

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290736** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.27

(51) Int. Cl. *A61K 39/112* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.02

(54) ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 201921035435

(32) 2019.09.03

(33) IN

(86) PCT/IN2020/050763

(87) WO 2021/044436 2021.03.11

(88) 2021.05.27

(71) Заявитель:
**СЕРУМ ИНСТИТУТ ОФ ИНДИЯ
ПРАЙВАТ ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:

**Дхере Раджив Мхаласакант, Писал
Самбхаджи Шанкар, Аннамраджу
Даттатрея Сарма, Аваласкар
Нихил Даттатрай, Хундекари
Йогеш Тукарам, Такликар Анил
Пираджиро, Гоэль Сунил Кумар,
Камат Чандрашекхар Дварканатх,
Чаван Вишал Бхарат (IN)**

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Изобретение относится к новым иммуногенным моновалентным и мультивалентным вакцинным композициям конъюгатов полисахарид-белок, содержащих полисахарид, выбранный из штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S.paratyphi A*; *S.typhimurium* и *S.enteritidis*, а также альтернативным улучшенным способом ферментации полисахарида, очистки полисахарида, конъюгации полисахарида-белка и стабильной композиции. Настоящее изобретение также относится к способам индуцирования у субъектов иммунного ответа против *Salmonella typhi* и нетифоидных заболеваний и/или для уменьшения тяжести или предотвращения заболеваний, вызываемых *Salmonella typhi*, и нетифоидных заболеваний, у субъектов с использованием композиций, раскрытых в настоящем изобретении. Вакцина обеспечивает выработку бактерицидных антител и применима для предотвращения гастроэнтерита, брюшного тифа и тифоидной лихорадки.

A1

202290736

202290736

A1

ИММУНОГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области производства вакцин, в частности, к иммуногенной композиции для профилактики инфекций, вызываемых *Salmonella*, и нетифоидных сальмонеллезных инфекций, а также к способам её получения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Базовая информация, приведенная ниже, относится к настоящему изобретению, но не обязательно является предшествующим уровнем техники.

Сальмонеллезная инфекция остается серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, особенно в развивающихся странах, от которой ежегодно страдают миллионы людей. Сальмонеллезная инфекция может вызвать энтерит, который может осложниться бактериемией (кишечная лихорадка) и гастроэнтеритом как у здоровых людей, так и у людей с ослабленным иммунитетом.

Род *Salmonella* принадлежит к семейству Enterobacteriaceae и включает в себя грамотрицательные, не образующие спор, факультативные анаэробные палочки. *Salmonella enterica* серовар *typhi* (*S. typhi*) и *Salmonella enterica* серовар *paratyphi* (*S. paratyphi*) А и В вызывают брюшной тиф, системное лихорадочное заболевание, возникающее только у людей, которое отличается от более часто самокупирующегося острого гастроэнтерита, вызываемого другими многочисленными серотипами сальмонелл. Брюшной тиф, вызываемый представителями рода *Salmonella*, включая *typhi* и *paratyphi*, по-прежнему является серьезной причиной болезней и смертности среди населения в развивающихся странах (Lancet 2005; 366:749-762) и представляет значительный риск для путешественников (Lancet Infect Dis. 2005;5(10):623-628). Брюшной тиф остается эндемичным заболеванием в странах с низким и средним уровнем дохода (СНСД). От 12,5 до 20,6 миллионов случаев брюшного тифа ежегодно происходит в СНСД, особенно в Южной Азии и странах Африки к югу от Сахары (Lancet Glob Heal. 2014; 2: e570-e580 и J Glob Health. 2012; 2: 10401). *Salmonella paratyphi* является причиной увеличения доли кишечных инфекций в некоторых частях Азии, в том числе в Непале, Камбодже и Китае. *Salmonella paratyphi* имеет наибольшее распространение на Индийском субконтиненте и в Юго-Восточной Азии. В одном из исследований в Непале, где брюшной тиф является крайне эндемичным, было обнаружено, что городская вода заражена как *S. typhi*, так и *Salmonella enterica* серовар *paratyphi* А (PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan; 10(1):e0004346 и PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(8):e2391).

Нетифоидные серовары *Salmonella enterica* (NTS) являются важными причинами инвазивного заболевания сальмонеллами во всем мире. Из более чем 2500 сероваров NTS на серовары NTS *typhimurium* и *enteritidis* приходится почти 80 процентов всех человеческих изолятов NTS, зарегистрированных во всем мире. Кроме того, инвазивные нетифоидные сальмонеллезные инфекции (iNTS), вызываемые сероварами *enteritidis* (SE) и *typhimurium* (STm),

вызывают серьезные проблемы со здоровьем у детей в странах Африки к югу от Сахары. В последнее время NTS все чаще признается основной причиной инвазивных бактериальных инфекций у маленьких детей и лиц с ослабленным иммунитетом, а также пожилых людей во всем мире. Эти два серовара также являются основной причиной гастроэнтерита у здоровых детей и взрослых в промышленно развитых странах. NTS также могут вызывать тяжелую внекишечную инвазивную бактериемию, которая называется iNTS. Обычно она проявляется лихорадочным состоянием. Фактически, iNTS часто протекает без желудочно-кишечных симптомов как у взрослых, так и у детей.

Из более чем 2500 нетифоидных сероваров *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар *typhimurium* (*S. typhimurium*) и *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* (*S. enteritidis*) составляют почти 80% всех зарегистрированных в мире изолятов NTS человека. В последнее время NTS все чаще признается основной причиной инвазивных бактериальных инфекций у детей раннего возраста и ВИЧ-инфицированных людей в странах Африки к югу от Сахары, а также у пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом во всем мире.

По оценкам, глобальная заболеваемость гастроэнтеритом, вызванным NTS, в 2010 г. составила 93 миллиона случаев, около 80,3 миллиона из которых были переданы через пищевые продукты, при этом 155000 человек погибли. Экономическое бремя NTS является значительным в развитых странах. Только в Соединенных Штатах борьба с NTS обходится в 3,3 миллиарда долларов США в год, при этом теряется 17000 лет качественной жизни, что больше, чем у любого пищевого патогена. Как упоминалось ранее, NTS также может вызывать тяжелую внекишечную инвазивную бактериемию, которая называется iNTS. Инвазивные инфекции сальмонелл чаще встречаются в развивающихся странах и стали наиболее распространенной причиной бактериемии в тропической Африке, особенно среди детей младшего возраста и людей с ВИЧ. Обычно они проявляются лихорадочным заболеванием. Фактически, iNTS часто протекает без желудочно-кишечных симптомов как у взрослых, так и у детей. Симптомы iNTS похожи на малярию и включают в себя лихорадку и потливость (более 90 процентов), а также спленомегалию (40 процентов). Неясно, почему iNTS является такой проблемой в Африке, но это может быть связано с: повышенной инвазивностью отдельных групп iNTS бактерий (таких как *S. typhimurium* ST313), которые встречаются в Африке, а не где-либо еще; снижением иммунитета хозяина, связанным с ВИЧ-инфекцией, малярией и недоеданием; и повышенными возможностями передачи от человека к человеку, например, через загрязненную воду. Бактериemia NTS у взрослых ВИЧ-инфицированных африканцев связана с высокой смертностью (до 47 процентов) и частотой рецидивов (43 процента).

Антибиотики используются для лечения инфекций, связанных с тифоидной и нетифоидной *Salmonella*, а выбор противомикробных препаратов и продолжительность лечения определяются стоимостью и доступностью антибиотиков, местной картиной резистентности и реакцией пациента на лечение. Как в развитых, так и в развивающихся странах становится все более очевидным тот факт, что множественные устойчивые к антибиотикам штаммы становятся

важными причинами инвазивной бактериемии и осложнений гастроэнтерита, приводящих к госпитализации и смерти.

По мере того, как доступные средства лечения становятся менее эффективными, проблема инфекций, связанных с тифоидной и нетифоидной *Salmonella*, вероятно, будет продолжать расти, что делает разработку вакцины важным приоритетом в усилиях по борьбе с заболеваниями. Вакцина также является важным защитным инструментом для людей, путешествующих в районы, где инфекции, связанные с тифоидной и нетифоидной *Salmonella*, являются эндемичными.

В настоящее время лицензированы для применения три типа брюшнотифозных вакцин: i) брюшнотифозная конъюгированная вакцина (TCV), ii) неконъюгированная Vi-полисахаридная вакцина (ViPS) и iii) живая аттенуированная вакцина Ty21a. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала более широкое использование брюшнотифозных вакцин, отдавая предпочтение брюшнотифозным конъюгированным вакцинам (TCV) (документ с изложением позиции ВОЗ. Wkly Epidemiol Rec 2018; 93:153-72).

Вакцины против *S. paratyphi* в настоящее время недоступны. Аналогично, существует потребность в иммуногенной композиции/вакцине, которая способна одновременно обеспечивать иммунитет против тифоидной и нетифоидной *Salmonella*.

Недостатком существующих в настоящее время вакцин является то, что все они направлены только против *S. typhi*. *S. paratyphi* A вызывает кишечную лихорадку с тем же географическим распространением, что и *S. typhi*, и эти заболевания клинически неразличимы. Следовательно, для Южной и Юго-Восточной Азии вакцина, которая может защитить от обоих сероваров, будет более ценной, чем вакцина, ограниченная одним из них. Кроме того, в странах Африки к югу от Сахары то же самое верно для *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, что указывает на важность вакцины, которая может дополнительно защитить от сероваров NTS для этого региона.

Неясно, будут ли находящиеся на стадии разработки вакцины-кандидаты защищать как от гастроэнтерита, так и от инвазивных проявлений iNTS. В то время как понимание бремени брюшного тифа в СНСД растет, глобальная медицинская потребность в конъюгированной вакцине, защищающей от тифоидных и нетифоидных инфекций *Salmonella*, достигла значительной величины. По оценкам, пиковый спрос на конъюгированную вакцину против брюшного тифа, вероятно, придется на период с 2023 по 2026 год и приблизится к 300 миллионам ежегодных доз для 133 стран (Clin Infect Dis. 2019 Mar 15; 68(Suppl 2): S154–S160).

Кроме того, первичные культуральные этапы, последующие этапы, конъюгация и разработка рецептур часто могут быть этапом, ограничивающим скорость раннего вывода биофармацевтических препаратов на рынок и удовлетворения потребностей населения. Первичные культуральные этапы включают в себя весь процесс от раннего выделения и культивирования клеток до создания банка клеток, наращивания культуры в процессе бактериальной ферментации и окончательного сбора клеток. Культуру клеток увеличивают от 100 до 500 миллилитров до биореактора объемом от 3 до 20000 литров. Дальнейшие этапы включают в себя первичное извлечение полисахарида сальмонеллы и удаление клеток и дебриса. Кроме того,

чтобы облегчить разработку экономически эффективной конъюгированной вакцины на основе полисахарида сальмонеллы, необходимо получить структурно интактные полисахариды с более высокими выходами, а также высокой чистотой. Ранее сообщалось о выходе менее 40% полисахаридов *Salmonella* spp. Повышение «выхода на стадии ферментации культуры» капсульного полисахарида (CPS) за счет использования новых стратегий подачи среды и улучшенной ферментационной среды было одним из предпочтительных подходов для достижения указанной цели. Merritt et al. (2000) показали, что периодическая культура с подпиткой в 500-литровом промышленном биореакторе увеличивает плотность клеток и выход капсульного полисахарида примерно в четыре раза по сравнению с периодической культурой.

Исследования продуцирования капсульных полисахаридов другими патогенными бактериями, такими как *Haemophilus influenzae* типа В и *Neisseria meningitidis*, показали, что продуцирование зависит от условий ферментации (температура, значение pH, растворенный кислород, осмоляльность) и компонентов среды, и эти оптимальные условия различаются для каждой бактерии. Zhan et al. (2002) аналогичным образом показали, что контроль pH и переход к периодической ферментации с подпиткой увеличивают выход клеток и продуцирование капсульного полисахарида.

Экспрессия капсульного полисахарида строго регулируется в зависимости от определенных условий ферментации, таких как осмоляльность, при этом сообщалось о снижении синтеза полисахарида при высокой осмоляльности.

Полисахариды были получены при различных концентрациях глюкозы, казаминовых кислот и ионов фосфата.

Baruque-Ramos et al., 2005 показали, что более высокие выходы капсульного полисахарида были получены при культивировании *N. meningitidis* (серогруппа C) в среде, где концентрация глюкозы поддерживалась ниже 1,0 г/л, и что низкое напряжение кислорода способствовало более высокому образованию полисахаридов. Кроме того, было замечено, что концентрированные казаминовые кислоты в исходном растворе ограничивают конечную плотность клеток. Кроме того, рост и выход полисахаридов в определенной среде также зависят от соотношения источника углевода и азота. В одном из процессов периодической ферментации с подпиткой для *S. typhi* аммиак подавался в качестве источника азота вместе с питательной средой. Однако было замечено, что на образование полисахарида *Aureobasidium pullulans* влиял источник аммиачного азота в среде, и его выход падал при наличии избытка ионов аммония, даже в условиях, которые в противном случае поддерживали его синтез (Appl Microbiol Biotechnol (1990) 32: 637–644).

Рост и синтез полисахаридов в определенной среде были максимальными, когда аминокислоты были заменены на аммиак в качестве источника азота.

Сообщалось об использовании казаминовой кислоты в качестве источника азота в определенной среде. Однако казаминовая кислота животного происхождения, скорее всего, из бычьего казеина, считается аллергеном и её использование ограничено. Кроме того, сообщалось об использовании среды с казеиновым переваром/триптоном в качестве источника азота в

определенной среде, однако это может не поддерживать рост трудных для культивирования организмов.

Добавление гидролизатов без компонентов животного происхождения (Bacto TC Yeastolate, Phytone Peptone) в среды с определенным химическим составом является одним из подходов к своевременному увеличению плотности клеток, жизнеспособности и продуктивности культур. Гидролизаты представляют собой белковые перевары, состоящие из аминокислот, небольших пептидов, углеводов, витаминов и минералов, которые обеспечивают питательные добавки к среде. Гидролизаты неживотного происхождения из сои, пшеницы и дрожжей обычно используются в средах для культивирования клеток и подпитках для повышения выхода полисахаридов (см. патент США US9284371). Однако из-за сложности состава, вариаций от партии к партии, нежелательного свойства делать культуру вязкой, дрожжевой экстракт и гидролизаты могут быть значительным источником изменчивости среды. Образование пены во время крупномасштабной ферментации может i) снижать выход капсульных полисахаридов из-за потери клеток и культуральной среды в пенной фазе, ii) может быть вредным для клеток, поскольку при разрыве пузырьков они оказывают сильное усилие iii) приводить к потере стерильности если пена выходит наружу и iv) может приводить к избыточному давлению, если выход пены блокирует выходной фильтр.

Супернатант клеток после ферментации подвергают различным стадиям очистки для выделения очищенного полисахарида и устранения примесей клеток-хозяев, таких как белки, нуклеиновая кислота и липополисахарид. Методы фильтрации играют важную роль в последующей обработке или очистке бактериальных полисахаридов от примесей клеток-хозяев. Последующие этапы включают в себя инактивацию бактериальной культуры, отделение клеток от среды, выделение продукта, концентрирование, очистку. Последующая обработка является наиболее сложной частью процесса из-за её сложности.

Каждая бактерия имеет разные капсульные полисахариды, а разные серотипы одних и тех же бактерий дополнительно различаются по химической структуре бактериальных капсульных полисахаридов. В данном случае *S. typhi* экспрессирует полисахаридную капсулу Vi, которая представляет собой линейный гомополимер $\alpha(1-4)\text{-D-GalpA}$, N-ацетилированный по C-2 и O-ацетилированный по C-3. Ацетилы N и O преобладают на поверхности и необходимы как для антигенности, так и для иммуногенности Vi, тогда как, напротив, *S. paratyphi* A и B и NTS (за редким исключением) не экспрессируют капсульные полисахариды. Скорее, их поверхностные полисахариды представляют собой O-полисахарид (OPS) липополисахарида. Они имеют общий трисахаридный остов $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-(1}\rightarrow$ (который серологически составляет эпитоп 12). Однако дидезоксигексозный сахарид, связанный $\alpha\text{-(3}\rightarrow 6)$ с маннозой повторяющегося трисахиарида, приводит к образованию иммунодоминантного эпитопа, который придает идентичность группе *Salmonella*. В случае *S. typhimurium* галактоза трисахаридного остова эпитопа 12 становится $\alpha\text{-(1}\rightarrow 6)$ глюкозилированной. (См.: Lindberg AA, Le

Minor L. Serology of *Salmonella* In: Bergan T, ed. Methods in Microbiology: Academic Press, 1984: 1-141).

Это разнообразие структуры бактериальных полисахаридов делает очистку этих полисахаридов более сложной и трудной задачей. Вакцина, содержащая полисахарид, должна соответствовать определенному стандарту качества.

Предыдущий способ очистки, который можно проводить в больших объемах, включает в себя лизис и осаждение примесей, таких как нуклеиновые кислоты и липиды, с использованием растворителей, изменение значения pH и использование детергента, такого как дезоксихолат натрия, Тритон-Х.

Дезоксихолат натрия (DOC) является мягким детергентом и одним из наиболее часто используемых детергентов при очистке полисахаридов. Дезоксихолат натрия с основной стероидной структурой в меньшей степени денатурирует и имеет ограниченную солюбилизирующую способность, он расщепляет эндотоксины, не влияя на химическую структуру; и, следовательно, при удалении дезоксихолата натрия эндотоксины восстанавливают свою биологическую активность. Кроме того, процедуры на основе DOC не работают эффективно для удаления загрязняющих веществ из полисахаридов, особенно полисахаридов, содержащих сиаловую кислоту. Это может быть связано со слабой детергентной активностью DOC в отношении ассоциации липополисахарид-белок, образующейся во время последующей обработки, что приводит к высокому уровню эндотоксинов и содержанию белка в конечном выделенном полисахариде. Кроме того, поскольку дезоксихолат натрия является продуктом животного происхождения, даже его остаточное присутствие в конечном продукте может привести к неприятию продукта регулирующими органами и некоторыми религиозными общинами.

Недостатком использования Тритон-Х является то, что остатки детергента сохраняются на этапе экстракции, и для удаления всех остатков требуется обильная промывка.

Для некоторых типов CPS осаждение для удаления белковых примесей также предусмотрено ацетатом цинка/сульфатом аммония/цитратом натрия. Однако для достижения высокого уровня чистоты необходимо проводить многократное осаждение сульфатом аммония, что делает процесс более утомительным и трудоемким. Кроме того, иногда он также осаждает капсульные полисахариды, что приводит к потере общего количества полисахаридов.

В некоторых других способах используются ферменты, помогающие расщеплять белки и примеси нуклеиновых кислот; однако удаление ферментов и гидролизованного материала является сложной задачей и может привести к потере целевого продукта. Кроме того, регулирующие органы ограничили использование ферментов животного происхождения в продуктах для человека из-за риска загрязнения прионами. Использование ферментов, помимо факта высокой стоимости, приведет к дополнительным проблемам регулирования в рамках cGMP, например происхождение ферментов (животных или рекомбинантных), различия в активности ферментов у разных поставщиков и партий и т.д.

В некоторых других способах для деградации остаточных белков и/или материалов нуклеиновых кислот используется бензоназа, протеиназа К или наргаса с последующей хроматографической очисткой, что приводит к высоким затратам и процессу, который нельзя легко масштабировать.

В некоторых других способах для разделения эндотоксинов бактериальных полисахаридов используются токсичные органические растворители, такие как фенол, бутанол, толуол и хлороформ. Этот способ является дорогостоящим и трудоемким. Кроме того, неприятно работать с токсичными органическими растворителями, образующими токсичные отходы.

Высокая чистота, необходимая для полисахаридов, специфичных для вакцин, привела к разработке новых методов очистки, основанных на фракционном осаждении; ионообменной хроматографии; гель-фильтрации; и аффинной хроматографии. Хроматографические методы, такие как эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография и хроматография гидрофобного взаимодействия, успешно использовались для выделения бактериальных полисахаридов с эффективным удалением белковых примесей и примесей нуклеиновых кислот. Несмотря на успешное выделение бактериального полисахарида в соответствии со спецификациями ВОЗ, использование хроматографических методов связано с многоэтапной трудоемкой и длительной подготовкой образцов, сопряжено с проблемами масштабируемости, резко ухудшает извлечение капсульных полисахаридов и, таким образом, не является приемлемым низкзатратным вариантом для последующей обработки в промышленных масштабах. Кроме того, добавление новых этапов очистки для устранения этих загрязнителей увеличивает сложность процесса, снижая конечный выход и увеличивая экономические затраты.

