. Этот этап гарантирует, что фильтрат практически не содержит остатков клеток и может надежно проходить через фильтр 0,22 мкм. Последующий этап фильтрации описан в этапе 9.

Этапы 9 и 10: Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм:

Фильтрат из глубинного фильтра 90LP далее пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм, и фильтрат собирают в сборный резервуар.

Этапы 11 и 12: Концентрирование фракции с массой более 100 кДа и диафильтрация:

Этот этап проводят для удаления компонентов среды и примесей с низкой молекулярной массой. Кроме того, проводят концентрирование для уменьшения рабочего объема. Отсечка по молекулярной массе 100 кДа выбрана, поскольку молекулярная масса полисахарида Hib (PRP) составляет  $\geq 500$  кДа. Бульон концентрируют примерно в 10 раз и затем подвергают диафильтрации не менее чем 5 объемами 0,01 М буфера ФСБ (pH 7,2). Полученный продукт в ретентате называется "неочищенный PRP", и далее его обрабатывают, как описано в этапе 13. Концентрированный бульон переносится в зону дальнейшей обработки через порт для переноса через фильтр с размером пор 0,22 мкм, чтобы гарантировать, что никакие бактерии не попадают в зону дальнейшей обработки.

Этап 13: Осаждение СТАВ

СТАВ (цетил-триметиламмония бромид) представляет собой катионный детергент, который используется для осаждения полисахаридов. СТАВ состоит из гидрофильной области, а также гидрофобной части и осаждает белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды. Неочищенный PRP, полученный на этапе 12, осаждают при концентрации СТАВ 1% и инкубируют в течение  $> 2$  ч. Сбор осадка СТАВ опи-

сан на этапе 14.

Этапы 14, 15 и 16: Центрифугирование, сбор и хранение осадка СТАВ

Осадок СТАВ центрифугируют на центрифуге непрерывного действия при 15000 об/мин в SEZ-3, FF. Осадок СТАВ собирают, взвешивают, разделяют на аликвоты и хранят при температуре  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  для дальнейшей обработки. Это первый этап остановки в процессе.

Этапы 17 и 18: Оттаивание и растворение пасты СТАВ

Замороженную пасту СТАВ размораживают до комнатной температуры. Оттаявший осадок растворяют в 5,85% растворе NaCl. Растворение проводят в резервуаре с мешалкой, и полисахаридный продукт растворяют в водной фазе. В резервуаре содержится нерастворенный материал, состоящий из осажденных белков и нуклеиновых кислот. Эту суспензию далее обрабатывают, как описано в этапе 19.

Этап 19: Центрифугирование

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

Этап 20: Осаждение 72% этанолом

72% этанол используют для осаждения PRP. 96% этанол используют для получения конечной концентрации этанола 72% в супернатанте, полученном на этапе 19.

Это осаждение проводят при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Полученный осадок собирают, как описано в этапе 21.

Этапы 21 и 22: Центрифугирование и растворение осадка:

Осадок, полученный по действием 72% этанола, собирают центрифугированием при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$ , 5000-6500 об/мин в течение 20-30 мин. Полученный осадок растворяют в воде для инъекций до состояния визуальной прозрачности. Последующая обработка солюбилизованного осадка описана в этапе 23.

Этап 23: Осаждение DOC и 32% этанолом

К материалу, полученному на этапе 22, добавляют 6% ацетат натрия и 1% дезоксихолат натрия (DOC). 96% этанол используют для получения конечной концентрации этанола 32%. И DOC, и 32% спирт вызывают осаждение белковых примесей, позволяя полисахариду находиться в жидкой фазе. Осаждение проводят при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение ночи (не менее 8 ч).

Этап 24: Центрифугирование

Материал, полученный на этапе 23, центрифугируют при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$ , 5000-6500 об/мин в течение 20-30 мин для удаления осадка. Центрифугированный супернатант собирают и обрабатывают, как описано на этапе 25.

Этап 25: Глубинная и угольная фильтрация

Раствор супернатанта, полученный на этапе 24, содержит растворимый PRP и подвергается глубинной фильтрации с последующей фильтрацией через уголь для удаления нуклеиновых кислот и красящих веществ. За удалением нуклеиновых кислот следят, периодически измеряя оптическую плотность при длине волны 260 нм ( $A_{260}$ ). После достижения целевого значения  $A_{260}$  раствор фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм, и этот отфильтрованный раствор дополнительно обрабатывают, как описано в этапе 26.

Этап 26: Осаждение 64% этанолом

Отфильтрованный материал, полученный на этапе 25, дополнительно осаждают 96% этанолом до конечной концентрации 64% этанола. Это осаждение проводят при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Полученный осадок собирают центрифугированием и обрабатывают, как описано на этапе 27.

Этап 27: Сбор и растворение осадка:

Супернатант декантируют и удаляют, чтобы собрать осадок. Осадок растворяют в воде для инъекций при комнатной температуре.

Этап 28: Концентрирование фракции с массой более 300 кДа и диафильтрация

Раствор осадка концентрируют с использованием мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе (NMWCO) 300 кДа. Его дополнительно подвергают диафильтрации не менее чем 8 объемами воды для инъекций. Полученный ретентат обрабатывают дальше, как описано в этапе 29.

Этапы 29 и 30: Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранение очищенного PRP

Ретентат после ультрафильтрации (UF) с NMWCO 300 кДа пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм на этапе очистки, чтобы минимизировать бионагрузку. Полученный очищенный PRP разделяют на аликвоты и хранят при температуре  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  до дальнейшего использования, как описано в этапе 31. Образец очищенного PRP отправляют на анализ для контроля качества.

Этап 31: Размораживание и объединение:

В зависимости от размера партии конъюгата размораживают соответствующее количество нативного полисахарида, полученного на этапе 30. Объединенный материал анализируется на содержание PRP, которое требуется для дальнейшей обработки, как описано в этапе 32.

Этап 32: Концентрирование через UF мембрану с NMWCO 100 кДа

Объединённый очищенный полисахарид должен иметь минимальную концентрацию (8-12 мг/мл) для дальнейшей обработки. Если концентрация полисахарида в объединённом растворе ниже целевого значения, объединённый раствор полисахарида концентрируют, используя UF мембрану с NMWCO 100 кДа. Образец отбирают после концентрирования, чтобы гарантировать достижение минимальной концентрации на последующих этапах (этап 33).

Этап 33: Щелочная деполимеризация

Концентрированный полисахарид (эквивалент 74 г/110 г), полученный на этапе 32, деполимеризуют в мягких щелочных условиях с использованием карбонатно-бикарбонатного буфера. После достижения целевого размера полисахарида деполимеризованный полисахарид активируют, как описано в этапе 34.

Этап 34: Активация полисахарида

Деполимеризованный полисахарид, полученный на этапе 33, активируют с помощью бромистого циана. Активация осуществляется в азотной среде. Бромистый циан является высокотоксичным химическим веществом, и при обращении с ним следует соблюдать соответствующие меры предосторожности.