Очищенные полисахариды *Salmonella typhi*, полученные ранее описанными способами очистки, имеют содержание эндотоксина в пределах 25-50 ЕЭ/мкг.

Следовательно, существует потребность в альтернативных методологиях очистки, направленных на максимальное извлечение полисахаридов *Salmonella* при удалении примесей до приемлемого уровня.

Различные методы, такие как кислотный гидролиз, щелочное разложение, окисление периодатом, озонлиз (Wang et al. Carb. Res. 1999, 319, 1-4, 141-147), ферментативный гидролиз, обработка ультразвуком (Pawlowski et al. Vaccine, 2000, 18.18, 1873-1885), фрагментация электронным пучком (Pawlowski et al. Micro Lett, 1999, 174.2, 255-263) были описаны для деполимеризации (уменьшения размера) бактериальных и небактериальных полисахаридов. Однако кислотный гидролиз и щелочная деструкция занимают много времени, и полученный в результате образец уменьшенного размера имеет высокую полидисперсность. Также окисление периодатом оказывает вредное воздействие на лабильные антигенные эпитопы некоторых полисахаридов. Кроме того, озонлиз можно использовать только с полисахаридами, содержащими β -D-альдозидные связи, и до настоящего времени было выделено лишь несколько эндогликаназ. В заявке на патент США US20090041802 раскрыта фрагментация менингококковых полисахаридов с помощью Emulsiflex C-50 (обычный гомогенизатор) (Avetin). Тем не менее,

обычные гомогенизаторы работают при пиковых давлениях в течение моментов времени (приблизительно 7%) каждого цикла, что приводит к большим отклонениям, менее стабильным продуктам и необходимости выполнять больше проходов или использовать более высокие давления, чем требуется.

Обработку ультразвуком использовали для деполимеризации полисахаридов (см., например, Международную патентную заявку WO2010/055250). Однако метод ультразвуковой деполимеризации не подходит для промышленной деполимеризации больших объёмов полисахарида из-за его низкой эффективности.

В заявке на патент США 20090234108 описан способ частичного деацетилирования полисахарида пневмококка серотипа 1 путем химической обработки карбонатно-натриевым буфером (pH 9,0). Этот процесс занимает много времени и связан с разрушением иммуногенных компонентов, что может повлиять на иммуногенность конъюгатов.

По всем причинам, изложенным выше, простой и недорогой способ деполимеризации полисахаридов или производных полисахаридов по-прежнему желателен в данной области техники.

Получение полисахаридно-белковой конъюгированной вакцины специфично для конкретного белка-носителя и нативного полисахарида, участвующих в процессе конъюгации.

В данной области техники известны различные методы конъюгации. Конъюгаты могут быть получены методами прямого восстановительного аминирования, химии конъюгации карбодимидов, гидразидов, активных эфиров, норборана, п-нитробензойной кислоты, N-гидроксисукцинимиды, S-NHS, EDC, с использованием TSTU, химии конъюгации 1-циано-4-диметиламинопиридиния тетрафторбората (CDAP).

Активированный полисахарид связан непосредственно или через спейсерную (линкерную) группу с аминок группой на белке-носителе. Линкеры, используемые для конъюгации, как описано в предшествующем уровне техники, представляют собой N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (SZU ET AL; 1987). Другие линкеры представляют собой В-пропионамидо (WO 00/10599), нитрофенилэтиламин (Gever et al. (1979) *Med Microbiol Immunol* 165; 171-288), галогеналкилгалогенид (патент США No. 4057685), гликозидную связь (патент США No.4673574), гександиамин и 6-аминокапроновую кислоту (патент США No.4459286). В работе Marburg et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5282 (1986) раскрыто одно средство конъюгации полисахаридов и иммуногенных белков через бигенерические спейсеры. Белок (PRO) был дериватизирован для проявления боковых нуклеофильных или электрофильных групп (PRO*), в то время как партнерский полисахарид (Ps) был функционализирован для появления боковых групп противоположной реакционной способности (Ps*). При объединении Ps* с PRO* образовывались бигенерические спейсеры, ковалентно соединяющие Ps с PRO (Ps-PRO). При кислотном гидролизе бигенерический спейсер (линкер) высвобождается в виде необычной аминокислоты, количественно определяемой аминокислотным анализом, что обеспечивает способ доказательства ковалентности.

Полисахаридный компонент вакцин на основе полисахаридно-белкового конъюгата вакцин подвергается постепенной деполимеризации со скоростью, которая зависит от типа конъюгата, компонентов препарата и условий хранения. Это приводит к увеличению содержания свободного полисахарида, что может неблагоприятно повлиять на стабильность продукта. Известно, что конъюгаты полисахарид-белок-носитель высвобождают свободный полисахарид после конъюгации при дальнейшей обработке, лиофилизации или хранении в жидких, а также твердых препаратах. Только полисахарид *Salmonella*, который ковалентно связан с белком-носителем (т.е. конъюгированный полисахарид), иммунологически важен для клинической защиты, а чрезмерные уровни несвязанного полисахарида потенциально могут привести к иммунологической гипореактивности к полисахариду (см. WHO/TRS/924, стр. 14, А. 3.3.5). В частности, конъюгаты *Salmonella typhi*, описанные в литературе, имеют высокое содержание свободных полисахаридов до 34% и высокое содержание свободного белка выше 5%, что указывает на более низкую эффективность конъюгации и более низкую стабильность конъюгатов, что является нежелательным. Соответственно, существует потребность в вакцинах, демонстрирующих содержание свободных полисахаридов менее 10%.

В действительности, если бы можно было иметь общий способ, который можно было бы использовать для производства и разработки всех вакцин-кандидатов, это значительно сократило бы время и ресурсы, необходимые для разработки способа. Это может оказать существенное влияние на количество клинических кандидатов, которые могут быть включены в клинические испытания. Кроме того, способы, разработанные для ранних стадий клинических испытаний, в том числе разработанные с использованием платформы, могут быть неоптимальными с точки зрения экономики процесса, выхода, объёмов пула и пропускной способности и могут не подходить для производства количеств, необходимых для поздних этапов испытаний или коммерческих кампаний. Другим важным соображением является скорость разработки способа, учитывая, что разработка способа должна происходить до включения терапевтического кандидата в клинические испытания. См. Abhinav A. Shukla et al. Journal of Chromatography B, 848 (2007) 28–39.

Кроме того, бремя заболеваний сальмонеллой является высоким в развивающихся странах, где снабжение электроэнергией и охлаждение часто недостаточны, и поэтому стабильность вакцины при колебаниях температуры приобретает большее значение для этих регионов.

Таким образом, существует потребность в эффективном платформенном способе для производства эффективной вакцины против штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, которая соответствует множеству критериев, включая хорошую иммуногенность, безопасность и доступность, в частности в платформе, которая обеспечивает i) улучшенный выход полисахаридов в процессах ферментации и очистки; ii) улучшенные процессы очистки, демонстрирующие оптимальное процентное извлечение и минимальные уровни примесей; и iii) улучшенное соотношение полисахарид-белковый конъюгат в вакцине, iv)

улучшенный состав, демонстрирующий низкую вязкость, отсутствие агрегации; демонстрирующий долговременную стабильность в широком диапазоне температур.

Чтобы преодолеть вышеупомянутые ограничения предшествующего уровня техники и удовлетворить давно ощущаемую глобальную медицинскую потребность, авторы настоящего изобретения предлагают улучшенные, альтернативные способы ферментации, очистки, конъюгации, композиции(ии) для получения моновалентной вакцины, содержащей конъюгат тифоидной *Salmonella*, а также поливалентной(ых) вакцины(н), включающий в себя, по меньшей мере, один дополнительный конъюгат из *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi* A, B, C) и нетифоидных *Salmonella enterica* сероваров *typhimurium* (*S. typhimurium*) и *enteritidis* (*S. enteritidis*).

ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы решить одну или несколько проблем предшествующего уровня техники или, по меньшей мере, предоставить полезную альтернативу.

Задачей настоящего изобретения является разработка эффективной вакцинной композиции для профилактики и лечения инфекций, вызванных штаммами *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, у человека.

Другой задачей настоящего изобретения является создание улучшенных способов получения вакцины на основе конъюгата полисахарид-белок, включающего полисахарид, полученный из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, которые можно применять в промышленных масштабах.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является получение моновалентной конъюгированной полисахарид-белковой вакцины, содержащей полисахарид, полученный из любого из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является получение двухвалентной конъюгированной полисахарид-белковой вакцины, содержащей полисахарид, полученный из любого из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* в любой их комбинации.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является получение поливалентной конъюгированной полисахарид-белковой вакцины, содержащей полисахарид, полученный из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* в любой их комбинации.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является создание улучшенных периодических способов культивирования с подпиткой для получения полисахарида штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является создание улучшенного способа очистки полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является создание улучшенных способов конъюгации полисахарида (с уменьшением размера или без него), полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, с белком-носителем.

Ещё одной задачей настоящего изобретения является предоставление способа конъюгации полисахарида (с уменьшением размера или без него), полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, с белком-носителем с линкерной (спейсерной) молекулой или без нее.

Ещё одной целью настоящего изобретения является получение иммуногенных вакцинных композиций, содержащих конъюгаты полисахарид-белок в подходящих однократных и многократных флаконах для введения младенцам и взрослым в соответствующих концентрациях, эффективных для обеспечения защиты или лечения инфекций против штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* или для предотвращения, облегчения или задержки начала или прогрессирования их клинических проявлений.

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

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к:

- a) иммуногенной композиции, содержащей один или несколько конъюгатов полисахарид-белок, где полисахарид получен из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*;
- b) периодическим способам культивирования с подпиткой для культивирования и обработки полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*;
- c) последующим этапам обработки для получения полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*;
- d) способам конъюгации полисахарида (с уменьшением размера или без него), полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, с белком-носителем в присутствии или в отсутствие линкерной молекулы; и
- e) способам индукции иммунного ответа у субъекта путем введения субъекту терапевтически эффективного количества иммуногенной композиции для обеспечения защиты или лечения от инфекций штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* или для предотвращения, облегчения или задержки начала или прогрессирования их клинических проявлений.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хотя настоящее изобретение может быть реализовано в различных вариантах осуществления, некоторые варианты осуществления изобретения показаны в последующем подробном обсуждении с пониманием того, что настоящее раскрытие можно рассматривать как

иллюстрацию принципов настоящего изобретения, и оно не предназначено для ограничения объёма настоящего изобретения до того, который проиллюстрирован и раскрыт в данном описании.

Варианты осуществления изобретения предоставлены таким образом, чтобы исчерпывающе и полностью передать объём настоящего изобретения специалисту в данной области техники. Изложены многочисленные детали, относящиеся к конкретным компонентам и процессам, чтобы обеспечить полное понимание вариантов осуществления настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что детали, представленные в вариантах осуществления изобретения, не должны толковаться как ограничивающие объём настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения известная композиция, известные процессы и известные методики подробно не описываются.

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

Термины «содержит», «содержащий», «включающий в себя» и «имеющий» являются открытым переходными терминами и, следовательно, определяют наличие заявленных функций, целых чисел, этапов, операций, элементов, модулей, блоков и/или компонентов, но не запрещают наличие или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, этапов, операций, элементов, компонентов и/или их групп. Конкретный порядок этапов, раскрытых в способе настоящего изобретения, не следует истолковывать как обязательно требующий их выполнения, как описано или проиллюстрировано. Также следует понимать, что могут быть использованы дополнительные или альтернативные этапы.

Термины «первый», «второй», «третий» и т. д. не следует толковать как ограничивающие объём настоящего изобретения, поскольку вышеупомянутые термины могут использоваться только для того, чтобы отличить один элемент, компонент, область, слой или раздел от другого компонента, области, слоя или раздела. Такие термины, как «первый», «второй», «третий» и т. д., используемые здесь, не подразумевают конкретной последовательности или порядка, если только это явно не предусмотрено настоящим описанием. Настоящее изобретение относится к иммуногенной композиции и способу её получения.

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

«D-антигенные единицы» (также называемые «международными единицами» или ME). D-антигенная форма полиовируса индуцирует защитные нейтрализующие антитела. Упомянутые здесь D-антигенные единицы (например, в вакцинах настоящего изобретения) представляют собой измеренные общие D-антигенные единицы каждого типа антигена неадсорбированной нерасфасованной ИПВ перед приготовлением конечной вакцины, которые добавляют в каждую

дозу готовой вакцины для человека (обычно 0,5 мл конечного объема). Надежные способы измерения D-антигенных единиц хорошо известны в данной области техники и опубликованы, например, Европейской фармакопеей. Например, D-антигенные единицы могут быть измерены с использованием ИФА-теста, как описано ниже в Примере 1 («Количественное определение D-антигена с помощью ИФА»). Европейская фармакопея предоставляет тестовый образец (биологический эталонный препарат Европейской фармакопеи, доступный в секретариате Европейской фармакопеи, например, код Р 216 0000) для стандартизации таких методов между производителями (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-2). Таким образом, значение D-антигенной единицы хорошо изучено в данной области техники.

Используемый здесь термин «доза» обычно означает одно введение вакцины настоящего изобретению, что обычно представляет собой одну инъекцию. Типичная доза для человека составляет 0,5 мл. Конечно, в схеме введения вакцины могут быть введены различные дозы.

Используемый здесь термин «ИПВ» или иммуногенная композиция, содержащая эти компоненты, означает инактивированный полиовирус типа 1 (например, Mahoney, как предпочтительно используемый), типа 2 (например, MEF-1) или типа 3 (например, Saukett), или Sabin серотип 1, 2, 3, комбинацию двух или всех трех этих типов. Примером полной (или стандартной) дозы (40-8-32 D-антигенных единиц ИПВ на основе Salk типов 1, 2 и 3, соответственно) иммуногенной композиции ИПВ для целей настоящего изобретения может быть Poliovac® (Serum Institute of India Pvt Ltd.).

Термин «сахарид» в данном описании может означать полисахарид или олигосахарид и включает в себя оба эти термина. Капсульный сахаридный антиген может быть полисахаридом полной длины или может быть расширен до бактериальных «сахаридов определенного размера» и «олигосахаридов» (которые естественным образом имеют небольшое количество повторяющихся звеньев или представляют собой полисахариды, уменьшенные в размере для удобства, но все же способные индуцировать защитный иммунный ответ у хозяина).

В соответствии с первым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может содержать один или несколько конъюгатов полисахарид-белок, где полисахарид получен из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

В соответствии со вторым вариантом осуществления настоящего изобретения способ получения полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* путем периодического культивирования с подпиткой, может включать в себя любое подмножество или все следующие этапы:

1. Инокуляция, культивирование и сбор бактерий в композициях ферментационной среды,
2. Инактивация,
3. Разделение,
4. Очистка и
5. Стерилизующая фильтрация.

В соответствии с первым аспектом второго варианта осуществления изобретения композиции ферментационной среды могут содержать источник углерода, соль магния, источник фосфата, дрожжевой экстракт и гидролизат сои. Источник углерода может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, маннита, сахарозы, лактозы, фруктозы и трегалозы, предпочтительно глюкозы. Соль магния может быть выбрана из хлорида магния, сульфата магния, предпочтительно гептагидрата сульфата магния. Источник калия может быть выбран из гептагидрата динатрийгидрофосфата, моногидрата дигидрофосфата натрия, фосфата калия и дифосфата калия. Предпочтительно источник калия представляет собой комбинацию гептагидрата динатрийгидрофосфата, дигидрофосфата натрия. Предпочтительно соевый гидролизат представляет собой Hy-Soy®.

Ещё ферментационная среда может дополнительно содержать пеногаситель, выбранный из группы Antifoam 204, Antifoam C, SE-15, Y-30, Antifoam EX-Cell, S184 (чистое силиконовое масло), SLM54474 (полипропиленгликоль: PPG), VP1133 (смесь силиконового масла/PPG), BREOX (полиалкиленгликоль), J673 STRUKTOL (алкоксилированные сложные эфиры жирных кислот на растительной основе) и SE9 (водная эмульсия с 10% компонентом силиконового масла) компании Wacker-Chemie Co. Пеногаситель в сочетании с гидролизатом сои и экстрактом дрожжей может способствовать увеличению выхода полисахаридов. Более предпочтительно пеногаситель может представлять собой Antifoam C или J673 STRUKTOL.

В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения дрожжевой экстракт может представлять собой автолизат дрожжей, ультрафильтрованный дрожжевой экстракт или синтетический дрожжевой экстракт. Экстракт дрожжей может быть выбран из BD BBL™, BD BACTO™, Difco™ и т.п. В предпочтительном варианте дрожжевой экстракт может представлять собой ультрафильтрованный дрожжевой экстракт, такой как Difco™ Yeast Extract, UF. Соевый гидролизат может быть выбран, но без ограничений, из соевого шрота, соевого пептона и соевой муки. В одном варианте осуществления изобретения соевый гидролизат может представлять собой Difco™ Select Phytone™ UF. В другом варианте осуществления изобретения соевый гидролизат может представлять собой Hy-Soy®.

Комбинация пеногасителя, соевого пептона и дрожжевого экстракта приводит к повышению выхода по сравнению с другими средами.

В соответствии со вторым аспектом второго варианта осуществления изобретения способ может быть основан на двухразовой стратегии за счет включения содержимого исходного сырья в фиксированной пропорции в определенные фиксированные интервалы времени во время, когда ферментация уже проходит, и/или обеспечения непрерывной подачи на протяжении всего периодического режима ферментации с подпиткой, состоящей из нескольких этапов с пропорциональным увеличением размера подачи сырья на каждом этапе.

В соответствии с третьим аспектом второго варианта осуществления изобретения параметры ферментации могут включать в себя:

Температура: $36,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Перемешивание: от 150 до 600 об/мин

Значение pH: $7,0 \pm 0,5$

Растворенный кислород: от 30% до 90%

Воздух (нл/мин): от 2 до 10

Поток газа: 60 – 600 нл/мин

Осмоляльность: 400 – 600 мОсм/кг

В соответствии с четвертым аспектом второго варианта осуществления изобретения инактивацию бактериальной культуры можно проводить с использованием формалина.

Ещё более предпочтительно инактивацию бактериальной культуры можно проводить с использованием формальдегида в диапазоне от 0,1 до 2% по объёму, предпочтительно 0,5% по объёму; инкубировать при температуре от 34 до 38°C, предпочтительно при температуре 36°C; в течение 5-12 часов, предпочтительно от 8 до 12 часов.

В соответствии с пятым аспектом второго варианта осуществления изобретения разделение можно проводить центрифугированием. Однако предпочтительно разделение можно проводить центрифугированием при следующих установленных параметрах: температура 2-8°C; об/мин – 7000-8000; время центрифугирования 40-60 мин.

В соответствии с шестым аспектом второго варианта осуществления изобретения очистку можно проводить глубинной фильтрацией.

В соответствии с седьмым аспектом второго варианта осуществления изобретения очищенную массу можно стерилизовать путем фильтрации с использованием стерильных фильтров с размером пор 0,2 мкм.

В соответствии с восьмым аспектом второго варианта осуществления изобретения выход неочищенного Vi-полисахарида *Salmonella enterica* серовар *typhi* (ViP) на этапе ферментации может составлять, по меньшей мере, 40%, а средний выход Vi-полисахарида может находиться в диапазоне от 100 мг/л до 5000 мг/л; более предпочтительно 100-700 мг/л.

В соответствии с третьим вариантом осуществления настоящего изобретения продукт ферментации может быть подвергнут любой подгруппе этапов или в любом порядке, или всем последующим этапам очистки для получения Vi-полисахарида (ViP) желаемого качества:

а) очистка массы бактериальных капсульных полисахаридов путем прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, одну мембрану с размером пор примерно 0,2 микрометра;

б) концентрирование с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замены буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10–300 кДа или кД (MWCO);

с) обработка анионным или катионным детергентом, этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (от 4 до 10 mM) и ацетатом натрия (от 5% до 10%) для денатурации белков, нуклеиновых кислот и липополисахарида;

д) осаждение спиртом (от 40% до 70%);

е) центрифугирование и фильтрация методом прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор примерно 0,2 мкм;

ф) обработка солью щелочного металла для удаления избытка детергента с последующим центрифугированием и фильтрацией с помощью прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор примерно 0,2 мкм;

g) концентрирование с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10-300 кДа или кД (MWCO);

h) обработка анионным или катионным детергентом;

i) центрифугирование и фильтрация методом прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор от примерно 0,45 микрометра до примерно 0,2 микрометра;

j) удаление примесей белков и нуклеиновых кислот путем промывки осадка спиртом (от 50% до 70%) в присутствии хлорида натрия (от 0,1М до 2М);

k) селективное осаждение полисахарида с использованием спирта (<75% или >95%);

l) растворение полисахарида в воде для инъекций и концентрирование с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10-300 кДа или кД (MWCO); и

m) стерилизация фильтрованием через, по меньшей мере, один стерильный фильтр с размером пор примерно 0,2 микрометра в стерильных условиях.

В соответствии с первым аспектом третьего варианта осуществления изобретения способ очистки может не иметь какого-либо этапа хроматографии.

В соответствии со вторым аспектом третьего варианта осуществления изобретения способ очистки может привести к значительному извлечению примерно от 40% до 65% с желаемыми уровнями О-ацетила (более 2,0 ммоль/г полисахарида), выход очищенного Vi-полисахарида может находиться в диапазоне от 1000 до 4000 мг/л, средняя молекулярная масса может находиться в диапазоне от 40 до 400 кДа, содержание белков/пептидов менее 1%, нуклеиновых кислот менее 2%, эндотоксинов менее 100 ЕЭ на мкг полисахарида (PS). Распределение по размеру молекул: более 50% PS элюируется до достижения коэффициента распределения (KD) 0,25.

Ещё более предпочтительно средняя молекулярная масса очищенного Vi-полисахарида может находиться в диапазоне от 40 до 400 кДа.

В соответствии с третьим аспектом третьего варианта осуществления изобретения анионный детергент может быть выбран из группы, включающей в себя алкилсульфаты, додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат натрия, додецилсульфонат натрия, s-алкилсульфаты натрия, сульфаты полиоксиэтиленовых эфиров жирных спиртов натрия, олеилсульфат натрия, N-олеил поли(аминокислота) натрия, алкилбензолсульфонаты натрия, альфа-олефинсульфонат натрия, алкилсульфонаты натрия, сложные эфиры альфа-сульфомонокислот, сульфоалкиловые сложные эфиры жирных кислот, сукцинатсульфонат,

алкилнафталинсульфонаты, алкансульфонаты натрия, лигнинсульфонат натрия и сульфонаты алкилглицерилового эфира натрия.

Также предпочтительно, указанный анионный детергент может представлять собой алкилсульфат, более предпочтительно додецилсульфат натрия в конечной концентрации в диапазоне от 0,1% до 20%, более предпочтительно в диапазоне 1-20%, который можно добавить к ретентату и перемешать при температуре 25°C-30°C в течение 2 часов.

В соответствии с четвертым аспектом третьего варианта осаждение изобретения осаждение спиртом можно проводить с использованием метанола, этанола, н-пропилового спирта, изопропилового спирта, ацетона или трет-бутилового спирта; или их комбинации.

Однако предпочтительно указанный спирт может представлять собой этанол.

В соответствии с пятым аспектом третьего варианта осуществления изобретения соль щелочного металла может быть выбрана из группы солей натрия, калия, кальция и магния. Более предпочтительно соль щелочного металла может представлять собой соль калия, выбранную из группы, состоящей из хлорида калия, ацетата калия, сульфата калия, карбоната калия, бикарбоната калия, фосфата калия, гидрофосфата калия, дигидрофосфата калия, нитрата калия и других солей калия, или комбинации двух или более из них.

Ещё более предпочтительно, указанная калиевая соль может представлять собой хлорид калия в конечной концентрации в диапазоне от 0,1 М до 2 М, смешанный с супернатантом, и после его растворения смесь инкубируют при температуре 2-8°C в течение >3 часов.

В соответствии с шестым аспектом третьего варианта осуществления изобретения катионный детергент может быть выбран из группы, включающей в себя цетилтриметиламмониевую соль, тетрабутиламмониевую соль, миристилтриметиламмониевую соль и гексадиметринбромид; или их комбинацию.

Ещё более предпочтительно, указанный катионный детергент может представлять собой бромид цетилтриметиламмония (СТАВ) в конечной концентрации в диапазоне от 0,1% до 12%; предпочтительно 2%-3% можно добавить к ретентату и перемешивать при температуре 25°C-30°C в течение 1-2 часов.

В соответствии с седьмым аспектом третьего варианта осуществления изобретения конечная очищенная масса полисахарида может храниться при температуре ниже или равной - 20°C.

В соответствии с четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения продукт ферментации может быть подвергнут любому подмножеству или в любом порядке или всем нижеследующим этапам очистки для получения желаемого качества О-специфичного полисахарида из липополисахарида (LPS) *Salmonella paratyphi A*:

а) центрифугирование и разделение

б) концентрирование с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10-300 кДа (MWCO);

- с) кислотный гидролиз LPS
- d) центрифугирование и разделение
- e) нейтрализация
- f) очистка LPS путем проточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, одну мембрану с размером пор примерно 0,45 и 0,2 микрометра;
- g) обработка анионным или катионным детергентом,
- h) центрифугирование и разделение
- i) проточная фильтрация (DFF) через, по меньшей мере, одну мембрану с размером пор примерно 0,45 и 0,2 микрометра;
- j) концентрирование с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замену буфера с помощью дильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10-300 кДа (MWCO);
- k) осаждение спиртом (от 40% до 70%);
- l) центрифугирование и фильтрация методом проточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор примерно 0,2 мкм;
- m) обработка солью щелочного металла для удаления избытка детергента с последующим центрифугированием и фильтрацией с помощью проточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор примерно 0,2 мкм;
- n) концентрирование с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью дильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10-300 кДа (MWCO);
- o) удаление примесей белков и нуклеиновых кислот путем промывания осадка спиртом (от 50% до 70%) в присутствии хлорида натрия (от 0,1М до 2М);
- p) растворение полисахарида в воде для инъекций и концентрирование с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью дильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10-300 кДа (MWCO); и
- q) стерилизация фильтрованием через, по меньшей мере, один стерильный фильтр с размером пор примерно 0,2 микрометра в стерильных условиях.

В соответствии с первым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения кислотный гидролиз LPS может быть осуществлен предпочтительно с использованием уксусной кислоты (конечная концентрация 0,5-5%), pH ~2,0-3,0; температура от 30 до 90 градусов Цельсия и время от 100 до 200 минут.

В соответствии со вторым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения нейтрализацию после кислотного гидролиза можно проводить предпочтительно с использованием раствора аммиака до достижения конечного значения pH 7,0.

В соответствии с третьим аспектом четвертого варианта осуществления изобретения анионный детергент может быть выбран из группы, включающей в себя алкилсульфаты, додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия, додецилсульфонат натрия, s-алкилсульфаты натрия,

сульфаты полиоксиэтиленовых эфиров жирных спиртов натрия, олеилсульфат натрия, N-олеил поли(аминокислота) натрия, алкилбензолсульфонаты натрия, альфа-олефинсульфонат натрия, алкилсульфонаты натрия, сложные эфиры альфа-сульфомонокарбоновых кислот, сульфоалкиловые сложные эфиры жирных кислот, сукцинатсульфонат, алкилнафталинсульфонаты, алкансульфонаты натрия, лигнинсульфонат натрия и сульфонаты алкилглицерилового эфира натрия.

Также предпочтительно, указанный анионный детергент может представлять собой дезоксихолат натрия в конечной концентрации в диапазоне от 0,1% до 20%, более предпочтительно в диапазоне 1-2%, который можно добавить к ретентату и перемешать при температуре 25°C-30°C в течение 10-120 минут.

В соответствии с четвертым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения осаждение спиртом можно проводить с использованием метанола, этанола, n-пропилового спирта, изопропилового спирта, ацетона или трет-бутилового спирта; или их комбинации.

Однако предпочтительно указанный спирт может представлять собой этанол.

В соответствии с пятым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения соль щелочного металла может быть выбрана из группы солей натрия, калия, кальция и магния. Более предпочтительно соль щелочного металла может представлять собой соль калия, выбранную из группы, состоящей из хлорида калия, ацетата калия, сульфата калия, карбоната калия, бикарбоната калия, фосфата калия, гидрофосфата калия, дигидрофосфата калия, нитрата калия и других солей калия, или комбинации двух или более из них.

Ещё более предпочтительно, указанная калиевая соль может представлять собой хлорид калия в конечной концентрации в диапазоне от 0,1 М до 2 М, смешанный с супернатантом, и после его растворения смесь инкубируют при температуре 2-8°C в течение >3 часов.

В соответствии с шестым аспектом четвертого варианта осуществления катионный детергент может быть выбран из группы, включающей цетилтриметиламмониевую соль, тетрабутиламмониевую соль, миристилтриметиламмониевую соль и гексадиметринбромид; или их комбинации.

В соответствии с седьмым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения способ очистки может не иметь какого-либо этапа хроматографии.

В соответствии с восьмым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения способ очистки может приводить к

В соответствии с девятым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения способ приводит к значительному снижению примесей эндотоксина (< 100 ЕЭ эндотоксина на мкг PS), белка ($< 1\%$) и нуклеиновой кислоты ($< 2\%$), более высокому извлечению капсульного полисахарида соответственно в диапазоне от 40% до 65%, с желаемыми уровнями О-ацетила ($> 2,0$ ммоль/г полисахарида), распределением по размеру молекул ($> 50\%$ PS элюируется до достижения коэффициента распределения (KD) 0,25), и средняя молекулярная масса очищенного О-специфичного полисахарида может находиться в диапазоне от 40 до 200 кДа.

В соответствии с десятым аспектом четвертого варианта осуществления изобретения конечная очищенная масса полисахарида может храниться при температуре ниже или равной - 20°C.

В соответствии с пятым вариантом осуществления настоящего изобретения очищенный полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* может быть ковалентно связан с белком-носителем (CP) с использованием реакции конъюгации карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

В соответствии с первым аспектом пятого варианта осуществления изобретения очищенный полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* может быть ковалентно связан с белком-носителем (CP), выбранным из группы, включающей в себя столбнячный токсин, столбнячный анатоксин (TT), дифтерийный анатоксин (DT), CRM197, анатоксин *Pseudomonas aeruginosa*, анатоксин *Bordetella pertussis*, анатоксин *Clostridium perfringens*, LT *E.coli*, ST *E. coli*, термолабильный токсин *Escherichia coli* - субъединица В, комплекс наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, rEPA, белок D *H. influenzae*, флагеллин FliC, гемоцианин мечехвоста, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс наружной мембраны с (OMPС), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis* и детоксифицированный фактор отека (EF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH), сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин (BSA), очищенный белковый дериват туберкулина (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4+ Т-клеток человека к антигенам различных патогенов, таким как N19, белки захвата железа, токсин А или В из белков *C. difficile* и *S.agalactiae* с линкером или без него и их фрагменты, производные, модификации.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с Vi-полисахаридом *Salmonella typhi*, может представлять собой столбнячный анатоксин. Полисахариды, полученные из *S.paratyphi A*, *S.typhimurium* и *S.enteritidis*, могут быть предпочтительно индивидуально конъюгированы с белком-носителем, выбранным из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина или CRM197. Иммуногенные композиции, содержащие следующие конъюгаты полисахарид-белки-носители, предусмотрены в соответствии с настоящим изобретением, и являются следующими: *S. typhi*, конъюгированный со столбнячным анатоксином, *S.paratyphi A*, конъюгированный с TT или DT или CRM197; *S.typhimurium*, конъюгированный с TT, или DT, или CRM197, и *S. enteritidis*, конъюгированный с TT, или DT, или CRM197; *S. typhi*, конъюгированный со столбнячным анатоксином, *S. paratyphi A*, конъюгированный со столбнячным анатоксином; *S. typhimurium*, конъюгированный с CRM197, и *S.enteritidis*, конъюгированный с CRM197, и *S. typhi*, конъюгированный со столбнячным анатоксином, *S. paratyphi A*, конъюгированный с DT; *S.*

typhimurium, конъюгированный с CRM197, и *S. enteritidis*, конъюгированный со столбнячным анатоксином, и *S. typhi*, конъюгированный со столбнячным анатоксином, *S. paratyphi A*, конъюгированный с CRM197; *S. typhimurium*, конъюгированный с CRM197, и *S. enteritidis*, конъюгированный со столбнячным анатоксином.

В соответствии с настоящим изобретением CRM197 получают из рекомбинантного штамма CS463-003 (MB101) *Pseudomonas fluorescens* от компании Pfenex США.

В соответствии с настоящим изобретением TT получают из *Clostridium tetani* (Harvard No 49205), полученного из Центрального исследовательского института (CRI), Национального контрольного органа, Касаули, Химачал-Прадеш, Индия. Центральный исследовательский институт (CRI) закупил этот штамм у института NVI, Нидерланды.

В соответствии с настоящим изобретением DT получают из культур штамма *Cornynebacterium diphtheriae* Park-Williams Number 8, полученного из Центрального исследовательского института (CRI), Касаули, Химачал-Прадеш, Индия.

В соответствии со вторым аспектом пятого варианта осуществления изобретения перед конъюгацией очищенный полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* может быть подвергнут деполимеризации/уменьшению размера с помощью химических средств, выбранных из группы FeCl_3 , H_2O_2 , метапериодат натрия и ацетат натрия, или механических средств, выбранных из группы разрушение клеток высоким давлением и гомогенизатор.

Ещё предпочтительно очищенный полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* может быть подвергнут деполимеризации/уменьшению размера путем разрушения клеток высоким давлением.

Ещё предпочтительно очищенный полисахарид *Salmonella enterica* серовара *typhi* (ViPs) может быть подвергнут деполимеризации/уменьшению размера с помощью ацетата натрия (от 5% до 10%), при этом средняя молекулярная масса ViPs может находиться в диапазоне от 40 до 400 кДа.

Ещё предпочтительно очищенный полисахарид *Salmonella enterica* серовара *typhi* (ViPs) может быть подвергнут деполимеризации/уменьшению размера с помощью ацетата натрия (от 5% до 10%), при этом средняя молекулярная масса ViPs может находиться в диапазоне 100-250 кДа.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что эффективность конъюгации/выход конъюгата, иммуногенность конъюгатов, полученных с использованием полисахаридов с частично уменьшенным размером, была выше по сравнению с конъюгатами, полученными из полноразмерных полисахаридов. Также уменьшение размера полисахаридов снижает вязкость раствора и увеличивает количество реакционноспособных концевых группы, оба фактора способствуют увеличению частоты образования ковалентной связи.

Однако альтернативно очищенный полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* не подвергают деполимеризации/уменьшению размера.

В соответствии с третьим аспектом пятого варианта осуществления изобретения перед конъюгацией белок-носитель (CP) может быть дериватизирован для включения amino- и/или карбоксильных групп посредством гетеро- или гомобифункционального линкера, выбранного из группы, состоящей из гидразина, карбогидразида, хлорида гидразина, дигидразида, ϵ -аминогексановой кислоты, хлоргексанолдиметилацетата, D-глюкуронолактона, цистамина и п-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6-диаминооксигексана или β -пропинамида, нитрофенилэтиламина, галогеналкилгалогенида, 6-аминокапроновой кислоты и их комбинации с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

Ещё предпочтительно гетеро- или гомобифункциональный линкер может представлять собой дигидразид, более предпочтительно дигидразид адипиновой кислоты.

Гидразидные группы могут быть введены в белки через карбоксильные группы аспарагиновой кислоты и остатки глутаминовой кислоты на белке с помощью реакции карбодиимида, восстановительного аминирования, цианилирования, например, путем реакции с гидразином, карбогидразидом, сукцинилдигидразидом, дигидразидом адипиновой кислоты, хлоридом гидразина (например, дигидрохлоридом гидразина) или любыми другими дигидразидами в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC). EDC используется в качестве катализатора для активации и модификации белкового реагента гидразином или дигидразидом.

Предпочтительным является, чтобы реакция белка-носителя (CP) с дигидразидом адипиновой кислоты (ADH) в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), могла проводиться при значении pH от 5 до 7; более предпочтительно 6.

Соответственно реакция белка-носителя (CP) с дигидразидом адипиновой кислоты (ADH) в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), может быть остановлена повышением значения pH от примерно 6 до примерно 7-8.

В качестве альтернативы, после дериватизации белка-носителя ADH, способ может дополнительно включать стадию замены буфера путем диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10 кДа или 30 кДа или 50 кДа (MWCO) и стерилизацию фильтрованием с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм; при этом белок-носитель, дериватизированный ADH, либо подвергают замене буфера, по меньшей мере, 10 объемами, либо пропускают через подходящую гель-фильтрационную колонку, и практически все непрореагировавшие соединения, остаточный ADH и остаточный EDC удаляют, получая очищенный белок-носитель, дериватизированный ADH.

Ещё в качестве альтернативы перед конъюгацией белок-носитель не дериватизируют так, чтобы он содержал amino- и/или карбоксильные группы посредством гетеро- или гомобифункционального линкера.

В соответствии с третьим аспектом пятого варианта осуществления изобретения перед конъюгацией очищенный полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* может быть дериватизирован так, чтобы он содержал amino- и/или карбоксильные группы через гетеро- или гомобифункциональный линкер, выбранный из группы, состоящей из гидразина, карбогидразида, хлорида гидразина, дигидразида, их смеси, ϵ -аминогексановой кислоты, хлоргексанолдиметилацетата, D-глюкуронолактона, цистамин и п-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6-диаминооксигексана или β -пропинамидо, нитрофенилэтиламина, галогеналкилгалогенида, 6-аминокапроновой кислоты и их комбинации с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

Ещё предпочтительно гетеро- или гомобифункциональный линкер может представлять собой дигидразид, более предпочтительно дигидразид адипиновой кислоты.

Гидразидные группы могут быть введены в полисахарид штаммов *Salmonella enterica* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования, цианилирования, например, реакции полисахарида с гидразином, карбогидразидом, сукцинилдигидразидом, дигидразидом адипиновой кислоты, хлоридом гидразина (например, дигидрохлоридом гидразина) или любыми другими дигидразидами в присутствии бромистого циана (CNBr) с образованием гидразидных производных Vi-полисахарида.

Ещё предпочтительно OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* дериватизируют линкером дигидразид адипиновой кислоты (ADH) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования выбирают из группы тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP), 1-цианимидазол (1-CI), 1-цианобензотриазол (1-CBT), тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния ('CDAP'), п-нитрофенилцианат и тетрафторборат N-цианотриэтиламмония ('CTEA') или 2-цианопиридазин-3(2H)он (2-CPO).

Предпочтительно OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* дериватизируют линкером дигидразид адипиновой кислоты (ADH) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагентом цианилирования является тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP), смешанный в соотношении от 1:1 до 1:10 по массе OSP:ADH и соотношение OSP:CPPT может быть в пределах от 0,5 до 1,5, реакцию проводят при значении pH в диапазоне 7-10, продолжительность реакции 1-2 часа, температура в диапазоне от 2°C до 30°C.

В ещё одном аспекте пятого варианта осуществления изобретения перед конъюгацией полисахарид не дериватизируют так, чтобы он содержал amino- и/или карбоксильные группы посредством гетеро- или гомобифункционального линкера.

В предпочтительном аспекте пятого варианта осуществления изобретения полисахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* (ViPs) может быть ковалентно связан с белком-носителем с использованием химии конъюгации карбодиимида, где любой водорастворимый карбодиимид,

более предпочтительно 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), может быть использован в качестве катализатора.

Более предпочтительно Vi-полисахарид может быть ковалентно связан с дериватизированным АДН белком-носителем с использованием химии конъюгации карбодиимида, где в качестве катализатора может быть использован любой водорастворимый карбодиимид, более предпочтительно 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC).

Более предпочтительно Vi-полисахарид может быть ковалентно связан с дериватизированным АДН столбнячным анатоксином с использованием химии конъюгации карбодиимида, где в качестве катализатора может быть использован любой водорастворимый карбодиимид, более предпочтительно 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC).

Альтернативно, Vi-полисахарид, дериватизированный АДН, может быть ковалентно связан со столбнячным анатоксином, дериватизированным АДН, с использованием химии конъюгации карбодиимида, где в качестве катализатора может быть использован любой водорастворимый карбодиимид, более предпочтительно 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC).