Этап 35: Присоединение линкера

Свежеприготовленный раствор дигидразида адипиновой кислоты (ADH) добавляют в течение 6-10 мин к реакционной смеси, полученной на этапе 34. Реакцию проводят в течение 16 ч при температуре 2-10°C. Роль линкера ADH заключается в создании в полисахариде аминогрупп, необходимых для реакции конъюгации.

Этап 36: Концентрирование и диафильтрация

Реакционную смесь, полученную на этапе 35, концентрируют и подвергают диафильтрации по объёму с фосфатно-солевым буфером (PBS) с использованием UF мембраны с NMWCO 10 кДа для удаления свободного ADH. Удаление ADH контролируют с помощью ВЭЖХ, и диафильтрацию продолжают до тех пор, пока уровень свободного ADH не достигнет уровня ниже 5%. Полученный ретентат дополнительно подвергают диафильтрации не менее чем буфером 5 объёмами MES-NaCl. Его дополнительно концентрируют для достижения концентрации не менее 20 мг/мл. Этот концентрированный обработанный PRP хранят при температуре 2-8°C до дальнейшего использования, как описано в этапе 37.

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

Ретентат из этапа 36 пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм, который используют на этапе очистки. Это также гарантирует, что уровни бионагрузки контролируются во время процесса, который выполняется в зоне класса С. Отфильтрованный активированный полисахарид собирают, отбирают пробы, разделяют на аликвоты и хранят при температуре 2-8°C до дальнейшей обработки. Образец отбирают из пула обработанных полисахаридов для анализа, который включает в себя определение размера молекулы PRP (кДа), содержание PRP и степень активации PRP. Дальнейшая обработка обработанного PRP описана в этапе 40.

Этап 39: Концентрирование ТТ через UF мембрану с NMWCO 10 кДа и диафильтрация

Реакция конъюгации требует двух компонентов, это обработанный полисахарид и белок-носитель (ТТ). Белок-носитель концентрируют и подвергают диафильтрации с буфером MES-NaCl с использованием UF мембраны с NMWCO 10 кДа. Этот диафильтрованный белок-носитель затем дополнительно концентрируют до концентрации не менее 20 мг/мл с использованием той же мембраны.

Этап 40: Конъюгация

Реакция конъюгации требует двух компонентов, это обработанный полисахарид и белок-носитель (ТТ). Активированный полисахаридный компонент получают на этапе 38. Белок-носитель получают на этапе 39. Два компонента смешивают в соответствующих количествах в соотношении PRP:ТТ=1:1 (мас./мас.) в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) при перемешивании. За реакцией конъюгации следят с помощью ВЭЖХ и продолжают до достижения  $\geq 85\%$  конверсии белка (конверсии свободного белка в конъюгат).

Этап 41: Остановка реакции

После того, как реакция конъюгации достигает критериев приемлемости для конверсии (этап 40), реакцию останавливают путём гашения. Реакцию конъюгации гасят, используя фосфатный буфер EDTA. Продукт реакции конъюгации затем обрабатывают, как описано в этапе 42.

Этап 42: Фильтрация через фильтр 30SP и 0,22 мкм

Конъюгат, полученный на этапе 41, фильтруют через фильтр 30SP с последующей фильтрацией через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Это гарантирует удаление любых крупных агрегатов. Отфильтрованный конъюгат обрабатывают, как описано в этапе 43.

Этап 43: Ультрафильтрация через UF мембрану с NMWCO 300 кДа и диафильтрация

Реакционную смесь конъюгации, полученную на этапе 42, подвергают диафильтрации с 0,05% физиологическим раствором, используя UF мембрану с NMWCO 300 кДа. Диафильтрацию проводят для удаления реагентов конъюгации и непрореагировавшего ТТ. Полученный ретентат далее обрабатывают, как описано в этапе 44.

Этапы 44 и 45: Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм и хранение неочищенного конъюгата

Ретентат со стадии 43 пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм, который используют на этапе очистки. Это также гарантирует, что уровни бионагрузки контролируются во время процесса, который выполняется в зоне класса С. Отфильтрованный неочищенный конъюгат собирают, отбирают пробы и хранят при температуре 2-8°C до дальнейшей обработки. Дальнейшая обработка неочищенного конъюгата описана в этапе 46.

Этап 46: Разведение неочищенного конъюгата

Неочищенный конъюгат из этапа 45 разбавляют водой для инъекций до целевой концентрации 4±1 мг/мл, если требуется, и дальнейшей обработки с помощью этапов осаждения, описанных в этапе 47.

Этап 47: Осаждение сульфатом аммония

Разбавленную реакционную смесь конъюгата дополнительно обрабатывают для удаления свободного PRP с использованием сульфата аммония (50 мас./об.% маточный раствор). Этап осаждения проводят при температуре менее 15°C при перемешивании. На этапе осаждения конъюгат выпадает в осадок, а свободный PRP остается в надосадочной жидкости. После добавления сульфата аммония полученную суспензию хранят при температуре ниже 15°C без перемешивания в течение не менее 12 ч.

Этап 48: Сбор и растворение осадка

Суспензию, полученную на этапе 47, центрифугируют при ~7000 g при температуре 2-8°C в течение 40±10 мин. Супернатант удаляют декантированием, а полученный осадок растворяют в трис-физиологическом растворе.

Этап 49: Диафильтрация через мембрану с NMWCO 300 кДа

Полученный на этапе 48 раствор фильтруют через глубинный фильтр 30SP и подвергают диафильтрации с 20 mM трис-солевым раствором с использованием мембраны с NMWCO 300 кДа.

Этап 50: Очистка при помощи гель-фильтрационной хроматографией

Раствор, полученный на этапе 49, загружают в колонку для ГФХ объемом примерно 70 л, содержащую гранулы гидроксированного метакрилового полимера Toyopearl HW-65F, для эксклюзионной хроматографии. Использование гель-фильтрационной хроматографии для обработанного конъюгата (после осаждения сульфатом аммония) снижает уровни свободного PRP в полученном материале. Колонку элюируют 20 mM Трис 0,9% NaCl и фракции собирают на основе оптической плотности A<sub>280</sub>. Фракции, соответствующие критериям приемлемости по свободному PRP, соотношению и размеру молекул, объединяют и объединенный пул далее обрабатывают, как описано в этапе 51.

Этап 51: Диафильтрация через мембрану с NMWCO 300 кДа

Полученный на этапе 50 объединенный элюат конъюгата подвергают диафильтрации с 20 mM Трис, используя UF мембрану с NMWCO 300 кДа. Этот объем ретентата рассчитан таким образом, чтобы содержание PRP в нем составляло приблизительно 1 мг/мл.

Этапы 52 и 53: Фильтрация через фильтр с размером пор 0,22 мкм

Общую массу конъюгата, полученного на этапе 51, фильтруют через фильтр с размером пор 0,22 мкм в зоне класса А для обеспечения стерильности. Фильтр с размером пор 0,22 мкм был протестирован на целостность. Пробу отфильтрованного конъюгата отправляют на контроль качества для полного анализа. Отфильтрованный конъюгат помечают как "Стерильный общий конъюгат Hib" и хранят при температуре 2-8°C. Общий конъюгат хранят при температуре 2-8°C максимум до 3 месяцев, а после этого, если он не используется, он может храниться при температуре -70°C в течение периода времени максимальной продолжительностью 1 год.

Качественные характеристики полученного конъюгированного антигена Hib PRP-TT были следующими:

Содержание PRP (мкг на 0,5 мл): 8,1

Соотношение (PRP:TT): 0,5

Свободный PRP (%): 4,8%

PMW (кДа): 983

Средняя MW (кДа): 752

Пример 3. Способ получения инактивированного антигена wP

Способ инактивации цельноклеточного коклюшного антигена:

Оптимизация способа инактивации выполняют после проведения различных экспериментов, которые включают в себя инактивацию при температуре 56°C в течение 10 мин в присутствии формальдегида, инактивацию при температуре 56°C в течение 15 мин в присутствии формальдегида, инактивацию при температуре 56°C в течение 10 мин в присутствии гимиона, инактивацию при температуре 56°C в течение 15 мин в присутствии гимиона и только нагревание при температуре 56°C в течение 30 мин. Существенной разницы в эффективности этих способов не наблюдается. Из этих способов была выбрана инактивация при температуре 56°C в течение 10 мин в присутствии формальдегида, поскольку клеточная масса коклюша, полученная с использованием этого способа, более однородна по сравнению с другими способами, упомянутыми выше.

Способ получения инаktivированного антигена wP включает в себя следующие этапы:

- а) инаktivация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штамма *Bordetella pertussis* 134
  - б) инаktivация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штамма *Bordetella pertussis* 509
  - в) инаktivация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штаммов *Bordetella pertussis* 25525 и 6229
  - г) инаktivация при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида штамма *Bordetella pertussis* 6229
  - е) последующее смешивание инаktivированных штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25.
  - ф) необязательная адсорбция на адьюванте на основе алюминия.
- В данном способе не используется тиомерсал и цельноклеточный коклюшный антиген остается не комковатым, а однородным, что приводит к снижению реактогенности и дает лучшую эффективность в течение более длительного времени.

Пример 4. Способ получения инаktivированного полиовируса (IPV)

1. Полиовирус можно выращивать следующим способом:

- а) Клеточную линию CCL81-VERO (почки обезьяны) используют в качестве клеток-хозяев для выращивания полиовирусов, то есть штаммов Sabin и Salk.
- б) После инфицирования клеток-хозяев желаемым штаммом полиовируса и инкубации в течение 72 ч среду, содержащую вирус и остатки клеток, объединяют и собирают в один контейнер.
- в) Фильтрат подвергают тангенциальной поточной фильтрации с кассетой на 100 кДа; диафильтруют с использованием фосфатного буфера и очищают с помощью анионообменной хроматографии.
- г) Перед введением пациентам вирусы должны быть инаktivированы соответствующими способами инаktivации.

2. Инаktivация формалином включает в себя следующие этапы:

- а) Очищенный объединенный пул вирусов подвергают замене буфера с фосфатного буфера на трис-буфер в диапазоне (от 30 до 50 mM) с pH от 7 до 7,5;
- б) К указанной выше смеси добавляют среду M-199, содержащую глицин (5 г/л);
- в) Добавляют 0,025% формальдегида и затем перемешивают;
- г) Затем смесь инкубируют при температуре 37°C в течение 5-13 суток при непрерывном перемешивании массы вируса на магнитной мешалке;
- д) Смесь после инкубации подвергают промежуточной тангенциальной поточной фильтрации (100 кДа, 0,1 м<sup>2</sup>) на 7 сутки и окончательной фильтрации после инаktivации;
- е) Затем отфильтрованный объем хранят при температуре 2-8°C;
- ж) Проводят определение D-Ag при помощи ИФА для определения единиц D-антигена;
- з) Общую массу моновалентного пула IPV типа 1, типа 2 и типа 3 затем смешивают с образованием трехвалентного или двухвалентного IPV (серотип Salk или Sabin);
- и) Доводят значение pH конечной композиции и получают конечную композицию с pH от 6 до 6,8;
- й) Антиген IPV (штаммы Sabin или Salk) затем добавляют к конечной композиции комбинированной вакцины в адсорбированном на адьюванте (фосфат алюминия) виде (адьювант присутствует в комбинированной вакцине), где процент адсорбции антигена IPV для IPV типа 1, как было установлено, находится в диапазон 10-30%, IPV типа 2 в диапазоне 60-100% и IPV типа 3 в диапазоне 0-25%.

3. Процедура получения IPV (штаммы Sabin и Salk) при индивидуальной адсорбции на соли алюминия:

- а) Отбирают желаемый объем автоклавированного  $AlPO_4$  для получения конечной концентрации квасцов ( $Al^{3+}$ ) от 0,1 до 0,8 мг на дозу в контейнере на 50 мл;
- б) Добавляют основную массу IPV с определенным количеством единиц D-антигена и доводят объем разбавителем (10×M-199 + 0,5% глицина);
- в) Доводят значение pH конечной композиции и получают конечную композицию с pH от 6 до 6,8.

4. Адсорбированный на квасцах моновалентный пул соответственно в трехвалентной или двухвалентной композиции IPV (серотип Salk или Sabin)

Результаты:

При этом процентная адсорбция IPV типа 1, 2 и 3 (Sabin и Salk) на соли фосфат алюминия ( $AlPO_4$ ) составила не менее 90%.

Авторы настоящего изобретения смогли добиться двукратного снижения дозы антигенов полиовируса (тогда как стандартная доза антигенов полиовируса для типа 1 - 40 DU, для типа 2 - 8DU, для типа 3 - 32DU).

Таблица 27  
Исследования адсорбции IPV штамма Sabin на фосфате алюминия

|                 | Образец                             | Титр<br>(на<br>дозу) | Вирусные<br>частицы<br>(в тыс.) | % свободных<br>в<br>супернатанте | %<br>Адсорбированных<br>на геле |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Тип 1,<br>AIPO4 | Контроль                            | 5,84                 | 691                             | Не применяется                   |                                 |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>125<br>мкг/доза | 3,49                 | 3                               | 0,43                             | 99,57                           |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>250<br>мкг/доза | 3,09                 | 1,2                             | 0,17                             | 99,83                           |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>500<br>мкг/доза | 2,94                 | 0,87                            | 0,12                             | 99,87                           |
| Тип 2,<br>AIPO4 | Контроль                            | 5,49                 | 309                             | Не применяется                   |                                 |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>125<br>мкг/доза | 3,15                 | 1,41                            | 0,45                             | 99,5                            |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>250<br>мкг/доза | 3,09                 | 1,23                            | 0,39                             | 99,6                            |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>500<br>мкг/доза | 3,09                 | 1,23                            | 0,39                             | 99,6                            |
| Тип 3,<br>AIPO4 | Контроль                            | 5,59                 | 389                             | Не применяется                   |                                 |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>125<br>мкг/доза | 5,34                 | 218                             | 56,04                            | 43,94                           |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>250<br>мкг/доза | 5,24                 | 173                             | 44,47                            | 55,53                           |
|                 | Al <sup>3+</sup><br>500<br>мкг/доза | 5,16                 | 144                             | 37,01                            | 63,9                            |