Альтернативно, Vi-полисахарид, дериватизированный АДН, может быть ковалентно связан со столбнячным анатоксином с использованием химии конъюгации карбодиимида, где в качестве катализатора может быть использован любой водорастворимый карбодиимид, более предпочтительно 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC).

Ещё предпочтительно очищенный ViPs ковалентно связан с белком-носителем (CP) с использованием реакции конъюгации карбодиимида в присутствии 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC), смешанного в соотношении от 1:0,5 до 1:2 по массе ViPs:EDAC и соотношение Vi-полисахарида и белка-носителя может составлять от 0,5 до 1,5, реакцию проводят при значении pH в диапазоне 5-7, температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

В ещё одном аспекте пятого варианта осуществления изобретения Vi-полисахарид (ViPs) может быть ковалентно связан со столбнячным анатоксином (ТТ), дериватизированным АДН, в присутствии 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC), где массовое соотношение ViPs:ТТ:EDC может составлять 1:1:2, а концентрация Vi-полисахарида и столбнячного анатоксина может составлять от 0,1 мг/мл до 10,0 мг/мл, а соотношение Vi-полисахарида и столбнячного анатоксина может составлять от 0,5 до 1,5.

В ещё одном аспекте пятого варианта осуществления изобретения реакция Vi-полисахарида (ViPs) с дериватизированным столбнячным анатоксином (ТТ) в присутствии 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) осуществляется при значении pH в диапазоне от 5 до 7; более предпочтительно 6; температуре в диапазоне от 2°C до 30°C; более предпочтительно от 10 до 25°C, и эффективность преобразования конъюгата составляет $\geq 70\%$, более предпочтительно $\geq 90\%$, и размер молекулы конъюгата предпочтительно составляет от 1000 до 1600 кДа.

Кроме того, реакцию дериватизированного столбнячного анатоксина (ТТ) и Vi-полисахарида (ViPs) в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), можно остановить, подняв значение pH от примерно 6 до примерно 7-8.

В соответствии с одним аспектом пятого варианта осуществления изобретения полисахарид *S. paratyphi A* (OSP) может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования выбран из группы, включающей в себя тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT), 1-цианоимидазол (1-CI), 1-цианобензотриазол (1-CBT), тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния ('CDAP'), п-нитрофенилцианат и тетрафторборат N-цианотриэтиламмония ('CTEA') или 2-цианопиридазин-3(2H)он (2-CPO).

Более предпочтительно OSP *S. paratyphi A* может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагентом цианилирования является тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) или (CPIP).

Ещё предпочтительно очищенный OSP *S. paratyphi A* ковалентно связан с белком-носителем (CP) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагентом цианилирования является тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT), смешанный в соотношении от 1:0,5 до 1:2 по массе OSP:CPPT и соотношение OSP и белка-носителя может составлять от 0,5 до 1,5, реакцию проводят при значении pH в диапазоне от 5 до 7, при температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом OSP *S. paratyphi A*, может представлять собой столбнячный анатоксин.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом OSP *S. paratyphi A*, может представлять собой дифтерийный анатоксин.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом OSP *S. paratyphi A*, может представлять собой CRM 197.

В ещё одном аспекте пятого варианта осуществления полисахарид *S. typhimurium* может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования выбран из группы, включающей тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT), 1-цианимидазол (1-CI), 1-цианобензотриазол (1-CBT), тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния ('CDAP'), п-нитрофенилцианат и тетрафторборат N-цианотриэтиламмония ('CTEA') или 2-цианопиридазин -3(2H)он (2-CPO).

Более предпочтительно полисахарид *S. typhimurium* может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагентом цианилирования является тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT).

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом *S. typhimurium*, может представлять собой столбнячный анатоксин.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом *S. typhimurium*, может представлять собой дифтерийный анатоксин.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом *S. typhimurium*, может представлять собой CRM 197.

В ещё одном аспекте пятого варианта осуществления изобретения полисахарид *S. enteritidis* может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования выбран из группы, включающей в себя тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT), 1-цианимидазол (1-CI), 1-цианобензотриазол (1-CBT), тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния ('CDAP'), п-нитрофенилцианат и тетрафторборат N-цианотриэтиламмония ('CTEA') или 2-цианопиридазин - 3(2H)он (2-CPO).

Более предпочтительно полисахарид *S. enteritidis* может быть конъюгирован с белком-носителем с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагентом цианилирования является тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT).

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом *S. enteritidis*, может представлять собой столбнячный анатоксин.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом *S. enteritidis*, может представлять собой дифтерийный анатоксин.

Ещё предпочтительно белок-носитель, используемый для конъюгации с полисахаридом *S. enteritidis*, может представлять собой CRM 197.

Авторами настоящего изобретения были найдены способы стабилизации конечного конъюгата полисахарид-белок путем использования альтернативных способов конъюгации, отношения полисахарида к белку, отношения полисахарида к связывающим агентам, использования соответствующих линкеров, соответствующего размера полисахарида. Это же может привести к улучшению соотношения полисахарид-белковый конъюгат в вакцине, что, в свою очередь, может уменьшить количество свободного сахара и свободного белка в конъюгате, снизить подавление белка-носителя, улучшить стерилизацию конъюгата фильтрованием, улучшить контроль конъюгации, и большее количество перекрестных связей внутри молекулы косвенно обеспечивает хороший иммунный ответ.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что на связывание полисахаридов и белков влияют различные факторы, которые зависят от молекулярной массы ViP, типа выбранного белка-носителя, соотношения количества полисахарида: используемого белка-носителя, активации функциональных групп, использования спейсеров и химии конъюгации.

В ещё одном аспекте пятого варианта осуществления изобретения после реакции конъюгации способ может включать в себя этап концентрирования с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замену буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе либо 100 кДа, либо 300 кДа (MWCO); при этом массу конъюгата концентрируют, по меньшей мере, в 3 раза и удаляют по

существованию все непрореагировавшие соединения, неконъюгированный полисахарид, неконъюгированный белок и остаточный EDC, получая конъюгированную вакцину очищенного Vi-полисахарида.

Кроме того, способ может включать в себя гель-фильтрационную хроматографию, при которой массу конъюгата концентрируют, по меньшей мере, в 3 раза и удаляют практически все непрореагировавшие соединения, неконъюгированные полисахариды, неконъюгированные белки и остаточный EDC, получая конъюгированную вакцину очищенного полисахарида *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, где выход конъюгата составляет $\geq 50\%$.

Дополнительный способ очистки может включать в себя комбинацию ультрафильтрации и гель-фильтрационной хроматографии.

В соответствии с шестым вариантом осуществления изобретения иммуногенная композиция может представлять собой моновалентную вакцину, содержащую или Vi-полисахарид *S. typhi*, конъюгированный с белком-носителем, или полисахарид *S. paratyphi A*, конъюгированный с белком-носителем, или *S. typhimurium*, конъюгированный с белком-носителем, или *S. enteritidis*, конъюгированные с белком-носителем.

В соответствии с седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения, иммуногенная композиция может содержать, по меньшей мере, одну двухвалентную комбинацию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем (CP);

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем (CP);

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем (CP);

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем (CP);

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ в диапазоне доз 1,25-50 мкг;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

В соответствии с восьмым вариантом осуществления настоящего изобретения, иммуногенная композиция может содержать, по меньшей мере, одну трехвалентную комбинацию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем (СР);

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ в диапазоне доз 1,25-50 мкг;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

В соответствии с девятым вариантом осуществления настоящего изобретения четырехвалентная иммуногенная композиция может содержать: i) Vi-полисахарид *S. typhi*, конъюгированный с белком-носителем (СР), ii) полисахарид *S. paratyphi A*, конъюгированный с белком-носителем, iii) полисахарид *S. enteritidis*, конъюгированный с белком-носителем, и iv) полисахарид *S. typhimurium*, конъюгированный с белком-носителем.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ в диапазоне доз 1,25-50 мкг;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

В соответствии с десятым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать один или более антигенов, выбранных из группы, состоящей, но без ограничений, из *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella paratyphi C*, антигенов *Salmonella*, таких как везикулы наружной мембраны, белки наружной мембраны (например, OmpC, OmpD, OmpF), сидерофоры (энтеробактин), белки системы секреции типа III (например, SipB, SipD, SseB, SseC и PrgI), флагеллин, нетифоидные *Salmonella spp.*, *Shigella*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, виды

Enterobacter, виды *Yersinia*, виды *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* (серотипы а, с, d, е, f и неинкапсулированные штаммы), гепатит (штаммы А, С, D, Е, F и G), грипп, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* тип 5, *Staphylococcus aureus* тип 8, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10F, 10B, 10C, 10A, 11A, 11F, 11B, 11C, 11D, 11E, 12A, 12B, 12F, 13, 14, 15A, 15C, 15B, 15F, 16A, 16F, 17A, 17F, 18C, 18F, 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33A, 33C, 33D, 33E, 33F, 33B, 34, 45, 38, 35A, 35B, 35C, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A, 48), *Streptococcus* группы А, *Streptococcus* группы В (группа Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII и IX.), *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella pestis*, *Campylobacter spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium spp.*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Treponema spp.*, *Borrelia spp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira spp.*, *Haemophilus ducreyi*, *Corynebacterium diphtheria*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Shigella spp.*, виды *Ehrlichia spp.*, *Rickettsia spp.* и полисахаридов *N. meningitidis* (А, В, С, D, W135, X, Y, Z и 29Е), бесклеточного коклюшного антигена, модифицированной аденилатциклазы, антигена малярии (RTS, S), сибирской язвы, денге, малярии, кори, эпидемического паротита, краснухи, БЦЖ, вируса папилломы человека, японского энцефалита, Денге, Зика, Эболы, чикунгуньи, полиовируса, ротавируса, оспы, желтой лихорадки, флавивируса, опоясывающего лишая и антигенов вируса ветряной оспы.

В соответствии с одиннадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения, композиция содержит, по меньшей мере, одну комбинацию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* А с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* С с белком-носителем;

д) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* Y с белком-носителем;

е) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* W-135 с белком-носителем;

ф) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* X с белком-носителем;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi* А с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* А с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;
или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ в диапазоне доз 1,25-50 мкг;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно, 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с ТТ в дозе 5 мкг.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с CRM197 в дозе 5 мкг.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* с CRM197 в дозе 5 мкг.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W* с CRM197 в дозе 5 мкг.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* с ТТ в дозе 5 мкг.

В соответствии с двенадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция, содержит по меньшей, мере одну комбинацию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

d) столбнячный анатоксин, (T) антиген

e) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

f) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

c) антиген ротавируса;

d) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

e) столбнячный анатоксин, (T) антиген

f) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

g) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

h) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

d) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

e) столбнячный анатоксин, (T) антиген

f) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

g) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

h) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) антиген ротавируса;

d) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

e) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

f) столбнячный анатоксин, (T) антиген

g) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

h) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

i) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

e) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

f) столбнячный анатоксин, (T) антиген

g) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

h) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

i) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) антиген ротавируса;

e) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

f) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

g) столбнячный анатоксин, (T) антиген

h) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

i) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

j) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

e) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

f) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

g) столбнячный анатоксин, (T) антиген

h) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

i) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

j) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

e) антиген ротавируса;

f) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

g) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

h) столбнячный анатоксин, (T) антиген

i) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

j) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

k) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ в диапазоне доз 1,25-50 мкг;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно композиция содержит дифтерийный анатоксин, антиген (D) в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл.

Ещё предпочтительно композиция содержит столбнячный анатоксин (Т) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл.

Ещё предпочтительно композиция содержит цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген, (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, коклюшный анатоксин (PT) 1-50 мкг, филаментный гемагглютинин (FHA) 1-50 мкг, пертактин (P69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальные белки (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

Ещё предпочтительно композиция содержит поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

Ещё предпочтительно композиция содержит антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

Ещё предпочтительно композиция содержит антиген инактивированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инактивированного ротавируса, присутствующих в количестве в диапазоне от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

Ещё предпочтительно композиция содержит антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (ЕД), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

В соответствии с тринадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция содержит, по меньшей мере, одну комбинацию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) антиген ротавируса;

с) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

д) антиген *Shigella* spp.;

е) антиген *Campylobacter jejuni*;

ф) антиген *Vibrio cholerae*;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

- с) антиген ротавируса;
- д) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);
- е) антиген *Shigella* spp.;
- ф) антиген *Campylobacter jejuni*;
- г) антиген *Vibrio cholerae*;
- или
- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;
- с) антиген ротавируса;
- д) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);
- е) антиген *Shigella* spp.;
- ф) антиген *Campylobacter jejuni*;
- или
- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;
- с) антиген ротавируса;
- д) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);
- е) антиген *Shigella* spp.;
- или
- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;
- с) антиген ротавируса;
- д) антиген *Shigella* spp.;
- или
- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;
- с) антиген ротавируса;

d) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

e) антиген *Shigella* spp.;

f) антиген *Campylobacter jejuni*;

g) антиген *Vibrio cholerae*;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) антиген ротавируса;

e) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

f) антиген *Shigella* spp.;

g) антиген *Campylobacter jejuni*;

h) антиген *Vibrio cholerae*;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

e) антиген ротавируса;

f) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

g) антиген *Shigella* spp.;

h) антиген *Campylobacter jejuni*;

i) антиген *Vibrio cholerae*;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ в диапазоне доз 1,25-50 мкг;

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно 0,5 мл композиции содержат конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР в диапазоне доз 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197.

Ещё предпочтительно композиция содержит антиген инактивированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инактивированного ротавируса, присутствующих в количестве в диапазоне от 1 до 50 мкг на 0,5 мл.

В соответствии с одним аспектом варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать буферный агент, выбранный из группы, состоящей из карбоната, фосфата, ацетата, HEPES, сукцината, гистидина, ТРИС, бората, цитрата, лактата, глюконата и тартрата, а также в качестве более сложных органических буферных агентов, включающей в себя 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(гидроксиметил)аминометан или «Трис», вводимый в рецептуру композиции для достижения желаемого значения pH. ещё в одном примере буферным агентом может быть минимальная питательная среда с солями Хэнкса. Другие буферы, такие как HEPES, пиперазин-N, N'-бис (PIPES) и 2-этансульфокислота (MES), также предусмотрены настоящим изобретением. Буфер помогает стабилизировать иммуногенную композицию настоящего изобретения. Количество буфера может быть в диапазоне от 0,1 мМ до 100 мМ, предпочтительно выбрано из 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ и 30 мМ. Количество буфера может находиться в диапазоне от 0,1 мг до 2,0 мг.

Цитратный буфер может быть получен путем растворения моногидрата лимонной кислоты (CAM) в диапазоне от 1,05 до 2,63 мг и дегидрата тринатрийцитрата (TCD) в диапазоне 1,47-3,68 мг.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно содержать ТРИС или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер в диапазоне от 0,1 мг до 2,0 мг.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно содержать ТРИС-буфер в диапазоне от 0,61 мг до 1,52 мг.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно содержать цитратный буфер в диапазоне от 10 мМ до 25 мМ.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно содержать гистидиновый буфер в диапазоне от 0,78 до 1,94 мг.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно содержать сукцинатный буфер в диапазоне от 0,59 до 1,48 мг.

Ещё в одном аспекте варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, выбранные из группы, состоящей из сахаров, поверхностно-активных веществ, полимеров, солей, аминокислот или модификаторов pH.

Примеры поверхностно-активных веществ могут включать в себя ионные и неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 85, нонилфеноксиполиэтанол, т-октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер.

Предпочтительно иммуногенная композиция может содержать полисорбат 20 в качестве фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Примеры полимеров могут включать в себя декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и т.д.

Примеры солей могут включать в себя NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , MgCl_2 и т.д. Предпочтительно солью может представлять собой NaCl. Обычно количество соли может находиться в диапазоне от 100 мМ до 200 мМ.

Предпочтительно иммуногенная композиция может содержать хлорид натрия в количестве от 1 до 10 мг.

Примеры аминокислот в качестве вспомогательных веществ выбраны из группы, состоящей из L-гистидина, лизина, изолейцина, метионина, глицина, аспарагиновой кислоты, трицина, аргинина, лейцина, глутамина, аланина, пептида, гидролизованного белка или белка, такого как сывороточный альбумин.

Предпочтительно иммуногенная композиция может содержать гистидин.

Примеры сахаров в качестве вспомогательных веществ выбраны из группы, состоящей из сахарозы, маннита, трегалозы, маннозы, рафинозы, лактита, лактобионовой кислоты, глюкозы, мальтулозы, изомальтулозы, мальтозы, лактозы, сорбита, декстрозы, фруктозы, глицерина или их комбинации.

Предпочтительно иммуногенная композиция может дополнительно содержать сахарозу.

Примеры полимеров в качестве вспомогательных веществ выбраны из группы декстрана, карбоксиметилцеллюлозы, гиалуроновой кислоты, циклодекстрина.

Ещё предпочтительно однодозовая композиция предпочтительно не содержит консервант.

Однако предпочтительно многодозовая иммуногенная композиция может дополнительно содержать консервант, выбранный из группы, состоящей из 2-феноксиэтанола, хлорида бензетония (фемерола), фенола, м-крезола, тиомерсала, формальдегида, сложных эфиров парабензов (например, метил-, этил-, пропил- или бутилпарабен), хлорида бензалкония, бензилового спирта, хлорбутанола, п-хлор-м-крезола или бензилового спирта или их комбинации. Вакцинная композиция может включать в себя материал для однократной иммунизации или

может включать материал для многократной иммунизации (т. е. «многодозовый» набор). Включение консерванта является предпочтительным в многодозовых композициях. В качестве альтернативы (или в дополнение) включению консерванта в многодозовые композиции, композиции могут содержаться в контейнере, имеющем асептический адаптер для удаления материала. Предпочтительно консервант может представлять собой 2-феноксизтанол в количестве от 0,1 до 50 мг; более предпочтительно 1-10 мг.

Ещё в одном аспекте варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, разбавители, буферные агенты, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы, красители и т.п., в зависимости от пути введения и желаемого препарата.

Ещё в предпочтительном аспекте варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать воду для инъекций в качестве разбавителя.

Ещё в одном аспекте варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать адъювант, выбранный из группы, состоящей из соли алюминия, гидроксида алюминия, фосфата алюминия, гидроксифосфата алюминия и сульфата калия-алюминия.

Ещё в одном аспекте варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может дополнительно содержать иммуностимулирующий компонент, выбранный из группы, состоящей из эмульсии масла и воды, MF-59, липосомы, липополисахарида, сапонина, липида А, производных липида А, монофосфорила липида А, 3-деацилированного монофосфорила липида А, AS01, AS03, олигонуклеотида, олигонуклеотида, содержащего, по меньшей мере, один неметилованный CpG и/или липосому, адъюванта Фрейнда, полного адъюванта Фрейнда, неполного адъюванта Фрейнда, полимеров, сополимеров, таких как полиоксиэтилен-полиоксипропиленовые сополимеры, в том числе блок-сополимеры, полимер р 1005, адъюванта CRL-8300, мурамилдипептидов, 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 его производных, препаратов клеточных стенок микобактерий, производных миколовой кислоты, ионогенных блок-сополимерных поверхностно-активных веществ, OMV, fHbp, комбинации сапонинов со стеролами и липидами.

Ещё в одном аспекте варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может быть полностью жидкой. Подходящие формы жидкого препарата могут включать в себя растворы, суспензии, эмульсии, сиропы, изотонические водные растворы, вязкие композиции и настойки, забуференные до выбранного значения pH.

Ещё предпочтительно иммуногенная композиция может быть полностью жидкой и может быть стабильной при температуре 2-8°C, 25°C и 40°C в течение периода времени в шесть месяцев,

и иметь содержание свободного полисахарида через 6 месяцев не более 7,5% для полисахарида 180-220 кДа и содержание свободного полисахарида через 6 месяцев не более 10,5% для полисахарида 388/80/45 кДа.

Иммуногенная композиция настоящего изобретения может быть получена в форме чрескожных препаратов, включая лосьоны, гели, спреи, мази или другие подходящие способы. Если желательно назальное или респираторное (через слизистую оболочку) введение (например, аэрозольная ингаляция или инсуффляция), то композиции могут быть в форме и распределяться с помощью выдавливаемого спрея-дозатора, помпового дозатора или аэрозольного дозатора. Аэрозоли обычно находятся под давлением, создаваемым углеводородом. Дозаторы с насосом предпочтительно могут выдавать отмеренную дозу или дозу, имеющую конкретный размер частиц. Иммуногенные композиции в форме растворов, суспензий и гелей в некоторых вариантах осуществления изобретения содержат большое количество воды (предпочтительно очищенной воды) в дополнение к активному(ым) ингредиенту(ам). В альтернативном аспекте осуществления изобретения иммуногенная композиция может представлять собой лиофилизированную или сублимированную композицию.