Пример 5. Способ получения комбинированной вакцины

В этом примере приводится краткое описание способа получения композиции комбинированной вакцины, содержащей D, T, wP, HBsAg, конъюгат Hib PRP-TT, IPV и консервант:

Компонент I - дифтерийный анатоксин, адсорбированный на квасцах

Компонент II - столбнячный анатоксин, адсорбированный на квасцах

Компонент III - антиген wP (как описано в примере 3)

Компонент IV - поверхностный антиген гепатита B, адсорбированный на квасцах

Компонент V - конъюгат Hib PRP (как описано в примере 2)

Компонент VI - антиген IPV (как описано в примере 4)

1. Получение компонента I, содержащего адсорбированный на квасцах дифтерийный анатоксин:

- Перенос фосфата алюминия в контейнер/емкость;
- Убавление дифтерийного анатоксина;
- Доведение значения pH до диапазона от 4,5 до 5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- Ожидание стабилизации;
- Доведение значения pH до диапазона от 5,5 до 6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия;
- Ожидание стабилизации.

2. Получение компонента II, содержащего адсорбированный на квасцах столбнячный анатоксин:

- Перенос фосфата алюминия в контейнер/емкость;
- Добавление столбнячного анатоксина;
- Доведение значения pH до диапазона от 4,5 до 5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- Ожидание стабилизации;
- Доведение значения pH до диапазона от 5,5 до 6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия;
- Ожидание стабилизации.

3. Получение компонента IV, содержащего адсорбированный на квасцах поверхностный антиген гепатита B:

- Перенос фосфата алюминия в контейнер/емкость;
- Добавление поверхностного антигена гепатита B;
- Доведение значения pH до диапазона от 4,5 до 5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- Ожидание стабилизации;
- Доведение значения pH до диапазона от 5,5 до 6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия;
- Ожидание стабилизации.

4. Способ получения композиции комбинированной вакцины, содержащей D, T, wP, HBsAg, конъюгат Hib PRP-TT, IPV и консервант.

1. Добавление физиологического раствора в емкость/контейнер для смешивания;
2. Добавление компонента I;
3. Смешивание компонента II с компонентом I и перемешивание при комнатной температуре в течение 30-45 мин;
4. Добавление компонента III в указанную выше смесь с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 30-60 мин;
5. Добавление компонента IV к смеси, полученной на этапе 4, с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 30-60 мин;
6. Добавление компонента V к смеси, полученной на этапе 5, с последующим перемешиванием при температуре 6-16°C в течение 30-60 мин;
7. Добавление компонента VI к смеси, полученной на этапе 6, с последующим перемешиванием при температуре 6-16°C;
8. Добавление к смеси, полученной на этапе 7, одной из комбинаций консервантов, описанных ниже, при температуре 6-16°C.
  - а) 2-феноксизэтанол в количестве примерно от 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.); или
  - б) 2-феноксиэтанол в количестве примерно от 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.) и метилпарабен, используемый в концентрации 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); или
  - с) 2-феноксиэтанол в количестве примерно от 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.) и пропилпарабен, используемый в концентрации 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); или
  - д) 2-феноксиэтанол в количестве примерно от 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен, используемый в концентрации 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.), и пропилпарабен, используемый в концентрации 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).
9. Проверка значения pH, при необходимости доведение значения pH до диапазона от 6,0 до 7,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия.
10. Доведение полученной на этапе 9 смеси до конечного объема физиологическим раствором (0,9%) с последующим перемешиванием в течение 3 ч.

Пример 6. Профиль адсорбции, активности и стабильности антигенов.

Таблица 28

В этой таблице приводится краткое описание процента адсорбции отдельных антигенов, профиля активности и стабильности отдельных антигенов в комбинированной вакцине SIPL при 2-8°C в течение 12 месяцев

| Показатель                                                          | Пределы/Характеристика    | День 0                               | 6 Месяцев                         | 12 Месяцев         |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Гепатит В in-vivo активность *R.P (95% **CL)                        | (0,61-1,12)               | 0,83                                 | н.д.                              | Соответствует      |
| Содержание Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Всего PRP)                         | Фактическое значение      | 9,3 мкг/0,5 мл                       | 8,46 мкг/0,5 мл                   | 10,03              |
| Свободный PRP (%)                                                   |                           | 8                                    | н.д.                              | н.д.               |
| Активность дифтерийного компонента (ME на дозу)                     | Не менее 30 ME на дозу.   | 98,5120 ME на дозу (69,9650-137,247) | н.д.                              | 95,8463 ME на дозу |
| Активность столбнячного компонента (ME на дозу)                     | Не менее 40 ME на дозу    | 139,030 ME на дозу (88,2850-208,688) | н.д.                              | 382,079 ME на дозу |
| Активность коклюшного компонента (ME на дозу)                       | Не менее 4 ME на дозу     | 4,6749 ME на дозу (2,6492-8,2763)    | 4,8410 ME на дозу (2,7331-8,6081) | 5,131              |
| Адсорбция гепатита-В (%)                                            | Фактическое значение      | 89,44                                | 82,65                             | 75,52              |
| Адсорбция столбнячного компонента (%)                               | Фактическое значение      | 63,0                                 | 59,0                              | н.д.               |
| Адсорбция дифтерийного компонента (%)                               | Фактическое значение      | 81,0                                 | 72,0                              | н.д.               |
| D-антиген (DU на 0,5 мл) (= 75% от номинального значения приемлемо) | Тип 1= 20 DU на 0,5 мл    | 22,414                               | Соответствует                     | Соответствует      |
|                                                                     | Тип 2= 4 DU на 0,5 мл     | 4,692                                | Соответствует                     | Соответствует      |
|                                                                     | Тип 3= 16 DU на 0,5 мл    | 22,084                               | Соответствует                     | Соответствует      |
| Общее содержание алюминия                                           | Не более 0,6 мг на 0,5 мл | 0,2768                               | н.д.                              | н.д.               |

\*R.P - Относительная активность

\*\*CL - Уровень достоверности

н.д. - Нет данных

Таблица 29

Краткое описание процента адсорбции отдельных антигенов, профиля активности и стабильности отдельных антигенов в комбинированной вакцине при температуре 25±2°C в течение 12 месяцев

| Показатель                                                          | Пределы/<br>Характеристика | День 0                               | 6 Месяцев                         | 12 Месяцев                           |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Гепатит В in-vivo активность *R.P (95% **CL)                        | Не менее 1.0               | Соответствует                        | н.д.                              | Соответствует                        |
| Содержание Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Всего PRP)                         | Фактическое значение       | 8.6 мкг/0,5 мл                       | 8.20 мкг/0,5 мл                   | н.д.                                 |
| Активность дифтерийного компонента (ME на дозу)                     | Не менее 30 ME на дозу.    | 98.5120 ME на дозу (69.9650-137.247) | н.д.                              | 96.5482 ME на дозу (65.9292-137.687) |
| Активность столбнячного компонента (ME на дозу)                     | Не менее 40 ME на дозу     | 139.030 ME на дозу (88.2850-208.688) | н.д.                              | н.д.                                 |
| Активность коклюшного компонента (ME на дозу)                       | Не менее 4 ME на дозу      | 4.6749 ME на дозу (2.6492-8.2763)    | 4.5170 ME на дозу (2.4894-8.2672) | 3.4899 ME на дозу (1.8699*-6.4750)   |
| Адсорбция гепатита-В (%)                                            | Фактическое значение       | 89.44                                | 83.92                             | 83.00                                |
| Адсорбция столбнячного компонента (%)                               | Фактическое значение       | 59.0                                 | 31.0                              | 40.0                                 |
| Адсорбция дифтерийного компонента (%)                               | Фактическое значение       | 79.0                                 | 72.0                              | 69.0                                 |
| D-антиген (DU на 0,5 мл) (= 75% от номинального значения приемлемо) | Тип 1= 20 DU на 0,5 мл     | 22.414                               | Соответствует                     | Соответствует                        |
|                                                                     | Тип 2= 4 DU на 0,5 мл      | 4.692                                | Соответствует                     | Соответствует                        |
|                                                                     | Тип 3= 16 DU на 0,5 мл     | 22.082                               | Соответствует                     | Соответствует                        |
| Общее содержание алюминия                                           | Не более 0,6 мг на 0,5 мл  | 0.2846                               | н.д.                              | н.д.                                 |

н.д. - Нет данных

Таблица 30

Эффективность комбинированной вакцины с пониженной и стандартной дозой IPV in vivo

| № п.п. | Описание                        | Полиовирус типа 1 |               |                | Полиовирус типа 3 |               |                | Результат |
|--------|---------------------------------|-------------------|---------------|----------------|-------------------|---------------|----------------|-----------|
|        |                                 | Эффективность     | Нижний предел | Верхний предел | Эффективность     | Нижний предел | Верхний предел |           |
| 1      | Шестивалентная с 40-8-32 DU IPV | 253,3 %           | 124,9 %       | 705,6 %        | 212,2 %           | 95,3 %        | 755,5 %        | Приемлем  |
| 2      | Шестивалентная с 20-4-16 DU IPV | 164,4 %           | 63,9 %        | 571,3 %        | 143,2 %           | 64,3 %        | 418,6 %        | Приемлем  |
| 3      | Шестивалентная с 20-4-16 DU IPV | 170,0 %           | 76,4 %        | 472,5 %        | 132,3 %           | 62,6 %        | 340,5 %        | Приемлем  |
| 4      | Poliovac с полной дозой IPV     | 98,5%             | 30,9%         | 279,4          | 122,8             | 57,3%         | 269,8%         | Приемлем  |

### Результаты

Партии гексавалентной вакцины, изготовленные с половинной концентрацией IPV, в испытаниях показали многообещающие результаты.

In vivo эффективность IPV шестивалентной вакцины, произведенной с половинной концентрацией IPV, оказалась сопоставимой с доступной в настоящее время вакциной (Poliovac на рынке, производимой SIPL) с полной дозой IPV.

#### Пример 7. Испытание антимикробных свойств

Авторы настоящего изобретения при разработке многодозовых комбинированных вакцин, содержащих вакцины D, T, wP, Hib, HBsAg и IPV, провели испытания их антимикробных свойств, добавив сначала 2-феноксиэтанол (2-PE), который обычно используется в качестве консерванта в данной области техники в концентрации 2,5 мг на 0,5 мл дозы. Однако было обнаружено, что 2-РЕ имеет более слабую антимикробную активность, чем тиомерсал, против дрожжей и грибов в комбинированной вакцине на основе DPT.

Увеличение количества 2-РЕ (консерванта) до соответствия требуемым критериям может вызвать проблемы с безопасностью у маленьких детей, которым вводят вакцину, а также может повлиять на стабильность конечных продуктов. Кроме того, количество консерванта(ов), содержащегося в вакцинах, должно соответствовать требованиям, определенным в Фармакопее США, Европейской фармакопее, Фармакопее ВОЗ или их комбинации в отношении безопасности вакцин.

В связи с этим авторы настоящего изобретения провели эксперименты с целью разработки новой

композиции, которая может удовлетворить требования по антимикробной активности за счет объединения 2-РЕ с другим консервантом, таким как парабен, в многодозовой комбинированной вакцине, которая отвечает критериям безопасности и антимикробной активности. В настоящем изобретении тест на антимикробную активность был проведен в соответствии с критериями Европейской фармакопеи категории В (ЕР-В), запрошенными ВОЗ для вакцинных продуктов.

Таблица 31

Подробная информация о различных комбинациях и концентрациях консервантов, протестированных с комбинированной вакциной

| Комбинации           | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Метилпарабен (MP)    | --   | 0,18% | 0,18% | 0,18% | --    | 0,18% |
| Пропилпарабен (PP)   | --   | 0,02% | 0,02% | --    | 0,02% | 0,02% |
| 2-феноксиэтанол (PE) | 0,5% | 0,5%  | 0,4%  | 0,5%  | 0,5%  | --    |

### Скрининг антимикробной эффективности

Препараты гексавалентной комбинированной вакцины, описанные в примере 1, были инокулированы в общей сложности шестью микроорганизмами, включая четыре различных вида бактерий - *Staphylococcus aureus* (ATCC NO.- 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC NO.- 9027), *Escherichia coli* (ATCC NO.- 8739) и *Staphylococcus arlettae* (изолят объектов внешней среды EMI); один дрожжевой грибок - *Candida albicans* (ATCC NO.- 10231) и один гриб - *Aspergillus brasiliensis* (ATCC NO.- 16404) в количестве от  $10^5$  до  $10^6$  КОЕ/мл в препараты вакцины в 0 ч соответственно. Затем образцы бактерий, грибов, дрожжей собирали через 0, 24 ч, 7, 14 и 28 дней, культивировали в твердой среде, подсчитывали количество колоний между 3 и 5 днями и подсчитывали логарифмически уменьшенное количество колоний. Результаты показаны ниже в табл. 38.