Используемые здесь термины «сублимация» или «лиофилизация» или «сублимационная сушка» включают в себя лиофилизацию и относятся к процессу, при котором суспензия/раствор замораживается, после чего вода удаляется сублимацией при низком давлении. Используемый здесь термин «сублимация» относится к изменению физических свойств композиции, при этом композиция переходит непосредственно из твердого состояния в газообразное состояние, не становясь при этом жидкой.

Соответственно, лиофилизированная иммуногенная композиция может быть стабильной при температуре 2-8°C от 12 до 36 месяцев; при температуре 25°C от 2 до 6 месяцев; при температуре 37°C от 1 недели до 4 недель, при температуре 42°C в течение 2-7 дней и при температуре 55°C в течение 2-7 дней.

В соответствии с одним аспектом варианта осуществления изобретения способ восстановления лиофилизированной иммуногенной композиции может включать в себя этап восстановления лиофилизированной иммуногенной композиции водным раствором, необязательно физиологическим раствором или водой для инъекций (WFI), где конечное значение pH иммуногенной композиции после восстановления находится в диапазоне pH от 6,0 до pH 8,0; более предпочтительно в диапазоне pH от 7,0 до pH 8,0; ещё более предпочтительно в диапазоне pH от 7,2 до pH 7,9; и наиболее предпочтительно в диапазоне pH от 7,5 до pH 7,9.

В соответствии с девятым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может быть получена для применения в способе уменьшения тяжести при возникновении или предотвращения патологического состояния здоровья, вызванного инфекцией штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, включающему в себя введение иммунологически эффективного количества иммуногенной композиции субъекту-человеку путем парентерального, подкожного или внутрикожного,

внутримышечного, внутрибрюшинного или внутривенного введения, или инъекционного введения, или пролонгированного высвобождения из имплантатов, или введения в виде глазных капель, или назального или ректального, буккального или вагинального, перорального или внутрижелудочного введения через слизистую оболочку или перлингвального, альвеолярного или десневого, обонятельного введения или введения через слизистую оболочку дыхательных путей или любыми другими способами иммунизации.

В соответствии с предпочтительным аспектом варианта осуществления изобретения иммуногенная композиция может быть введена человеку внутримышечно или подкожно.

В соответствии с предпочтительным аспектом варианта осуществления изобретения иммунологически эффективное количество иммуногенной композиции, содержащей конъюгат полисахарид-белок, для вакцинации против бактериальной инфекции штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, может составлять от примерно 1 мкг/0,5 мл полисахаридного конъюгата штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* или менее до примерно 100 мкг/0,5 мл полисахаридного конъюгата штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* или более. В некоторых других аспектах оно может составлять от примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мкг до примерно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 мкг на 0,5 мл разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунологически эффективное количество для вакцинации против бактериальной инфекции штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* составляет от 1 мкг/0,5мл до 50 мкг/0,5мл; более предпочтительно конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовара *typhi* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем; присутствует в диапазоне доз от примерно 5 мкг/0,5 мл до примерно 30 мкг/0,5 мл; ещё более предпочтительно конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовара *typhi* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем; присутствует в дозе примерно 25 мкг/0,5 мл.

В соответствии с десятым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенную композицию можно вводить внутримышечно или подкожно в дозе, эффективной для выработки нейтрализующих антител и защиты. Вакцины вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое будет профилактически и/или терапевтически эффективным против тифоидной и NTS-инфекции. Иммуногенную композицию настоящего изобретения можно вводить в качестве первичных профилактических агентов пожилым людям, подросткам, взрослым или детям с риском инфицирования или можно использовать в качестве вторичных агентов для лечения инфицированных пациентов. Например,

описанная здесь иммуногенная композиция может применяться у пожилых людей, подростков, взрослых или детей в возрасте до 2 лет или старше 2 лет, подверженных риску заражения штаммами *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, или могут применяться в качестве вторичных агентов для лечения пациентов, инфицированных штаммами *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

Ещё в качестве альтернативы вакцины против NTS можно вводить младенцам в возрасте от двух до четырех месяцев до того, как пик заболеваемости наступит примерно в возрасте 12 месяцев. Кроме того, внедрение вакцины, вероятно, также охватит группы населения, инфицированные ВИЧ, поскольку они подвержены повышенному риску заражения NTS. В развитых странах вакцины от NTS могут быть нацелены на пожилых людей, у которых очень высокий уровень летальности (до 50 процентов). Предлагается, чтобы программное внедрение на местах у детей напрямую интегрировалась с существующими календарями Расширенной программы иммунизации, возможно, в 6, 10 и 14 недель.

Более предпочтительно иммуногенную композицию можно вводить внутримышечно или подкожно в объёме дозы примерно 0,5 мл или 1 мл.

В соответствии с одиннадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может быть получена в виде флаконов с одной дозой или флаконов с несколькими дозами (флаконы с 2 дозами, или 5 дозами, или 10 дозами), или набора с несколькими дозами, или в виде предварительно заполненных шприцев, где указанная иммуногенная композиция может быть введена по схеме однократной дозы или предпочтительно по схеме многократной дозы, при которой за первичным курсом вакцинации следуют 1-3 отдельные дозы, вводимые с последующими временными интервалами через 1-3 года, если это необходимо. Режим дозирования также будет, по меньшей мере, частично, определяться необходимостью бустерной дозы, необходимой для придания защитного иммунитета.

Ещё предпочтительно, иммуногенная композиция может быть получена для введения людям пожилого возраста, подросткам, взрослым или детям в возрасте до 2 лет или старше 2 лет в соответствии с однодозовым или двухдозовым режимом или трехдозовым режимом, состоящим из первой дозы и/или второй дозы, которая должна быть введена в период времени от 3 месяцев до 2 лет после первой дозы, и/или третьей дозы, которая должна быть введена в период времени от 3 месяцев до 2 лет после второй дозы.

В соответствии с одиннадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенную композицию можно вводить одновременно с другими лекарственными средствами или любой другой вакциной.

В соответствии с ещё одним аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, набор для однодозовой вакцины может включать в себя:

первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;

b) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
 c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
 d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;

e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* – TT 5 мкг на 0,5 мл;
 f) сахароза 1 – 12 мг на 0,5 мл;
 g) цитрат натрия (дигидрат) 0,1 – 2 мг на 0,5 мл;
 h) Трис-буфер 0,05 – 0,5 мг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;

c) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-TT с антигенами *Neisseria meningitidis*, для профилактики брюшного тифа, вызванного антигенами *Salmonella typhi* и *Neisseria meningitidis*, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей, при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

В соответствии со вторым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, набор для однократной вакцины может включать в себя:

первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* – TT 5 мкг на 0,5 мл;
 b) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
 c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
 d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;

e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* – TT 5 мкг на 0,5 мл;
 f) сахароза 1 – 12 мг на 0,5 мл;
 g) цитрат натрия (дигидрат) 0,1 – 2 мг на 0,5 мл;
 h) Трис-буфер 0,05 – 0,5 мг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;

d) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ; антигена OSP с антигенами *Neisseria meningitidis* для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных антигенами *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и *Neisseria meningitidis*, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

В соответствии с третьим аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, набор для однократной вакцины может включать в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую шестивалентную иммуногенную композицию:

a) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

b) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

c) столбнячный анатоксин, (T) антиген в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

d) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1–50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1–20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2–25 мкг; на 0,5мл;

e) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

c) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг на 0,5 мл; и/или

d) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг на 0,5 мл; и/или

e) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости,

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-TT с шестивалентной иммуногенной композицией, для профилактики брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi* и шестивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

В соответствии с четвертым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, набор для однократной вакцины может включать в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую шестивалентную иммуногенную композицию:

a) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

b) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

c) столбнячный анатоксин, (T) антиген в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

d) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1–50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1–20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2–25 мкг; на 0,5мл;

e) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг; и/или

d) трис-буфер, или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг на 0,5 мл; и/или

g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтокситанол, октилфеноксиполиэтокситанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг на 0,5 мл; и/или

h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

е) воду для инъекций (WFI) при необходимости,

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-TT, антигена OSP с шестивалентными антигенами для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и шестивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

В соответствии с пятым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, набор для однократной вакцины может включать в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую семивалентную иммуногенную композицию:

a) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

b) антиген инактивированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инактивированного ротавируса, присутствующий в количестве от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

d) столбнячный анатоксин, антиген (T) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

е) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютинаина (FHA) 1–50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1–20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2–25 мкг; на 0,5 мл;

f) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

б) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;

с) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ с семивалентной иммуногенной композицией, для профилактики брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi* и семивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

В соответствии с шестым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, набор для однократной вакцины может включать в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую семивалентную иммуногенную композицию:

а) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

б) антиген инактивированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инактивированного ротавируса, присутствующий в количестве от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

с) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

д) столбнячный анатоксин, антиген (Т) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

е) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютинаина (FHA) 1–50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1–20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2–25 мкг; на 0,5 мл;

ф) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

d) трис-буфер, или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг на 0,5 мл; и/или

g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг на 0,5 мл; и/или

h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

e) воду для инъекций (WFI) при необходимости,

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-TT; антигена OSP с семивалентными антигенами для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и семивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

Штаммы *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, используемые для разработки иммуногенной композиции настоящего изобретения, могут включать в себя: штамм TY2 *Salmonella enterica* серовара *typhi* с геном «*tvIB*», специфичным для полисахарида Vi (идентифицирован компанией Geneoombio Technologies Private Limited, Пуна и выделен из образца стула пациента с подтвержденным брюшным тифом в клинике имени Виллу Пунавалла, Пуна); *S. typhi*: ATCC 19430; C6524 (NICED, Калькутта, Индия); *S. paratyphi* A: ATCC 9150, полученный от Chromachemie Laboratory Private Limited, Бангалор, CMCC50073, CMCC50973; *S. enteritidis*: ATCC 4931; ATCC 13076; *S. enteritidis* R11; *S. enteritidis* D24359; *S. enteritidis* 618; *S. enteritidis* 502; *S. enteritidis* IV3453219; *S. typhimurium*: *S. typhimurium* 2192; ATCC 14208; *S. typhimurium* 2189; *S. typhimurium* D23580; ATCC 19585; ATCC 700408; (LT2/SL134 (ST19)); *S. typhimurium* 177(ST19) CDC 6516-60; ATCC 700720. Кроме того, для получения иммуногенной композиции настоящего изобретения можно использовать любой аттенуированный штамм *Salmonella* любого серовара (*S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. enteritidis* и *S. typhimurium*).

Salmonella enterica серовар *typhi* депонирована в коллекции NCMR-NCCS; Пуна, Международный орган по депонированию, присвоивший этому штамму регистрационный номер MCC 0193; Обозначение штамма - PDL-1.

Другие раскрытые здесь варианты осуществления изобретения также включают в себя набор вакцин, содержащий первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию, и второй контейнер, содержащий водный раствор, необязательно физиологический раствор, или воду для инъекций (WFI) для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции.

Приведенное выше описание конкретных вариантов осуществления изобретения полностью раскрывает общий характер приведенных здесь вариантов осуществления изобретения,

чтобы другие специалисты в данной области техники, применяя современные знания, могли легко модифицировать и/или адаптировать такие конкретные варианты осуществления изобретения для различных применений, не отступая от общей концепции, и, следовательно, предполагается, что такие адаптации и модификации должны находиться и находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления изобретения. Следует понимать, что используемые здесь фразеология или терминология предназначены для описания, а не для ограничения. Таким образом, несмотря на то, что варианты осуществления изобретения были описаны здесь в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что описанные здесь варианты осуществления изобретения могут применяться на практике с модификацией в рамках сущности и объёма раскрытых здесь вариантов осуществления изобретения.

В настоящем описании термин «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», будут пониматься 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 «один или несколько» или «по меньшей мере, один» предполагает использование одного или нескольких элементов или ингредиентов или количеств, как это может быть в варианте осуществления изобретения для достижения одной или нескольких желаемых целей или результатов.

Любое обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей или тому подобного, включенных в данное описание, предназначено исключительно для предоставления контекста настоящего изобретения. Оно не должно восприниматься как допущение того, что какие-либо или все эти вопросы составляют часть базы предшествующего уровня техники или были общеизвестными в области техники, к которой относится настоящее изобретение, поскольку они существовали где-либо до даты приоритета настоящей заявки.

Числовые значения, данные для различных физических параметров, размеров и величин, являются только приблизительными значениями, и предполагается, что значения, превышающие числовое значение, присвоенное физическим параметрам, размерам и количествам, попадают в объём изобретения, если только обратное не указано в описании.

Несмотря на то, что в настоящем описании особое внимание уделялось конкретным признакам предпочтительного варианта осуществления изобретения, следует понимать, что можно добавить много дополнительных признаков и что в предпочтительный вариант осуществления изобретения можно внести множество изменений, не отступая от принципов настоящего изобретения. Эти и другие изменения в предпочтительном варианте осуществления изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из приведенного здесь раскрытия, при этом следует четко понимать, что вышеизложенный описательный материал следует интерпретировать просто как иллюстрацию настоящего изобретения, а не как его ограничение.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Настоящее изобретение относится к моновалентной и поливалентной полисахаридно-белковой конъюгированной вакцине, содержащей полисахарид, полученный из штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* в любой их комбинации, эффективной для обеспечения защиты от или лечения инфекций против штаммов *Salmonella* серовара *S.typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* или для предотвращения, облегчения или задержки начала или прогрессирования их клинических проявлений.

2. Улучшенный процесс первичных культуральных этапов, последующих этапов и конъюгации.

3. Среда ферментации первичных культуральных этапов не содержит казеинового гидролизата/триптона, казаминовых кислот.

4. Использование i) комбинации пеногасителя, соевого пептона и дрожжевого экстракта ii) доли растворенного кислорода 36-39% и iii) осмоляльности 400-600 мОсмоль/кг, что приводит к повышению выхода полисахаридов на этапе сбора >50%.

5. Улучшенный метод очистки с низким содержанием эндотоксина <10 ЕЭ/мкг, низким содержанием белка <1% и низким содержанием нуклеиновой кислоты <2%, где процесс очистки происходит i) без дезоксихолата натрия (DOC), являющегося продуктом животного происхождения, даже его остаточное содержание в конечном продукте может привести к получению продукта, неприемлемого для регулирующих органов и некоторых религиозных общин, ii) без тритона X iii) без сульфата аммония iv) без каких-либо адсорбентов (гидроксилпатита, фосфата кальция или апатита).

6. Улучшенная эффективность конъюгации (> 60%), улучшенный выход конъюгата (≥ 50%) и стабильность конъюгата, где i) соотношение Ps:Pr:EDAC составляет 1:1:2 ii) стабильность, на которую указывает содержание свободного полисахарида, которое составляет < 5% (предпочтительно < 3%), и содержание свободного белка, которое составляет < 5% (предпочтительно < 4%).

7. Улучшенная иммуногенность конъюгата, приписываемая i) конъюгату Vi-полисахарид-белок, имеющему особый размер от 1200 кДа до 1600 кДа, и ii) полисахарид, используемый для конъюгации, имеет среднюю молекулярную массу от 150 до 300 кДа (предпочтительно от 150 до 250 кДа).

8. Иммуногенная композиция стабильна при температуре 2-8°C, 25°C и 40°C в течение 6 месяцев, и содержание свободного полисахарида через 6 месяцев составляет не более 7,5% для полисахарида массой 180-220 кДа, и содержание свободного полисахарида через 6 месяцев составляет не более 10,5% для полисахарида массой 388/80/45 кДа.

9. Группы мышей, которым вводили бивалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SHPL (Индийский институт сывороток), такую как а) SHPL Vi PS-TT + SHPL O-SP A DT, б) SHPL Vi PS-TT + SHPL O-SP A TT и в) SHPL Vi PS-TT + SHPL O-SP A CRM Vi TT демонстрировали более чем в 4 раза более высокую индукцию IgG (по сравнению с мышами,

которым вводили неконъюгированный Vi PS или неконъюгированный SIPL O-SP A), что указывает на иммуногенный потенциал двухвалентной вакцины SIPL содержащий комбинацию Vi TT и SIPL O-SP A (DT/TT/CRM).

10. Минимум компонентов, входящих в состав вакцины.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что композиции и методы, раскрытые в примерах, которые следуют ниже, представляют собой методы, разработанные авторами настоящего изобретения, которые хорошо работают при практическом применении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как представляющие собой предпочтительные способы его практического применения. Однако, специалисты в данной области техники должны, в свете настоящего раскрытия, понимать, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных раскрытых вариантах осуществления изобретения с получением аналогичного или подобного результат, не отходя от сущности и объема изобретения.

Пример 1

А) Штаммы

Штаммы *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, используемые для разработки иммуногенной композиции настоящего изобретения, могут включать в себя: штамм TY2 *Salmonella enterica* серовар *typhi* с геном «tviB», специфичным для полисахарида Vi (идентифицирован компанией Geneombio Technologies Private Limited, Пуна и выделен из образца стула пациента с подтвержденным брюшным тифом в клинике имени Виллу Пунавалла, Пуна); *Salmonella enterica* серовар *typhi* депонирована в коллекции NCMR-NCCS; Пуна, Международный орган по депонированию, присвоивший этому штамму регистрационный номер MCC 0193; Обозначение штамма - PDL-1, *S. typhi*: ATCC 19430; C6524 (NICED, Калькутта, Индия); *S. paratyphi A*: ATCC 9150, полученный от Chromachemie Laboratory Private Limited, Бангалор, CMCC50073, CMCC50973; *S. enteritidis*: ATCC 4931; ATCC 13076; *S. enteritidis* R11; *S. enteritidis* D24359; *S. enteritidis* 618; *S. enteritidis* 502; *S. enteritidis* IV3453219; *S. typhimurium*: *S. typhimurium* 2192; ATCC 14208; *S. typhimurium* 2189; *S. typhimurium* D23580; ATCC 19585; ATCC 700408; (LT2/SL134 (ST19)); *S. typhimurium* 177(ST19) CDC 6516-60; ATCC 700720. Кроме того, для получения иммуногенной композиции настоящего изобретения можно использовать любой аттенуированный штамм *Salmonella* любого серовара (*S.typhi*, *S.paratyphi A*, *S.enteritidis* и *S.typhimurium*).

Международные патентные заявки WO2018037365, WO2019016654 и WO2020075184 включены в настоящее изобретение в качестве ссылки на препарат дифтерийного анатоксина (DT), столбнячного анатоксина (TT), инактивированных цельных клеток коклюша (wP), бесклеточного коклюша (aP), поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антиген

Haemophilus influenzae типа b (Hib) и инактивированного полиовируса (стандартная доза и сниженная доза полиовируса).

Международная патентная заявка WO2018037365 включена в настоящее изобретение в качестве ссылки на препарат инактивированного полиовируса и инактивированного ротавируса.

Международная патентная заявка WO2013114268 включена в настоящее изобретение в качестве ссылки на препарат менингококковых полисахаридных антигенов из серотипов A, C, W, X и Y.

В) Способ получения полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* при периодическом процессе культивирования с подпиткой включает в себя следующие этапы: (первичный этап ферментации)

1) Инокуляция и сбор на этапе S1:

0,5 мл культуры из флакона с банком клеток разбавляют до 5 мл средой, и полученную культуру петлей наносят штрихом на планшет SCDA и инкубируют при температуре $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение периода времени от 28 до 32 часов.

2) Инокуляция и сбор на этапе S2:

10 хорошо изолированных колоний из планшета этапа S1 инокулируют в коническую колбу, содержащую 40 мл среды. Колбу инкубируют при температуре $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и встряхивании со скоростью 150 ± 10 об/мин до тех пор, пока оптическая плотность (ОП) культуры не достигнет диапазона от 2,5 до 3,5.

3) Инокуляция и сбор на этапе S3:

Когда оптическая плотность (ОП) культуры на этапе S2 достигает диапазона от 2,5 до 3,5, объём культуры 40 мл увеличивают до 800 мл и распределяют по 160 мл содержимого в пять 1-литровых колб. Колбы инкубируют при температуре $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и встряхивании со скоростью 150 ± 10 об/мин, пока ОП культуры не достигнет диапазона от 2,5 до 3,5.

4) Инокуляция и сбор на этапе S4 (ферментер 20 л):

Когда оптическая плотность культуры на этапе S3 достигает диапазона от 2,5 до 3,5, культуру из всех пяти колб объединяют в одной общей колбе для посевного материала и инокулируют в ферментер на 20 л. Продолжают ферментацию, используя следующие параметры:

Параметры процесса ферментации:

Таблица 1: Параметры процесса ферментации	
Параметр	Заданное значение и диапазон
Растворённый кислород (%)	37 (от 30 до 90)
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Воздух (нл/мин)	от 2,0 до 10
Кислород (нл/мин)	от 0,0 до 15

pH	7,0 ± 0,4
Температура (°C)	36,0 ± 2,0

Питательную среду начинают подавать с 3-го часа и увеличивают подачу пропорционально ОП. Ферментацию продолжают в течение 13-15 часов.

5) Инактивация формалином на этапе S4:

После завершения этапа S4 в ферментер добавляют раствор формальдегида, чтобы получить окончательную концентрацию от 0,5 до 1,0% и инкубируют культуру при температуре 36°C ± 2°C в течение 8-10 часов.

6) Разделение клеток центрифугированием:

После завершения этапа инактивации бульон осветляют центрифугированием и собирают надосадочную жидкость.

Центрифугирование выполняют, используя следующие параметры:

Таблица 2: Параметры центрифугирования	
Параметр	Установленное значение
Уставленная температура	2 - 8°C
об/мин	7000 - 8000
Время центрифугирования	от 40 до 60 мин

7) Очистка глубинной фильтрацией:

По окончании центрифугирования супернатант фильтруют с использованием глубинного фильтра.

8) Фильтрация через фильтр с размером пор 0,2 мкм:

После глубинной фильтрации фильтрат подвергают фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

B1. Оптимизация среды для роста *Salmonella typhi* S. paratyphi A; S. typhimurium и S. enteritidis.

Следующие эксперименты были проведены для оптимизации среды и параметров партии;

Эксперимент №: 01 - Для эксперимента была выбрана среда Франца, так как она широко используется для роста грамотрицательных организмов и рассматривается для роста *Salmonella typhi*. Среда Франца использовали для получения маточной культуры и ферментации. В качестве источника углерода в питательную среду была включена глюкоза.

Таблица 3: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента №: 01	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5

Таблица 4: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 01	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625

Маточную культуру получали в одноразовых колбах (125 мл и 500 мл) и инокулировали в 2-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00, 25% растворенного кислорода (DO) и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 5: Значения ОП₅₉₀ в Эксперименте №: 01	
Возраст культуры (часы)	ОП₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	9,68
10	9,7
11	9,57
12	9,3
13	9,2
14	9,5

Выводы: Было обнаружено, что среда Франца поддерживает рост организма *Salmonella typhi* в ограниченной степени. Требовалась дальнейшая оптимизация среды.

Эксперимент №: 02 - Для поддержки роста клеток в ферментационную и питательную среду добавляли дрожжевой экстракт.

Таблица 6: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента №:02	
Материал	Кол-во (г/л)
D- Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14

Таблица 7: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 02	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50

Процедура:

Маточную культуру получали в одноразовых колбах (125 мл и 500 мл) и инокулировали в 2-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00, 25% растворенного кислорода (DO) и

перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 8: Значения ОП ₅₉₀ в Эксперименте №: 02	
Возраст культуры (часы)	ОП ₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	9,68
10	9,7
11	10,1
12	10,6
13	11,2
14	11,8

Выводы: Было обнаружено, что добавление дрожжевого экстракта поддерживает рост организма *Salmonella typhi* в ограниченной степени. Требовалась дальнейшая оптимизация среды.

Эксперимент №: 03 - Для поддержки роста клеток в ферментационную и питательную среды добавляли соевый пептон.

Таблица 9: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 03	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 10: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 03	
Материал	Кол-во (г/л)
D- Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура:

Маточную культуру получали в одноразовых колбах (125 мл и 500 мл) и инокулировали в 2-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с

подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00, 25% растворенного кислорода (DO) и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 11: Значения ОП ₅₉₀ в Эксперименте №: 03	
Возраст культуры (часы)	ОП ₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	9,68
10	9,8
11	10,5
12	11,8
13	12,6
14	13,2

Выводы: Было обнаружено, что добавление соевого пептона поддерживает рост организма *Salmonella typhi*. Требовалась оптимизация параметров партии для производства.

Эксперимент №: 04 - Пеногаситель Ctope был заменен пеногасителем Struktol для улучшения роста клеток.

Таблица 12: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 04	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 13: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 04	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура:

Маточную культуру получали в одноразовых колбах (125 мл и 500 мл) и инокулировали в 2-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00, 25% растворенного кислорода (DO) и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 14: Значения ОП₅₉₀ в Эксперименте №: 04	
Возраст культуры (часы)	ОП₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	10,6
9	11,4
10	12,9
11	13,2
12	13,8
13	14,4
14	15,2

Выводы: Было установлено, что замена пеногасителя С пеногасителем Struktol улучшает рост микроорганизма *Salmonella typhi*.

Эксперимент №: 05 - Исследовали характер роста *Salmonella typhi* при следующих параметрах ферментации в партии в масштабе 20 л. Для партий *Salmonella typhi* были определены подходящие параметры. Растворенный кислород и осмоляльность контролировались в соответствии с экспериментальными заданными значениями.

Таблица 15: Экспериментальные заданные значения для Эксперимента №: 05	
Параметры	Экспериментальные заданные значения
pH	7,0
Температура (°C)	36
Растворенный кислород (%)	30
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	300

Таблица 16: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 05	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 17: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 05	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура: Маточную культуру получали в одноразовых колбах (250 мл и 1 л) и инокулировали в 20-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00 и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 18: Значения ОП₅₉₀ в Эксперименте №: 05	
Возраст культуры (часы)	ОП₅₉₀
0	0,20
1	0,45
2	0,96
3	1,87
4	3,2
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	11,2
10	14,1
11	16,2
12	17,3
13	17,9
14	18,5

Выводы: Из результатов был сделан вывод, что для роста организма *Salmonella typhi* необходима оптимизация параметров, указанных в таблице экспериментальных заданных значений этого эксперимента.

Эксперимент №: 06 - Исследовали характер роста *Salmonella typhi* при следующих параметрах ферментации в партии в масштабе 20 л. Для партий *Salmonella typhi* были определены подходящие параметры. Растворенный кислород и осмоляльность контролировались в соответствии с экспериментальными заданными значениями.

Таблица 19: Экспериментальные заданные значения для Эксперимента №: 06	
Параметры	Экспериментальные заданные значения
рН	7,0
Температура (°C)	36
Растворенный кислород (%)	40
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	400

Таблица 20: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 06	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 21: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 06	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура: Маточную культуру получали в одноразовых колбах (250 мл и 1 л) и инокулировали в 20-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00 и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 22: Значения ОП ₅₉₀ в Эксперименте №: 06	
Возраст культуры (часы)	ОП ₅₉₀
0	0,20
1	0,45
2	0,96
3	1,87
4	3,2
5	4,33
6	8,73
7	11,8
8	15,2
9	17,8
10	19,5
11	20,5
12	21,1
13	21,9
14	22,8

Выводы: Из результатов был сделан вывод, что для роста организма *Salmonella typhi* необходима оптимизация параметров, указанных в таблице экспериментальных заданных значений этого эксперимента.

Эксперимент №: 07 - Исследовали характер роста *Salmonella typhi* при следующих параметрах ферментации в партии в масштабе 20 л. Для партий *Salmonella typhi* были определены подходящие параметры. Растворенный кислород и осмоляльность контролировались в соответствии с экспериментальными заданными значениями.

Таблица 23: Экспериментальные заданные значения для Эксперимента №: 07	
Параметры	Экспериментальные заданные значения
pH	7,0
Температура (°C)	36
Растворенный кислород (%)	37
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	700

Таблица 24: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 07	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 25: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 07	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура: Маточную культуру получали в одноразовых колбах (250 мл и 1 л) и инокулировали в 20-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00 и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 26: Значения ОП₅₉₀ в Эксперименте №: 07	
Возраст культуры (часы)	ОП₅₉₀
0	0,21
1	0,49
2	0,29
3	1,43
4	2,81
5	4,73
6	7,1
7	9,2
8	12,4
9	16,1
10	19,2
11	23,4
12	26,3
13	28,2
14	28,4

Выводы: Из результатов был сделан вывод, что для роста организма *Salmonella typhi* необходима оптимизация параметров, указанных в таблице экспериментальных заданных значений этого эксперимента.

Эксперимент №: 08 - Исследовали характер роста *Salmonella typhi* при следующих параметрах ферментации в партии в масштабе 20 л. Для партий *Salmonella typhi* были определены подходящие параметры. Растворенный кислород и осмоляльность контролировались в соответствии с экспериментальными заданными значениями.

Таблица 27: Экспериментальные заданные значения для Эксперимента №: 08	
Параметры	Экспериментальные заданные значения
рН	7,0
Температура (°C)	36
Растворенный кислород (%)	40
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	700

Таблица 28: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 08	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 29: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 08	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура: Маточную культуру получали в одноразовых колбах (250 мл и 1 л) и инокулировали в 20-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00 и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 30: Значения ОП ₅₉₀ в Эксперименте №: 08	
Возраст культуры (часы)	ОП ₅₉₀
0	0,20
1	0,66
2	1,62
3	3,2
4	5,3
5	8,1
6	11,2
7	16,3
8	19,2
9	23,8
10	27,4
11	28,8
12	30,1
13	31,2
14	32,4

Выводы: Из результатов был сделан вывод, что для роста организма *Salmonella typhi* необходима оптимизация параметров, указанных в таблице экспериментальных заданных значений этого эксперимента.

Эксперимент №: 09 - Исследовали характер роста *Salmonella typhi* при следующих параметрах ферментации в партии в масштабе 20 л. Для партий *Salmonella typhi* были определены подходящие параметры. Растворенный кислород и осмоляльность контролировались в соответствии с экспериментальными заданными значениями.

Таблица 31: Экспериментальные заданные значения для Эксперимента №: 09	
Параметры	Экспериментальные заданные значения
pH	7,0
Температура (°C)	36
Растворенный кислород (%)	40
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	500

Таблица 32: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 09	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 33: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 09	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура: Маточную культуру получали в одноразовых колбах (250 мл и 1 л) и инокулировали в 20-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00 и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 34: Значения ОП₅₉₀ в Эксперименте №: 09	
Возраст культуры (часы)	ОП₅₉₀
0	0,22
1	0,65
2	2,14
3	4,2
4	6,5
5	11,3
6	14,2
7	18,6
8	26,5
9	29,4
10	32,3
11	36,2
12	37,2
13	38,1
14	38,5

Выводы: Из результатов был сделан вывод, что для роста организма *Salmonella typhi* необходима оптимизация параметров, указанных в таблице экспериментальных заданных значений этого эксперимента.

Эксперимент №: 10 - Исследовали характер роста *Salmonella typhi* при следующих параметрах ферментации в партии в масштабе 20 л. Для партий *Salmonella typhi* были определены подходящие параметры. Растворенный кислород и осмоляльность контролировались в соответствии с экспериментальными заданными значениями.

Таблица 35: Экспериментальные заданные значения для Эксперимента №: 10	
Параметры	Экспериментальные заданные значения
рН	7,0
Температура (°C)	36
Растворенный кислород (%)	37
Перемешивание (об/мин)	от 150 до 500
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	500

Таблица 36: Компоненты ферментационной среды для Эксперимента № 10	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	4
Моногидрат дигидрофосфата натрия	4,1
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	18,8
Гептагидрат сульфата магния	2,5
Дрожжевой экстракт	14
Соевый пептон	9

Таблица 37: Компоненты питательной среды для Эксперимента № 10	
Материал	Кол-во (г/л)
D-Глюкоза моногидрат	100
Моногидрат дигидрофосфата натрия	1,025
Гептагидрат моногидрофосфата натрия	0,94
Гептагидрат сульфата магния	0,625
Дрожжевой экстракт	50
Соевый пептон	50

Процедура: Маточную культуру получали в одноразовых колбах (250 мл и 1 л) и инокулировали в 20-литровый ферментер. После инокуляции ферментацию проводили в периодическом режиме с подпиткой. Подпитку добавляли в ферментер для поддержки роста организма *Salmonella typhi*. Процесс происходил при температуре 36°C, pH 7,00 и перемешивании со скоростью от 150 до 500 об/мин (в каскадном режиме для поддержания DO). Периодически добавляли пеногаситель для контроля пенообразования во время ферментации.

Результаты:

Таблица 38: Значения ОП₅₉₀ в Эксперименте №: 10	
Возраст культуры (часы)	ОП₅₉₀
0	0,21
1	0,87
2	2,75
3	5,3
4	8,30
5	14,12
6	18,5
7	24,6
8	30
9	33,3
10	38,6
11	42,4
12	43,1
13	43,7
14	44

Выводы:

Таблица 39: Фармакопоя США – выход (в процентах или других единицах), полученный для каждого из Экспериментов с 1 по 10		
№ п.п.	Описание	Выход (мг/л)
1	Эксперимент-1	142 мг/л
2	Эксперимент-2	180 мг/л
3	Эксперимент-3	210 мг/л
4	Эксперимент-4	452 мг/л
5	Эксперимент-5	463 мг/л
6	Эксперимент-6	480 мг/л
7	Эксперимент-7	492 мг/л
8	Эксперимент-8	510 мг/л
9	Эксперимент-9	537 мг/л
10	Эксперимент-10	600 мг/л

Периодический режим культивирования с подпиткой для получения высокого выхода полисахарида из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* при периодическом культивировании с подпиткой включал в себя использование во время культивирования комбинации пеногасителя J673 STRUKTOL, соевого пептона Difco™ Select Phytone™ UF в диапазоне от 40 до 70 г/л и дрожжевого экстракта Difco™ Yeast Extract UF в диапазоне от 40 до 70 г/л, что приводит к повышению выхода (100-700 мг/л), а параметры ферментации включают в себя поддержание значения pH в диапазоне от 6,7 до 7,1, поддержание температуры в диапазоне 34,0-38,0°C, поддержание уровня растворенного кислорода в пределах 36-39%, перемешивание со скоростью от 150 до 500 об/мин и поддержание осмоляльности в диапазоне 400-600 мОсмоль/кг.

Пример 2

С) Способ очистки полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* (последующие этапы очистки)

С1) Полученный в результате ферментации ViPs подвергается следующим последующим этапам очистки для получения Vi-полисахарида (ViPs) желаемого качества:

п) очистка бактериального капсульного полисахарида путем проточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, одну мембрану с размером пор примерно 0,2 микрометра;

о) концентрирование с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера (20 mM трис-буфер pH-7,5, содержащий 5 mM ЭДТА) с помощью диалитической фильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 100 кДа (MWCO);

р) обработка SDS (20% SDS от исходного количества сырья), этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) (от 4 до 10 mM) и ацетатом натрия (от 5% до 10%) для денатурации белков, нуклеиновых кислот и липополисахарида;

q) осаждение этанолом (от 40% до 70%);

г) центрифугирование и фильтрация путем проточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор примерно 0,2 мкм;

s) обработка 2М хлоридом калия (KCl) для удаления избытка детергента с последующим центрифугированием и фильтрацией с помощью прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор примерно 0,2 мкм;

t) концентрирование с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 30 кДа (MWCO);

u) Селективное осаждение PS с помощью СТАВ (12% СТАВ от исходного количества сырья);

v) центрифугирование и фильтрация с помощью прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки с размером пор от примерно 0,45 микрометра до примерно 0,2 микрометра;

w) удаление примесей белков и нуклеиновых кислот путем промывки осадка 60% этанолом (от 50% до 70%) в присутствии 1М NaCl (от 0,1М до 2М);

x) селективное осаждение полисахарида с использованием 60% этанола (<75% или >95%);

y) растворение полисахарида в WFI или 1М NaCl и концентрирование с помощью фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 30 кДа (MWCO); и

z) Стерилизация фильтрованием через, по меньшей мере, один стерильный фильтр с размером пор примерно 0,2 микрометра в стерильных условиях и хранении при температуре $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

C2) О-специфичный полисахарид (OSP) липополисахарида (LPS) *Salmonella paratyphi*, полученный путем ферментации, подвергают следующим этапам последующей очистки для получения О-специфичного полисахарида из липополисахарида (LPS) *Salmonella Paratyphi A* желаемого качества:

г) центрифугирование при 7000 об/мин в течение 30 минут при 4°C. Собранный клеточный осадок (~1 кг) и супернатант и клеточный осадок суспендируют в 15 л 1М NaCl и перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре.

с) концентрирование с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием кассеты ProstaK 0,45 мкм и мембраны с отсечением по молекулярной массе 30 кДа (MWCO);

т) кислотный гидролиз LPS 1% уксусной кислотой (pH~2,8-3,0) при температуре 90°C в течение 180 мин.

и) смесь охлаждают до комнатной температуры (КТ) и удаляют примесный осадок центрифугированием при 7000 об/мин в течение 45 мин при температуре 25°C.

в) нейтрализация. Супернатант собирают в стеклянную бутылку и нейтрализуют до pH -7,0 раствором аммиака.

w) очистка с помощью прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, одну мембрану с размером пор примерно 0,45 и 0,2 микрометра;

х) добавляют исходный раствор дезоксихолата натрия для получения конечной концентрации 1% и инкубируют в течение 30 минут при перемешивании при температуре 30°C, доводят рН до 2,0 с помощью уксусной кислоты и инкубируют в течение 15 минут при перемешивании при температуре 30°C.

у) центрифугирование при 7000 об/мин в течение 45 мин при температуре 25°C.

z) прямоточная фильтрация (DFF) через, по меньшей мере, одну мембрану с размером пор примерно 0,45 и 0,2 микрометра;

aa) концентрирование с помощью ультрафильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и замена буфера с помощью диафильтрации (DF) с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10 кДа (MWCO);

bb) Стерилизация фильтрованием через, по меньшей мере, один стерильный фильтр с размером пор примерно 0,2 микрометра в стерильных условиях для получения очищенного О-специфичного полисахарида (OSP).