Таблица 32

Результаты тестирования антимикробной эффективности

| № п.п.                                          | Культура         | Выделено КОЕ / мл<br>положительного<br>контроля (0<br>часов) | Кол-во выделенных КОЕ/мл |                        |                         |                         | Результаты |
|-------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|
|                                                 |                  |                                                              | 24 ч                     | 7 <sup>я</sup><br>день | 14 <sup>я</sup><br>день | 28 <sup>я</sup><br>день |            |
| Комбинация 1<br>0,5% 2РЕ                        | S.aureus         | 2 X 10 <sup>5</sup> /мл                                      | 87000                    | 900                    | 0                       | -                       | Приемлем   |
|                                                 | P.aeruginosa     | 1.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 28000                    | 100                    | 0                       | -                       |            |
|                                                 | E.coli           | 10 X 10 <sup>5</sup> /мл                                     | 9000                     | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | S.arlettae (EMI) | 2.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 114000                   | 1600                   | 100                     | 0                       |            |
|                                                 | C.albicans       | 1.9 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 400                    | 0                       | -                       |            |
|                                                 | A.brasiliensis   | 2.4 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 1600                   | 100                     | 0                       |            |
| Комбинация 2<br>0,5%<br>2РЕ+0,18%MP+0,0<br>2%PP | S.aureus         | 2 X 10 <sup>5</sup> /мл                                      | 0                        | -                      | -                       | -                       | Приемлем   |
|                                                 | P.aeruginosa     | 1.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 0                        | -                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | E.coli           | 10 X 10 <sup>5</sup> /мл                                     | 0                        | -                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | S.arlettae (EMI) | 2.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 0                        | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | C.albicans       | 1.9 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | A.brasiliensis   | 2.4 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
| Комбинация 3<br>0,4%<br>2РЕ+0,18%MP+0,0<br>2%PP | S.aureus         | 2 X 10 <sup>5</sup> /мл                                      | 10                       | 0                      | -                       | -                       | Приемлем   |
|                                                 | P.aeruginosa     | 1.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 0                        | -                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | E.coli           | 10 X 10 <sup>5</sup> /мл                                     | 0                        | -                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | S.arlettae (EMI) | 2.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 10                       | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | C.albicans       | 1.9 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | A.brasiliensis   | 2.4 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
| Комбинация 4<br>0,5%<br>2РЕ+0,18%MP             | S.aureus         | 2 X 10 <sup>5</sup> /мл                                      | 10                       | 0                      | -                       | -                       | Приемлем   |
|                                                 | P.aeruginosa     | 1.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 170                      | 10                     | 0                       | -                       |            |
|                                                 | E.coli           | 10 X 10 <sup>5</sup> /мл                                     | 0                        | -                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | S.arlettae (EMI) | 2.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 20                       | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | C.albicans       | 1.9 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | A.brasiliensis   | 2.4 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
| Комбинация 5<br>0,5%<br>2РЕ+0,02%PP             | S.aureus         | 2 X 10 <sup>5</sup> /мл                                      | 20                       | 0                      | -                       | -                       | Приемлем   |
|                                                 | P.aeruginosa     | 1.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 0                        | -                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | E.coli           | 10 X 10 <sup>5</sup> /мл                                     | 10                       | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | S.arlettae (EMI) | 2.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 100                      | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | C.albicans       | 1.9 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 0                      | -                       | -                       |            |
|                                                 | A.brasiliensis   | 2.4 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 10                     | 0                       | -                       |            |
| Комбинация 6<br>0,18%MP+0,02<br>%PP             | S.aureus         | 2 X 10 <sup>5</sup> /мл                                      | 70000                    | 700                    | 0                       | -                       | Приемлем   |
|                                                 | P.aeruginosa     | 1.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 21000                    | 0                      | 0                       | -                       |            |
|                                                 | E.coli           | 10 X 10 <sup>5</sup> /мл                                     | 6000                     | 0                      | 0                       | -                       |            |
|                                                 | S.arlettae (EMI) | 2.8 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | 101000                   | 900                    | 0                       | -                       |            |
|                                                 | C.albicans       | 1.9 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 100                    | 0                       | -                       |            |
|                                                 | A.brasiliensis   | 2.4 X 10 <sup>5</sup> /мл                                    | н.д.                     | 700                    | 0                       | -                       |            |

н.д. - Нет данных; 0.5% 2РЕ - 2,5 мг/0,5 мл дозы; 0.4% 2РЕ - 2 мг/0,5 мл дозы; 0.18%MP - 0.9 мг/0,5 мл дозы; 0.02%PP - 0.1 мг/0,5 мл дозы; КОЕ - колониеобразующая единица.

### Результаты

Было обнаружено, что все шестивалентные вакцины, произведенные в различных комбинациях, соответствовали консервирующей эффективности согласно Европейской фармакопейной категории В. Однако было обнаружено, что эффективность варьировала при использовании различных комбинаций.

Консервирующая эффективность шестивалентной вакцины, содержащей 2РЕ, МР и РР, оказалась очень эффективной по сравнению с другими комбинациями консервантов, а именно только 2РЕ, 2РЕ с РР, 2РЕ с МР и РР с МР.

Также было отмечено, что консервирующая эффективность шестивалентной вакцины, содержащей 0,5% 2РЕ с РР и МР, оказалась более эффективной по сравнению с такими же комбинациями, но с 0,4% 2РЕ.

Пример 8. Сравнение комбинированной вакцины SIPL с уменьшенной дозой с вакциной Easy Six (Panacea)

Таблица 33

В этой таблице представлено сравнение процента адсорбции отдельных антигенов, активности, содержания свободного РРР между комбинированной вакциной с уменьшенной дозой SIPL и вакциной Easy Six (Panacea)

| Описание теста                       | Шестивалентная вакцина SIPL с уменьшенной дозой IPV | Комбинированная вакцина Panacea Easy-Six™ с полной дозой IPV |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Активность HB in vitro (мкг/мл)      | 46,969                                              | 23,167                                                       |
| Адсорбция HB (%)                     | 91,8                                                | Более 90,0                                                   |
| Активность HB in vivo                | 1,18                                                | 0,71(0,42-1,13)                                              |
| Общее содержание РРР (мкг/0,5 мл)    | 9,18                                                | 13,20                                                        |
| Свободный РРР (%)                    | 9,0                                                 | 19,45                                                        |
| Свободный формальдегид мас./об.) (%) | 0,0011                                              | 0,0011                                                       |
| 2-РЕ (% мас./об.)                    | 0,499                                               | 0,660                                                        |
| Адсорбция дифтерии (%)               | 82                                                  | 38                                                           |
| Адсорбция столбняка (%)              | 63                                                  | 30                                                           |
| Тип 1 (DU/0,5 мл)                    | 22,414                                              | 43,504                                                       |
| Тип 2 (DU/0,5 мл)                    | 4,692                                               | 8,056                                                        |
| Тип 3 (DU/0,5 мл)                    | 22,084                                              | 39,84                                                        |
| Алюминий (мг/доза)                   | 0,2846                                              | 0,6034                                                       |
| Эффективность in vivo IPV Тип-1      | 170,0%                                              | Не проверялось                                               |
| IPV Тип-3                            | 132,3%                                              |                                                              |
| Активность дифтерийного компонента   | 98,5120 МЕ/доза (69,9650-137,247)                   | Более 40                                                     |
| Активность столбнячного компонента   | 139,030 МЕ/доза (88,2850-208,688)                   | Более 50                                                     |
| Активность коклюшного компонента     | 4,6749 МЕ/доза (2,6492-8,2763)                      | 3,2221(1,8032-5,7706)                                        |

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полностью жидкая многодозовая иммуногенная композиция, в которой 0,5 мл композиции содержит:

(i) дифтерийный анатоксин (D) в количестве от 10 до 25 Lf, адсорбированный на адъюванте соли алюминия, имеющей процент адсорбции по меньшей мере 50%;

(ii) столбнячный анатоксин (T) в количестве от 2 до 10 Lf, адсорбированный на адъюванте соли алюминия, имеющей процент адсорбции по меньшей мере 40%;