Таблица 40: Аналитические методы, используемые для тестирования на различных этапах

№ п.п.	Тест	Метод испытания	Единицы	Ссылки	Критерии приемлемости
1	Содержание Vi-полисахарида	ВЭАОХ-ИАД	мг/мл	СТД ВОЗ 987	Фактическое значение
2	Идентичность	ЯМР-спектроскопия	нп	нп	Подтверждение идентичности/сопоставимости со стандартом Vi-полисахарида NIBSC.
3	Белковая примесь	Метод Лоури	мг/г	Индийская фармакопея (ИФ)/ Британская фармакопея (БФ)/Европейская фармакопея (ЕФ)0250/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	Должен содержать менее 10,0 мг белка на грамм PS
4	Примесь нуклеиновой кислоты	УФ-спектроскопия (поглощение при 260 нм)	мг/г	ИФ/БФ/ЕФ 0250/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	Должен содержать менее 20,0 мг нуклеиновой кислоты на грамм PS
5	Содержание О-ацетила (лиофилизированный)	Метод Хестрина	ммоль/г	ИФ/БФ/ЕФ 0250/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	Должно быть $\geq 2,0$ ммоль/г полисахарида
6	Содержание влаги	Термогравиметрия	Процент (%)	ИФ/БФ/ЕФ/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	Фактическое значение
7	Распределение по размеру молекул	Эксклюзионная ВЭЖХ	Процент (%)	ИФ/БФ/ЕФ/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	Не менее 50% полисахарида должно быть элюировано до KD 0,3.
8	Содержание эндотоксина	Кинетический турбидиметрический анализ с использованием лизата амёбоцитов мечехвоста (LAL)	ЕЭ/мкг	ИФ/БФ/ЕФ 0250/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	Менее 100 ЕЭ эндотоксина на мкг PS
9	pH	Потенциометрия	Число	--	Фактическое значение
10	Бионагрузка	--	КОЕ/мл	ИФ/БФ/ЕФ/ВОЗ/ Внутриотраслевые документы	100 КОЕ/10 мл PS
11	Общее содержание PS	ВЭАОХ-ИАД	мг/мл	СТД ВОЗ 987	Фактическое значение
12	Средняя молекулярная	Эксклюзионная ВЭЖХ	кДа	СТД ВОЗ 987	Фактическое значение

№ п.п.	Тест	Метод испытания	Единицы	Ссылки	Критерии приемлемости
	масса (СММ)				
13	Идентичность	ЯМР	нп	Внутриотраслевые документы	Сопоставимо с опубликованными данными/стандартом NIBSC
14	Бактериальная и микотическая стерильность	Отвечающая требованиям	нп	СТД ВОЗ 987	Должно соответствовать
15	Концентрация V_i	ВЭАОХ-ИАД	мкг/мл	СТД ВОЗ 987	25 мкг /0,5 мл
16	Свободный полисахарид	ВЭАОХ-ИАД-DOC	Процент (%)	СТД ВОЗ 987/Внутриотраслевые документы	< 40%
17	О-ацетилирование	Метод Хестрина	ммоль/г	СТД ВОЗ 987/Внутриотраслевые документы	> 2,0 ммоль/г V_i
18	Распределение по размеру молекул (MSD)	Эксклюзионная ВЭЖХ	Процент (%)	СТД ВОЗ 987/Внутриотраслевые документы	Для информации (но больше, чем V_i) K_D будет определен
19	Содержание эндотоксина или пирогенов	Кинетический турбидиметрический анализ с использованием лизата амёбоцитов мечехвоста (LAL) и Тест на животных	ЕЭ/мкг	СТД ВОЗ 987	<100 ЕЭ/доза Одобрено НРО
20	Содержание адьюванта и степень адсорбции	Отвечающие требованиям	мг/мл	СТД ВОЗ 987	Фактическое значение
21	Содержание консерванта	Инструмент/подходящий метод	мг/мл	СТД ВОЗ 987/Внутриотраслевые документы	Должно соответствовать
22	Общая безопасность (безвредность)	Тест на животных	нп	СТД ВОЗ 987/Внутриотраслевые документы	Одобрено НРО
23	pH	Потенциометрия	Число	Внутриотраслевые документы	от 6,0 до 8,0
24	Осмоляльность	Осмометр	мОсмоль/кг	СТД ВОЗ 987/Внутриотраслевые документы	Одобрено НРО

Результаты и интерпритация

Таблица 41: Очищенный V_i -полисахарид, данные текущего контроля качества				
Тест	Нормативный показатель	Партия 1	Партия 2	Партия 3
Концентрация полисахарида	Фактическое значение (мг/мл)	3,762	3,52	3,306

Проверка идентичности с помощью ЯМР	Должно соответствовать	Соответствует	Соответствует	Соответствует
Содержание О-ацетила	Не менее 2,0 ммоль/г полисахарида	2,395	2,943	3,336
Белковая примесь	Не более 1% от массы PS	0,797	0,568	0,907
Примесь нуклеиновой кислоты	Не более 2% от массы PS	0,984	1,136	1,180
Содержание эндотоксина	Не более 150 ЕЭ эндотоксина на мкг PS	16,39	52,37	45,33
Распределение по размеру молекул (MSD)	Не менее 50% PS элюируется до достижения коэффициента распределения (K_D) 0,25.	93,38	94,35	94,47
Свободный формальдегид (Остаточное кол-во)	Не более 0,02% мас./об.	0,00	0,00	0,00
Остаточный этанол	Не более 5000 м.д.	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен
Бионагрузка	Не более 100 КОЕ/10 мл PS	0 КОЕ/10 мл PS	0 КОЕ/10 мл PS	0 КОЕ/10 мл PS

Улучшенный способ очистки Vi-PS имеет явные преимущества как с точки зрения простоты осуществления, так и с точки зрения ряда других преимуществ, таких как:

- Улучшенная очистка полисахаридов (с точки зрения извлечения, содержания О-ацетила, эндотоксина, белка, нуклеиновой кислоты, полидисперсности, вязкости) при использовании ацетата натрия (6%) по сравнению с ацетатом натрия (2%)

При использовании ацетата натрия (6%) - значения для

% извлечения DSP - 50%

Вязкость Ps - Данные недоступны

Полидисперсность Ps - Данные недоступны

О-ацетил - 2,9 ммоль/г PS

При использовании ацетата натрия (2%) - значения для

% извлечения DSP - 40%

Вязкость Ps - Данные недоступны

Полидисперсность Ps - Данные недоступны

О-ацетил - 2,6 ммоль/г PS

Ацетат натрия реагирует с нуклеиновыми кислотами. Он распадается на Na^+ и $(\text{CH}_3\text{COO})^-$. Положительно заряженный ион натрия нейтрализует отрицательно заряженный PO^{3-} нуклеиновых кислот; таким образом, помогает в осаждении нуклеиновых кислот. Таким образом,

более высокая концентрация, то есть 6% ацетата натрия, эффективно осаждает примеси клеток-хозяев, такие как нуклеиновые кислоты.

- Улучшенная очистка полисахаридов (с точки зрения извлечения, содержания О-ацетила, эндотоксина, белка, нуклеиновых кислот, полидисперсности, вязкости) при использовании СТАВ (3%) по сравнению с СТАВ (0,5, 1%). СТАВ представляет собой катионное четвертичное поверхностно-активное вещество на основе амина. Он взаимодействует с анионным полисахаридом (ионное взаимодействие), а затем снижает его растворимость, следовательно, он осаждает полисахарид из раствора. Таким образом, более высокая концентрация СТАВ (2%) всегда приводит к осаждению большего количества полисахарида, что дает более высокие выходы, а удаление белковых примесей является дополнительным преимуществом.
- Улучшенная очистка полисахаридов (с точки зрения извлечения, содержания О-ацетила, эндотоксина, белка, нуклеиновых кислот, полидисперсности, вязкости) для предложенного способа без DOC по сравнению со способом на основе DOC.

Преимущество улучшенного способа без использования DOC

1. Нормативно-правовая проблема: DOC является компонентом животного происхождения и не соответствует требованиям HALAL. Он производится и поставляется одним поставщиком по всему миру, в то время как SDS является синтетическим детергентом, сертифицированным HALAL и имеющим несколько поставщиков по всему миру.

2. Функциональная проблема: DOC расщепляет эндотоксины, не влияя на химический состав, и после удаления детергента он может восстановить свою биологическую активность, тогда как SDS благодаря своей амфипатической природе и более высокому числу агрегации хорошо денатурирует и растворяет белки, а также необратимо разрушает эндотоксины на их мономерные звенья.

- Новый улучшенный способ очистки Vi-PS разработан без использования дезоксихолата натрия (DOC), который является компонентом животного происхождения, или фенола. Улучшенный способ основан на обратной очистке полисахаридов, при которой примеси клеток-хозяев, такие как белки, нуклеиновые кислоты и липополисахариды, удаляются на начальных этапах с использованием ацетата натрия (6%), додецилсульфата натрия (2%) и этанола (40%), а также на концентрировании и диафильтрации с использованием на разных этапах мембран с отсечением по молекулярной массе 30 кДа, затем полисахарид осаждают катионным детергентом СТАВ и выполняют этапы тонкой очистки для достижения более высоких выходов очищенного Vi-полисахарида, который соответствует требованиям ВОЗ.
- Способ очистки приводит к значительному извлечению полисахарида примерно от 40% до 65% с желаемыми уровнями О-ацетила (более 2,0 ммоль/г полисахарида), с выходом очищенного Vi-полисахарида в диапазоне от 400 до 4000 мг/л. Было установлено, что его средняя молекулярная масса находится в диапазоне от 40 до 400 кДа, он содержит менее 1% белков/пептидов, менее 2% нуклеиновых кислот, менее 100 ЕЭ эндотоксинов на мкг

полисахарида (PS), имеет следующее распределение по размеру молекул: более 50% PS элюируется до достижения коэффициента распределения (KD) 0,25.

- Способ очистки О-специфичного полисахарида (OSP) приводит к значительному снижению содержания эндотоксина (< 100 ЕЭ эндотоксина на мкг PS), примесей белка ($< 1\%$) и нуклеиновой кислоты ($< 2\%$), более высокому извлечению капсульного полисахарида в диапазоне от 40% до 65%, с желаемыми уровнями О-ацетила ($> 2,0$ ммоль/г полисахарида), распределением по размеру молекул ($> 50\%$ PS элюируется до достижения коэффициента распределения (KD) 0,25), и средняя молекулярная масса очищенного О-специфичного полисахарида (OSP) находится в диапазоне от 40 до 200 кДа.

Пример 3

D) Способ конъюгации полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* серовара *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с белком-носителем.

Белок-носитель, используемый для конъюгации с Vi-полисахаридом *Salmonella typhi*, представляет собой столбнячный анатоксин. Полисахариды, полученные из *S. paratyphi A*, *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, по отдельности конъюгируют с белком-носителем, выбранным из столбнячного анатоксина (TT), дифтерийного анатоксина (DT) или CRM197.

В соответствии с настоящим изобретением CRM197 получают из рекомбинантного штамма CS463-003 (MB101) *Pseudomonas fluorescens* от компании Pfenex США.

В соответствии с настоящим изобретением TT получают из *Clostridium tetani* (Harvard No 49205), полученного из Центрального исследовательского института (CRI), Национального контрольного органа, Касаули, Химачал-Прадеш, Индия. Центральный исследовательский институт (CRI) закупил этот штамм у института NVI, Нидерланды.

В соответствии с настоящим изобретением DT получают из культур штамма номер 8 *Corynebacterium diphtheriae* Park-Williams, полученного из Центрального исследовательского института (CRI), Национального контрольного органа, Касаули, Химачал-Прадеш, Индия. Центральный научно-исследовательский институт (CRI) закупил этот штамм у Wellcome Research Laboratories.

D1) Получение моновалентного конъюгата *Salmonella typhi* с использованием химии карбодимида:

Этап 1: Концентрация и дериватизация TT

Процедура:

а) TT, очищенный при помощи гель-фильтрационной хроматографии (ГФХ) (содержание мономеров более 90%), концентрировали с использованием мембраны 10 кДа для достижения концентрации белка не менее 12 мг/мл (анализ Лоури).

б) Коэффициент дериватизации использовали, как указано ниже, и соответственно рассчитывали требуемые количества.

Pr:ADH:EDC как 1:6,0:1

Масштаб дериватизации: 13 г

с) Концентрированный ТТ (в 0,9% NaCl), 1М раствор MES, pH 6,0, раствор ADH (растворенный в 0,1М растворе MES, pH 6,0) и раствор EDC (растворенный в 0,1М растворе MES, pH 6,0) добавляли последовательно и доводили окончательный требуемый объем путем добавления 0,1 М буфера MES, pH 6,0. Окончательная концентрация (Pr) в реакции составлял ~4,5 мг/мл.

d) Реакционную смесь перемешивали и оставляли для перемешивания примерно на 1 час при pH 5,90. Затем реакцию дериватизации останавливали, доводя значение pH выше 7,5 с использованием 0,1 М фосфатного буфера, содержащего ЭДТА, pH 8,0.

e) Остановленную реакционную смесь подвергали диафильтрации с использованием мембраны с отсечением по молекулярной массе 10 кДа против 10 mM фосфатного буфера с использованием 22 объемов, а затем 0,1 М буфера MES, pH 6,0, по меньшей мере, 12 объемов для удаления непрореагировавших фрагментов и других остатков.

f) Дериватизированный образец анализировали на общую концентрацию Pr с помощью анализа Лоури и степени дериватизации с помощью колориметрического (ТНБС) анализа.

Результаты:

Концентрация дериватизированного Pr по анализу Лоури: 15 мг/мл

Значение степени дериватизации (DOA): 19

Процент извлечения: ~75 %

Этап 2: Конъюгация Vi-PS с дериватизированным ТТ

Процедура:

Конъюгацию Vi-PS с дериватизированным ТТ выполняли с использованием химии карбодимида.

Для конъюгации использовали следующие параметры PS и Pr.

a. Использовали соотношение для реакции конъюгации Ps:Pr:EDC::1:0,9:1,75 (+ 0,5 для Pr и EDC). Масштаб конъюгации 10 г.

b. Необходимый объем партии PS добавляли в предварительно простерилизованную стеклянную бутылку.

c. 1М буфер MES с pH 6,0 (исходный буфер) добавляли в отмеренный объем PS для достижения концентрации 0,1М MES.

d. Смесь перемешивали при ~100 об/мин для перемешивания до однородного состояния.

e. Затем отмеренный объем дериватизированного ТТ добавляли в бутылку, содержащую Ps.

f. После добавления ТТ в описанную выше реакцию сразу же добавляли свежеприготовленный EDC (растворенный в 0,1 М буфере MES, pH 6,0).

g. Измеряли и регистрировали значение pH (pH 6,0+0,5)

h. Образец анализировали через разные промежутки времени с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Отслеживали процент конъюгации и расход белка.

i. Реакцию останавливали через 1,45 часа путем повышения значения pH до 7,5 с использованием 0,1 М фосфатного буфера, содержащего ЭДТА, при расходе белка <90%.

j. Остановленную реакционную смесь хранили при температуре 2-8°C до дальнейшего использования.

Этап 3: Очистка погашенного конъюгата Vi-TT

Очистку погашенного конъюгата проводили двумя способами для удаления непрореагировавшего Ps, непрореагировавшего Pr и других остатков с использованием следующих параметров;

1. Метод ультрафильтрации:

Следующие параметры использовали для диафильтрации;

Масштаб диафильтрации: 8,5 г

Концентрация Ps во время DF: ~2мг/мл

Отсечение мембраны: 300 кДа

Производитель мембраны: Pall

Площадь мембраны: 2,5 м²

Используемый буфер А: 10 mM ФСБ не менее 25 объёмов.

Используемый буфер В: 0,9% NaCl, 30 объёмов.

Конечный объём: 6,5 л

Очищенный конъюгат фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,2 мкм.

2. Гель-фильтрационная хроматография:

Погашенный конъюгат массой примерно 1,5 г концентрировали на мембране площадью 0,1 м² с отсечением по молекулярной массе 300 кДа до концентрации ~2-4 мг/мл. Очистку конъюгата проводили для удаления несвязанного PS, несвязанного TT и остаточного EDC с использованием гель-фильтрационной хроматографии.

Были проведены два отдельных цикла ГФХ с одинаковыми параметрами очистки.

Хроматографические условия, используемые для очистки, были следующими:

Таблица 42: Хроматографические условия, используемые для очистки конъюгатов		
№ п.п.	Параметры	Значения
1	Используемая хроматография	Гель-фильтрация
2	Используемая колонка	Серия BPG
3	Используемая смола	Toyopearl 'HW'65F
4	Буфер для элюции	0,17 M NaCl
5	Рабочая линейная скорость потока	30 см/час
6	Рабочая объёмная скорость потока	40 мл/мин
7	Загрузка образца	3,5% от общего объёма слоя
8	Сбор фракции	1 мин

1. В общей сложности 27 собранных фракций (по 100 мл каждая) анализировали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и объединяли вместе на основе хроматографического профиля.

2. Фракции анализировали на содержание Ps методом ВЭАОХ-ИАД, содержание Pr по методу Лоури, % свободного Ps методом ДОС-ВЭАОХ-ИАД.

3. На основании анализа Фракции объединяли (от 1 до 23) и фильтровали с использованием фильтра с размером пор 0,22 мкм.

4. Образец анализировали на содержание Ps, содержание P_г и на содержание свободного Ps и эндотоксина, а также на содержание О-ацетила, стерильность, значение рН и на эндотоксин.

Результаты и интерпретация:

Таблица 43: Данные текущего контроля качества конъюгата Vi-TT, очищенного с помощью ультрафильтрации и ГФХ		
Тест	Конъюгат Vi-TT, очищенный ультрафильтрацией	Конъюгат Vi-TT очищенный ГФХ
Содержание Ps	1,43 мг/мл	1,36 мг/мл
Содержание Pr	1,04 мг/мл	1,20 мг/мл
Соотношение PS/Pr	1,37	1,13
Извлечение %	60	52
pH	6,67	5,63
Эндотоксин	0,35 ЕЭ/мкг 505,89 ЕЭ/мл	0,46 ЕЭ/мкг 619,61 ЕЭ/мл

Сравнительные данные способа конъюгации. Улучшенная эффективность конъюгации, улучшенный выход конъюгата и стабильность (свободный Ps, свободный Pr) тифоидного конъюгата SIPL, в котором соотношение Ps:Pr:EDAC составляет 1:1:2 по сравнению с другими соотношениями Ps:Pr:EDAC.

Улучшенная эффективность конъюгации: наблюдаемый процент конъюгации превышает 90%.

Улучшенный выход конъюгата: очистка, выполненная с использованием различных методов, т.е. метода ультрафильтрации и метода гель-фильтрации с переменным масштабом очистки конъюгата, при которых степень извлечения составила от 40 до 87%.

При использовании соотношения 1:1:2 против 1:1,5:1,2, 1:0,9:2, 1:0,9:1,75, 1:0,8:1,8, 1:0,7:1,8, 1:0,9:0,6, 1:0,9:1 и 1:0,7:1,5 для конъюгации Vi-TT было обнаружено, что более низкое содержание белка с 1,5 EDC может обеспечить оптимальную эффективность конъюгации (%).

Было обнаружено, что ViPs переменного размера могут быть конъюгированы с TT, активированным ADH.

Используемые различные соотношения, такие как Ps:Pr:EDC::1:0,7:1,8, 1:0,8:1,8, 1:0,9:2 и 1:1:2 при более низком значении pH при различных способах очистки, обеспечивают соотношение PS/Pr более 0,5, более низкое содержание свободного PS с хорошим извлечением конъюгатов.

D2) Получение моновалентных конъюгатов *Salmonella paratyphi*:

Для конъюгации OSP *Paratyphi* с белком-носителем дифтерийного анатоксина (DT), CRM197 и столбнячного анатоксина (TT) применяли два типа химических реакций конъюгации (цианилирование и химия карбодиимида):

1) Конъюгация OSP *Paratyphi* с белком-носителем дифтерийным анатоксином (DT), CRM197 и столбнячным анатоксином (TT) на основе химии цианилирования

A) Дериватизация дифтерийного анатоксина (DT) (добавление линкера ADH) с использованием химии карбодиимида и конъюгация с концентрированным OSP с использованием химии цианилирования.

В) Дериватизация CRM197, столбнячного анатоксина (ТТ) (добавление линкера АДН) с использованием химии карбодиимида и конъюгация с концентрированным OSP с использованием химии цианилирования.

С) Дериватизация столбнячного анатоксина (ТТ) (добавление линкера АДН) с использованием химии карбодиимида и конъюгация с концентрированным OSP с использованием химии цианилирования.

1А) Получение конъюгатов *S. Paratyphi* с использованием в качестве белка-носителя дифтерийного анатоксина.

1) Дериватизация белка:

Дифтерийный анатоксин с высоким содержанием мономеров (DT) концентрировали до 10-20 мг/мл на мембране 10 кДа и анализировали на содержание белка.

Таблица 44: Содержание белка, измеренное с помощью анализа ВСА (бицинхониновой кислоты).	
Образец	Общий белок мг/мл
Концентрированный DT	12,27

К концентрированному DT добавляли свежеприготовленный 1М буфер MES и дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенном в 100 мМ буфере MES, pH:5,8) в весовом соотношении 1:10 и EDAC (1-этил-3- (3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенном в 100 мМ буфере MES, pH:5,8) в весовом соотношении 1:1. Реакцию продолжали при pH 5,8 в течение примерно 1 часа, а затем реакцию смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF через мембрану 10 кДа в 50 мМ боратном буфере pH 9,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание белка и степень дериватизации.

Таблица 45: Степень дериватизации (СД), оцененная анализом с ТНБС		
Образец	Общий белок мг/мл	СД
ADH-дериватизированный DT	40	16,40

2) Конъюгация полисахарида *S. Paratyphi* A (OSP) и DT, дериватизированного АДН:

Были проведены два эксперимента по изменению соотношения тетрафторбората 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP).

Эксперимент №:1 - OSP концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации (10-15 мг/мл).