(iii) инактивированный цельноклеточный коклюш (wP), содержащий инактивированные штаммы *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25 в количестве от 12 до 16 IOU;

(iv) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 7 до 15 мкг, адсорбированный на адъюванте соли алюминия, имеющей процент адсорбции по меньшей мере 50%;

(v) антиген типа b (Hib) *Haemophilus influenzae* в количестве от 7 до 13 мкг;

(vi) инактивированный антиген полиовируса (IPV), содержащий IPV типа 1 в количестве 1-25 DU, IPV типа 2 в количестве 1-10 DU и IPV типа 3 присутствует в количестве 1-20 DU; и

(vii) общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) в композиции составляет от 0,1 до 0,6 мг и

(viii) консервант, содержащий

2-феноксиэтанол в количестве 1-6 мг (об./об.);

метилпарабен в количестве 0,1-1,5 мг (мас./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05-0,2 мг (мас./об.);

или

2-феноксиэтанол в количестве 1-6 мг (об./об.) и метилпарабен в количестве 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); или

2-феноксиэтанол в количестве 1-6 мг (об./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05-0,2 мг (мас./об.).

2. Иммуногенная композиция по п.1, где антиген Hib представляет собой полисахарид полирибозилрибитолфосфат (PRP) Hib, конъюгированный с белком-носителем с использованием химии конъюгации путём цианилирования или химии конъюгации путём восстановительного аминирования, где ука-

занный реагент цианилирования выбран из бромистого циана, тетрафторборат 1-циано-4-диметиламинопиридиния (CDAP), тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT), 1-цианоимидазола, а именно (1-CI), 1-цианобензотриазола (1-CBT) или 2-цианопиридазин-3(2H)-она (2-CPO); и белок-носитель выбран из группы, включающей в себя столбнячный анатоксин, CRM<sub>197</sub>, дифтерийный анатоксин, комплекс внешней мембраны *Neisseria meningitidis*, фрагмент С столбнячного анатоксина, коклюшный анатоксин, белок D *H. influenzae*, LT *E. coli*, ST *E. coli* и экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс внешней мембраны с (OMPС), порины, трансферринсвязывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, защитный антиген (РА) *Bacillus anthracis* и детоксифицированный фактор, вызывающий отек, (ЕF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH), сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин (BSA) и очищенное производное туберкулина (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множественные CD4<sup>+</sup> Т-клеточные эпитопы человека для различных патогенных антигенов, таких как N 19, белки захвата железа, токсин А или В из белков *C. difficile* и *S. agalactiae* с линкером или без него.

3. Иммуногенная композиция по п.1, где антигены IPV представляют собой штаммы Salk, выбранные из группы, состоящей из штаммов Mahoney, MEF-1, Saukett или штаммы Sabin, выбранные из группы, состоящие из штаммов группы Sabin типа 1, Sabin типа 2 или Sabin типа 3.

4. Иммуногенная композиция по п.1, где D, Т и HBsAg индивидуально адсорбируются на адьюванте соли алюминия (Al<sup>3+</sup>), выбранном из гидроксида алюминия (Al(OH)<sub>3</sub>) и фосфата алюминия (AlPO<sub>4</sub>).

5. Иммуногенная композиция по п.1, где антигены IPV адсорбированы на алюминиевой соли фосфата (AlPO<sub>4</sub>), а процент адсорбции IPV типа 1 находится в диапазоне от 10 до 100%, IPV типа 2 находится в диапазоне от 60 до 100%, а IPV типа 3 находится в диапазоне от 10 до 100%.

6. Иммуногенная композиция по п.1, где процент адсорбции антигена Hib на адьюванте составляет менее 20%.

7. Иммуногенная композиция по п.1, где композиция дополнительно содержит разбавляющую среду или буфер, выбранный из хлорида натрия или фосфатно-солевого буфера.

8. Иммуногенная композиция по п.7, где композиция содержит хлорид натрия в качестве разбавляющей среды или в качестве буфера в концентрации от 0,5 до 1,5%.

9. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержит один из следующих составов:

а) антиген D в количестве 10 Lf; антиген Т в количестве 2 Lf; антиген wP в количестве 12 IOU; HBsAg в количестве 8 мкг; антиген Hib в количестве 8 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 20 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 16 DU соответственно; общее содержание алюминия (Al<sup>3+</sup>) не более 0,55 мг; 2-феноксизтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); или

б) антиген D в количестве 20 Lf; антиген Т в количестве 4 Lf; антиген wP в количестве 14 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 10 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 20 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 16 DU соответственно; общее содержание алюминия (Al<sup>3+</sup>) не более 0,55 мг; 2-феноксизтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); или

с) антиген D в количестве 25 Lf; антиген Т в количестве 10 Lf; антиген wP в количестве 16 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; Ib-антиген Hib в количестве 13 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 20 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 16 DU соответственно; общее содержание алюминия (Al<sup>3+</sup>) не более 0,55 мг; 2-феноксизтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.).

10. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержит один из следующих составов:

а) антиген D в количестве 10 Lf; антиген Т в количестве 2 Lf; антиген wP в количестве 12 IOU; HBsAg в количестве 8 мкг; антиген Hib в количестве 8 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 20 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 4 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 16 DU, соответственно; общее содержание алюминия (Al<sup>3+</sup>) не более 0,55 мг; 2-феноксизтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); или

б) антиген D в количестве 20 Lf; антиген Т в количестве 4 Lf; антиген wP в количестве 14 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 10 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 20 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 4 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 16 DU соответственно; общее содержание алюминия (Al<sup>3+</sup>) не более 0,55 мг; 2-феноксизтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); или

с) антиген D в количестве 25 Lf; антиген Т в количестве 10 Lf; антиген wP в количестве 16 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 13 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 20 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 4 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 16 DU соответственно; общее содержание алюминия (Al<sup>3+</sup>) не более 0,55 мг; 2-феноксизтанол в количестве 2,5





HBsAg в количестве 8 мкг; антиген Hib в количестве 8 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 1,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.); или

б) антиген D в количестве 20 Lf; антиген T в количестве 4 Lf; антиген wP в количестве 14 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 10 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 1,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.); или

с) антиген D в количестве 25 Lf; антиген T в количестве 10 Lf; антиген wP в количестве 16 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 13 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 40 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 8 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 32 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.).

19. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержит один из следующих составов:

а) антиген D в количестве 10 Lf; антиген T в количестве 2 Lf; антиген wP в количестве 12 IOU; HBsAg в количестве 8 мкг; антиген Hib в количестве 8 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.); или

б) антиген D в количестве 20 Lf; антиген T в количестве 4 Lf; антиген wP в количестве 14 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 10 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.); или

с) антиген D в количестве 25 Lf; антиген T в количестве 10 Lf; антиген wP в количестве 16 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 13 мкг; антиген IPV тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.).

20. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержит один из следующих составов:

а) антиген D в количестве 10 Lf; антиген T в количестве 2 Lf; антиген wP в количестве 12 IOU; HBsAg в количестве 8 мкг; антиген Hib в количестве 8 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 1,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.); или

б) антиген D в количестве 20 Lf; антиген T в количестве 4 Lf; антиген wP в количестве 14 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; антиген Hib в количестве 10 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 1,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.); или

с) антиген D в количестве 25 Lf; антиген T в количестве 10 Lf; антиген wP в количестве 16 IOU; HBsAg в количестве 15 мкг; Ib-антиген Hib в количестве 13 мкг; антиген IPV, тип 1 (штамм Mahoney) в количестве 7,5 DU, тип 2 (штамм MEF-1) в количестве 1,5 DU и тип 3 (штамм Saukett) в количестве 6 DU соответственно; общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) не более 0,55 мг; 2-феноксиэтанол в количестве 2,5 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,9 мг (мас./об.); пропилпарабен в количестве 0,1 мг (мас./об.).

21. Способ получения полностью жидкой многодозовой иммуногенной композиции, в которой 0,5 мл композиции содержит:

(i) дифтерийный анатоксин (D) в количестве от 10 до 25 Lf, адсорбированный на адьюванте соли алюминия, имеющей процент адсорбции по меньшей мере 50%;

(ii) столбнячный анатоксин (T) в количестве от 2 до 10 Lf, адсорбированный на адьюванте соли алюминия, имеющей процент адсорбции по меньшей мере 40%;

(iii) инактивированный цельноклеточный коклюш (wP), содержащий инактивированные штаммы Bordetella pertussis 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25 в количестве от 12 до 16 IOU;

(iv) поверхностный антиген вируса гепатита B (HBsAg) в количестве от 7 до 15 мкг, адсорбированный на адьюванте соли алюминия, имеющей процент адсорбции по меньшей мере 50%;

(v) антиген типа b (Hib) Haemophilus influenzae в количестве от 7 до 13 мкг;

(vi) инактивированный антиген полиовируса (IPV), содержащий IPV типа 1 в количестве 1-25 DU, IPV типа 2 в количестве 1-10 DU и IPV типа 3 присутствует в количестве 1-20 DU;

- (vii) общее содержание алюминия ( $Al^{3+}$ ) в композиции составляет от 0,1 до 0,6 мг и
- (viii) консервант, содержащий
- 2-феноксиэтанол в количестве 1-6 мг (об./об.); метилпарабен в количестве 0,1-1,5 мг (мас./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05-0,2 мг (мас./об.); или
- 2-феноксиэтанол в количестве 1-6 мг (об./об.) и метилпарабен в количестве 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); или
- 2-феноксиэтанол в количестве 1-6 мг (об./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05-0,2 мг (мас./об.);
- данный способ включает в себя следующие этапы:
- добавление 80% от общей массы физиологического раствора (NaCl) в емкость/контейнер для смешивания;
  - добавление компонента I, содержащего дифтерийный анатоксин в емкость/контейнер для смешивания;
  - добавление компонента II, содержащего столбнячный анатоксин в компонент I по этапу (b) с перемешиванием при комнатной температуре;
  - добавление компонента III, содержащего инактивированный цельноклеточный коклюшный антиген, в смесь, полученную на этапе (c) с перемешиванием при комнатной температуре;
  - добавление компонента IV, содержащего поверхностный антиген гепатита В, в смесь, полученную при этапе (d) при комнатной температуре;
  - добавление компонента V, содержащего антиген Hib, в смесь, полученную при этапе (e) при 6-16°C;
  - добавление компонента VI, содержащего антиген IPV, в смесь, полученную при этапе (f) при 6-16°C;
  - добавление комбинации консервантов в смесь, полученную при этапе (g) при 6-16°C, выбранную из
    - 2-феноксиэтанола в количестве от 1 до 6 мг на 0,5 мл (об./об.) и метилпарабена в количестве от 0,1 до 1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); или
    - 2-феноксиэтанола в количестве от 1 до 6 мг на 0,5 мл (об./об.) и пропилпарабена в количестве 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); или
    - 2-феноксиэтанола в количестве от 1 до 6 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабена в количестве 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) и пропилпарабена в количестве 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.);
  - доведение значения pH смеси, полученной при этапе (h) до значения 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и
  - добавление оставшихся 20% от общего количества физиологического раствора (NaCl) для доведения объема при перемешивании.
22. Способ по п.21, отличающийся тем, что получение компонента I включает в себя следующие этапы:
- перенос фосфата алюминия в контейнер/емкость;
  - добавление дифтерийного анатоксина;
  - доведение значения pH до 4,5-5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
  - стабилизация;
  - доведение значения pH до 5,5-6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и
  - стабилизация гистидиновым буфером.
23. Способ по п.21, отличающийся тем, что получение компонента II включает в себя следующие этапы:
- перенос фосфата алюминия в контейнер/емкость;
  - добавление столбнячного анатоксина;
  - доведение значения pH до 4,5-5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
  - стабилизация;
  - доведение значения pH до 5,5-6,5 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и
  - стабилизация гистидиновым буфером.
24. Способ по п.21, отличающийся тем, что получение компонента III включает в себя следующие этапы, такие как:
- инактивация штамма *Bordetella pertussis* 134 при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида;
  - инактивация штамма *Bordetella pertussis* 509 при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида;
  - инактивация штамма *Bordetella pertussis* 25525 при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида;
  - инактивация штамма *Bordetella pertussis* 6229 при температуре 56°C в течение 10-15 мин в присутствии формальдегида;
  - последующее смешивание инактивированных штаммов *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 и 6229 в соотношении 1:1:0,25:0,25 и

f) необязательная адсорбция на адьюванте на основе алюминия;  
при этом в способе не используется тиомерсал и инактивированный цельноклеточный коклюшный антиген остается не комковатым, а однородным, что приводит к снижению реактогенности и дает лучшую эффективность в течение более длительного времени.

25. Способ по п.21, отличающийся тем, что получение компонента IV включает в себя следующие этапы:

- a) перенос фосфата алюминия в контейнер/емкость;
- b) добавление поверхностного антигена гепатита В;
- c) доведение значения pH до 4,5-5,5 с помощью уксусной кислоты/гидроксида натрия;
- d) стабилизация;
- e) доведение значения pH до 5,8-6,8 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и
- f) стабилизация.

26. Способ по п.21, отличающийся тем, что получение компонента V включает в себя следующие этапы:

- a) ферментация *Haemophilus influenzae* типа b;
  - b) инактивация при температуре 37°C в течение 2 ч в присутствии 0,1% формальдегида;
  - c) очистка Hib полирибозилрибитолфосфата (PRP) полисахарида;
  - d) конъюгирование очищенного продукта этапа со столбнячным анатоксином (ТТ) с использованием химии конъюгации цианилирования цианогенбромида в присутствии линкера дигидразида адипиновой кислоты (ADH);
  - e) очистка конъюгата этапа d и
  - f) фильтрация очищенного конъюгата предпочтительно через фильтр с размером пор 0,22 мкм;
- при этом процентное содержание свободного PRP составляет не более 5% от общего количества очищенного конъюгата Hib.