Таблица 46: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Общее содержание PS мг/мл
Концентрированный OSP	13,48

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,3. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в массовом соотношении 1:0,8 PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

Ссылка на Фигуру 1: Сравнение полисахарида, белка и конъюгата (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,3)

3) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Колонку XK16/70 готовили с использованием смолы для ГФХ (Tyosearl HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объёма колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку, и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. **Фракции 2-9** объединяли в соответствии с профилем ВЭЖХ. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Таблица 47: Оценка очищенного конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,3)			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
OSP-DT ADH конъюгат 1	0,215	0,210	1,02

Ссылка на Фигуру 2: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,3)

Эксперимент №: 2 -

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,1. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,1.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

Ссылка на Фигуру 3: Сравнение полисахарида, белка и конъюгата (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,1)

Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Колонку XK16/70 готовили с использованием смолы для ГФХ (Tyosearl HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объёма колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку, и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. **Фракции 2-8** объединяли в соответствии с профилем ВЭЖХ. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Таблица 48: Оценка очищенного конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,1)			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)

OSP-DT ADH конъюгат 2	0,113	0,100	1,13
-----------------------	-------	-------	------

Ссылка на Фигуру 4: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,1)

Вывод: Конъюгация PS *Paratyphi A* с использованием DT, дериватизированного ADH, оказалась успешной, и соотношение PS/PR было признано удовлетворительным.

1B. Получение конъюгатов *S. Paratyphi* с использованием в качестве белка-носителя CRM197

1) Дериватизация белка: Для дериватизации был взят перекрестно реагирующий мутант (CRM197), полученный из производственного отдела (SIPL).

Таблица 49: Содержание белка, измеренное с помощью анализа ВСА (бицинхониновой кислоты).	
Образец	Общий белок мг/мл
Концентрированный CRM197	32

К концентрированному CRM197 добавляли свежеприготовленный 1М буфер MES и дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл, растворенный в 100 мМ буфере MES, pH:6,5) в весовом соотношении 1:3,5 и EDAC (1-этил-3- (3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл, растворенный в 100 мМ буфере MES, pH: 6,5) в весовом соотношении 1:0,25. Добавляли 5% Tween 80. Конечный реакционный объем довели с использованием 100 мМ буфера MES до достижения конечной концентрации 3-4 мг/мл. Реакцию продолжали при pH 6,5 в течение примерно 3 часов, а затем реакционную смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF через мембрану 10 кДа в 50 мМ боратном буфере и 0,005% Tween 80 pH 9,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание белка и степень дериватизации.

Краткое описание анализа или ссылки: Содержание белка измеряли с помощью анализа ВСА (бицинхониновой кислоты).

Таблица 50: Степень дериватизации (СД), оцененная анализом с ТНБС		
Образец	Общий белок мг/мл	СД
ADH-дериватизированный CRM197	32	6,74

2) Конъюгация полисахарида *S. Paratyphi A* (OSP) и CRM197, дериватизированного ADH:

OSP, полученный из DSP, концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации (10-15 мг/мл).

Таблица 51: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Общее содержание PS мг/мл
Концентрированный OSP	11,7

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,3.

Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:1 PS:PR:CPIР как 1:1:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

Ссылка на Фигуры 5 и 6: Сравнение полисахарида, белка и конъюгата (PS:PR:CPIР как 1:1:1,3)

3) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Колонку XK16/70 готовили с использованием смолы для ГФХ (Tюorearl HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объёма колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку, и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Фракции 2-7 объединяли в соответствии с профилем ВЭЖХ. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Таблица 52: Оценка очищенного конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIР как 1:1:1,3)			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
OSP-CRM ADH конъюгат	0,150	0,220	0,681

Ссылка на Фигуру 7: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIР как 1:1:1,3)

Вывод: конъюгация PS *Paratyphi A* с использованием CRM197, дериватизированного ADH, оказалась успешной, и соотношение PS/PR было признано удовлетворительным.

1С) Получение конъюгатов *S. Paratyphi* с использованием в качестве белка-носителя столбнячного анатоксина:

1) Дериватизация белка: высокомономерный столбнячный анатоксин (ТТ), полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 15-20 мг/мл на мембране 30 кДа и анализировали на содержание белка.

Таблица 53: Содержание белка, измеренное с помощью анализа по методу Лоури	
Образец	Общий белок мг/мл
Концентрированный ТТ	16,29

К концентрированному ТТ добавляли свежеприготовленный 1М буфер MES и дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл, растворенный в 100 мМ буфере MES, pH:6,0) в весовом соотношении 1:10 и EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH:6,0) в весовом соотношении 1:1. Реакцию продолжали при pH 6,0 в течение примерно 1 часа, а затем реакционную смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF через мембрану 30 кДа в 10 мМ фосфатном буфере с pH 7,2 для удаления остатков и

непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание белка и степень дериватизации.

Краткое описание анализа или ссылки: Содержание белка измеряли методом Лоури.

Таблица 54: Степень дериватизации (СД), оцененная анализом с ТНБС		
Образец	Общий белок мг/мл	СД
ADH-дериватизированный ТТ	16,29	12,9

2) Конъюгация полисахарида *S. Paratyphi A* (OSP) и ТТ, дериватизированного ADH:

OSP, полученный из DSP Team, концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-13 мг/мл.

Таблица 55: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Общее содержание PS мг/мл
Концентрированный OSP	13,20

Были проведены два эксперимента по изменению соотношения тетрафторбората 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP)

Эксперимент №:1

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) добавляли к полисахариду в весовом соотношении 1:1,25. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 PS:PR:CPIP 1:0,8:1,25.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

Ссылка на Фигуру 8: Сравнение полисахарида, белка и конъюгата (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,25)

3) Очистка конъюгата ультрафильтрацией: Гашенный конъюгат очищали диафильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 mM ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 mM Трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

Таблица 56: Оценка очищенного конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,25)			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
OSP-ТТ ADH конъюгат	0,098	0,120	0,816

Ссылка на Фигуру 9: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,25)

Эксперимент №: 2

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,3.

Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:0,9 PS:PR:CPIP 1:0,9:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

Ссылка на Фигуру 10: Сравнение полисахарида, белка и конъюгата (PS:PR:CPIP 1:0,9:1,3)

3) Очистка конъюгата ультрафильтрацией: Гашенный конъюгат очищали диафильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 mM ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 mM Трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

Таблица 57: Оценка очищенного конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:0,9:1,3)			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
OSP-TT ADH конъюгат	0,025	0,035	0,715

Ссылка на Фигуру 11: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:0,9:1,3)

Вывод: конъюгация PS *Paratyphi A* с использованием TT, дериватизированного ADH, была признана успешной, применялись два различных типа стратегии диафильтрации, и оба процесса давали удовлетворительное соотношение PS/Pr.

2) Основанная на химии карбодиимида конъюгация OSP *Paratyphi* с белком-носителем дифтерийного анатоксина (DT), CRM197 и столбнячного анатоксина (TT)

А) Дериватизация концентрированного OSP (добавление линкера ADH) с использованием химии цианилирования и конъюгация со столбнячным анатоксином (TT) с использованием химии карбодиимида.

В) Дериватизация концентрированного OSP (добавление линкера ADH) с использованием химии цианилирования и конъюгация с дифтерийным анатоксином (DT) с использованием химии карбодиимида.

С) Дериватизация концентрированного OSP (добавление линкера ADH) с использованием химии цианилирования и конъюгация с CRM197 с использованием химии карбодиимида.

2А) Получение конъюгатов *S. Paratyphi* с использованием в качестве белка-носителя столбнячного анатоксина.

1) Дериватизация полисахарида: OSP, полученный из DSP Team, концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-13 мг/мл.

Таблица 58: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Общее содержание PS мг/мл
Концентрированный OSP	13,20

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) добавляли к полисахариду в весовом соотношении 1:0,7. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенный в 0,5 М натрий-бикарбонатном буфере, pH: 8,0) в весовом соотношении 1:10 PS:ADH:CPIP как 1:10:0,7. Реакцию продолжали при pH 9,5 в течение примерно 2 часов, гасили добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе, а затем реакцию смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF на мембране 10 кДа в 100 мМ буфере MES с pH 6,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание полисахаридов.

Таблица 59: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Содержание PS мг/мл
Содержание PS	20,7

2) **Получение белка:** высокомономерный столбчатый анатоксин (ТТ), полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 10-15 мг/мл на мембране 30 кДа и анализировали на содержание белка.

Краткое описание анализа или ссылки: Содержание белка измеряли методом Лоури.

Таблица 60: Содержание белка, измеренное с помощью анализа методом Лоури	
Образец	Общий белок мг/мл
Концентрированный ТТ	15,3

3) **Конъюгация дериватизированного ADH полисахарида *S. Paratyphi A* (OSP) и концентрированного ТТ:** Для проверки конверсии Pr проводили два эксперимента при разных температурах.

Эксперимент № :1

К дериватизированному ADH PS добавляли белок в весовом соотношении 1:0,9 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,86. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 6°C, соотношении PS:PR:EDC 1:0,9:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 23 часа добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

Ссылка на Фигуру 12: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации (остановка реакции через 23 часа)

4) **Очистка конъюгата ультрафильтрацией:** Гашенный конъюгат очищали диафильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 мМ ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 мМ трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

Таблица 61: Оценка очищенного конъюгата OSP ADH-TT (PS:PR:EDC 1:0,9:0,86)			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
ADH OSP-TT конъюгат	0,013	0,200	0,06

Эксперимент № :2

К дериватизированному ADH PS добавляли белок в весовом соотношении 1:0,9 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,86. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 10°C, соотношении PS:PR:EDC 1:0,9:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 4 часа добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

Ссылка на Фигуру 13: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации

4) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Готовили колонку XK16/70 с использованием смолы ГФХ (Tuoperal HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объема колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку, и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Фракции 2-10 объединяли в соответствии с профилем ВЭЖХ. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Таблица 62: Оценка очищенного конъюгата ADH OSP-TT			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
ADH OSP-TT конъюгат	0,017	0,270	0,06

Вывод: С помощью химии обратной конъюгации (активация PS) конъюгация, дериватизированного ADH PS *Paratyphi A* и концентрированного TT была признана успешной при повышении температуры от 6 до 10°C. Скорость реакции конъюгации была увеличена, соотношение PS/Pr было очень низким в обеих реакциях.

2B) Получение конъюгатов *S. Paratyphi* с использованием в качестве белка-носителя дифтерийного анатоксина.

1) Дериватизация полисахарида: OSP, полученный из DSP Team, концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-13 мг/мл.

Таблица 63: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Общее содержание PS мг/мл
Концентрированный OSP	10,09

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) добавляли к полисахариду в весовом соотношении 1:0,7. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенный в 0,5 М натрий-бикарбонатном буфере, pH: 8,0) в весовом соотношении 1:10 PS:ADH:CPIP как 1:10:0,7. Реакцию продолжали при pH 9,5 в течение примерно 2 часов, гасили добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим

количества PS по массе, а затем реакцию смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF на мембране 10 кДа в 100 мМ буфере MES с pH 6,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание полисахаридов.

Таблица 64: Содержание полисахарида, определенное с помощью антронового анализа	
Образец	Содержание PS мг/мл
Содержание PS	18,20

2) Получение белка: Высокомономерный дифтерийный анатоксин (DT), полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 10-20 мг/мл на мембране 10 кДа и анализировали на содержание белка.

Краткое описание анализа или ссылки: Содержание белка измеряли методом Лоури.

Таблица 65: Содержание белка, измеренное с помощью анализа методом Лоури	
Образец	Общий белок мг/мл
Концентрированный DT	16,09

3) Конъюгация дериватизированного ADH полисахарида *S. Paratyphi A* (OSP) и концентрированного DT: Проверку конверсии P_г для DT проводили в тех же условиях, что и для конъюгата TT.

Эксперимент № :1

К PS, дериватизированному ADH, добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,86. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 6°C, соотношении PS:PR:EDC 1:0,8:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 20 часов добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

Ссылка на Фигуру 14: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации (остановка реакции через 20 часов)

4) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Готовили колонку XK16/70 с использованием смолы ГФХ (Tюрегал HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объема колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку, и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Фракции 2-12 объединяли в соответствии с профилем ВЭЖХ. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Таблица 66: Оценка очищенного конъюгата OSP ADH-DT (PS:PR:EDC 1:0,9:0,86)			
Образец	TPS (мг/мл)	TP_г (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
ADH OSP-DT конъюгат	0,020	0,300	0,060

Ссылка на Фигуру 15: Хроматограмма, изображающая очищенный конъюгат (объединенные фракции)

Эксперимент №: 2

К PS, дериватизированному ADH, добавляли белок в весовом соотношении 1:1,0 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,9. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 10°C, соотношении PS:PR:EDC 1:1,0:0,9.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 4 часа добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

Ссылка на Фигуру 16: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации (остановка реакции через 4 часа)

4) Очистка конъюгата ультрафильтрацией: Гашенный конъюгат очищали диалфильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 мМ ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 мМ Трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

Ссылка на Фигуру 17: Хроматограмма, изображающая очищенный конъюгат

Таблица 67: Оценка очищенного конъюгата ADH OSP-DT			
Образец	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Соотношение (Ps/pr)
ADH OSP-DT конъюгат	0,019	0,230	0,08

Вывод: Конъюгация дериватизированного ADH PS *Paratyphi A* с использованием химии карбодиимида оказалась успешной при использовании концентрированного DT. Скорость реакции конъюгации увеличивалась при повышении температуры, но соотношение PS/Pr было низким в обоих экспериментах.

D3) Способ конъюгации полисахарида, полученного из штаммов *Salmonella* сероваров *S.typhimurium* и *S.enteritidis*, с белком-носителем, выбранным из столбнячного анатоксина (TT), дифтерийного анатоксина (DT) или CRM197.

1) Конъюгация полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с белком-носителем дифтерийного анатоксина (DT), CRM197 и столбнячного анатоксина (TT) на основе химии цианилирования.

А) Дериватизация дифтерийного анатоксина (DT) (добавление линкера ADH) с использованием химии карбодиимида и конъюгация с концентрированным полисахаридом *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием химии цианилирования.

В) Дериватизация CRM197 (добавление линкера ADH) с использованием химии карбодиимида и конъюгация с концентрированным полисахаридом *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием химии цианилирования.

С) Дериватизация столбнячного анатоксина (TT) (добавление линкера ADH) с использованием химии карбодиимида и конъюгация с концентрированным полисахаридом *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием химии цианилирования.

Д) Химия цианилирования (CPPT) на основе конъюгации OSP *Paratyphi* с белком-носителем дифтерийного анатоксина (DT), CRM197 и столбнячного анатоксина (TT) без дериватизации полисахарида или белка-носителя.

Процедура следующая:

А) Получение конъюгатов полисахаридов *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием в качестве белка-носителя дифтерийного анатоксина (DT).

1) Дериватизация белка:

Дифтерийный анатоксин с высоким содержанием мономеров (DT) концентрировали до 10-20 мг/мл на мембране 10 кДа и анализировали на содержание белка.

К концентрированному DT добавляли свежеприготовленный 1М буфер MES и дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH: 5,8) в весовом соотношении 1:10 и EDAC (1-этил-3- (3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH: 5,8) в весовом соотношении 1:1. Реакцию продолжали при pH 5,8 в течение примерно 1 часа, а затем реакцию смесь подвергали диафильтрации с помощью TFF на мембране 10 кДа в 50 мМ боратном буфере pH 9,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание белка и степень дериватизации.

2) Конъюгация полисахарида (PS) *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и DT, дериватизированного ADH:

Были проведены два эксперимента по изменению соотношения тетрафторбората 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP)

Эксперимент №:1 - Полисахариды *S.typhimurium* и *S.enteritidis* концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-15 мг/мл.

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,3. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

3) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Колонку XK16/70 готовили с использованием смолы ГФХ (Tyosearl HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объема колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Эксперимент №: 2 -

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,1. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 PS:PR:CPIP как 1:0,8:1,1.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Готовили колонку XK16/70 с использованием смолы ГФХ (Tюрегал HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% объема колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Вывод: Конъюгация полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием DT, дериватизированного ADH, оказалась успешной, и соотношение PS/PR было признано удовлетворительным.

В. Получение конъюгатов полисахаридов *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием в качестве белка-носителя CRM197.

1) Дериватизация белка: Для дериватизации был взят перекрестно реагирующий мутант (CRM197), полученный из производственного отдела (SIPL).

К концентрированному CRM197 добавляли свежеприготовленный 1М буфер MES и дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH:6,5) в весовом соотношении 1:3,5 и EDAC (1-этил-3- (3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH: 6,5) в весовом соотношении 1:0,25. Добавляли 5% Tween 80. Конечный реакционный объем доводили с использованием 100 мМ буфера MES до достижения конечной концентрации 3-4 мг/мл. Реакцию продолжали при pH 6,5 в течение примерно 3 часов, а затем реакционную смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF на мембране 10 кДа в 50 мМ боратном буфере и 0,005% Tween 80 pH 9,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание белка и степень дериватизации.

2) Конъюгация полисахарида (PS) *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и CRM197, дериватизированного ADH:

PS, полученный из DSP, концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-15 мг/мл.

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,3.

Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:1 PS:PR:CPIP как 1:1:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

3) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Готовили колонку ХК16/70 с использованием смолы ГФХ (Туорегал HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% объема колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl при скорости 30 см/час, конъюгат загружали в колонку и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Конечные объединенные фракции фильтровали и отправляли на анализ.

Вывод: Конъюгация PS *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием CRM197, дериватизированного ADH, оказалась успешной, и соотношение PS/PR было признано удовлетворительным.

С) Получение конъюгатов *S. paratyphi* с использованием в качестве белка-носителя столбнячного анатоксина:

1) Дериватизация белка: Высокомономерный столбнячный анатоксин (ТТ), полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 15-20 мг/мл на мембране 30 кДа и анализировали на содержание белка. Добавляли концентрированный свежеприготовленный 1М буфер MES и дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH:6,0) в весовом соотношении 1:10 и EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES, pH:6,0) в весовом соотношении 1:1. Реакцию продолжали при pH 6,0 в течение примерно 1 часа, а затем реакционную смесь подвергали диафильтрации при помощи TFF на мембране 30 кДа в 10 мМ фосфатном буфере с pH 7,2 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание белка и степень дериватизации.

2) Конъюгация полисахарида (PS) *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и ТТ, дериватизированного ADH:

OSP, полученный из DSP Team, концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-13 мг/мл.

Были проведены два эксперимента по изменению соотношения тетрафторбората 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP)

Эксперимент №:1

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) добавляли к полисахариду в весовом соотношении 1:1,25. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 PS:PR:CPIP 1:0,8:1,25.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

3) Очистка конъюгата ультрафильтрацией: Гашенный конъюгат очищали диафильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 мМ ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 мМ трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

Эксперимент №: 2

К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении 1:1,3. Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли белок весовом соотношении 1:0,9 PS:PR:CPIP 1:0,9:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 3-4 часа добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе.

3) Очистка конъюгата ультрафильтрацией: Гашенный конъюгат очищали диафильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 мМ ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 мМ трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

Вывод: конъюгация полисахарида (PS) *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с использованием ТТ, дериватизированного АДН, была признана успешной, применялись два различных типа стратегии диафильтрации, и оба процесса давали удовлетворительное соотношение PS/Pr.

2) Конъюгация полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* с белком-носителем дифтерийный анатоксин (DT), CRM197 и столбнячный анатоксин (TT) на основе химии карбодиимида

А) Дериватизация концентрированного полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* (добавление линкера АДН) с использованием химии цианилирования и конъюгация со столбнячным анатоксином (TT) с использованием химии карбодиимида.

В) Дериватизация концентрированного полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* (добавление линкера АДН) с использованием химии цианилирования и конъюгация с дифтерийным анатоксином (DT) с использованием химии карбодиимида.

С) Дериватизация концентрированного полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* (добавление линкера АДН) с использованием химии цианилирования и конъюгация с CRM197 с использованием химии карбодиимида.

Д) Основанная на химии карбодиимида (EDAC) конъюгация OSP *Paratyphi* с белком-носителем дифтерийный анатоксин (DT), CRM197 и столбнячный анатоксин (TT) без дериватизации полисахарида или белка-носителя.

Процедура следующая:

1) Дериватизация полисахарида (PS): Полученный полисахарид *S.typhimurium* и *S.enteritidis* концентрировали на мембране 10 кДа до достижения концентрации 10-13 мг/мл. К концентрированному PS добавляли 0,9% NaCl и к полисахариду добавляли свежеприготовленный раствор CPIP (114 мг/мл в ацетонитриле) в весовом соотношении от 1:0,5 до 1:2 (1:0,7). Немедленно доводили pH до 9,5 с помощью 2,5 М NaOH и выдерживали до 3 мин. Затем добавляли дигидразид адипиновой кислоты (ADH) (75-100 мг/мл растворенный в 0,5М натрий-бикарбонатном буфере pH:8,0) в весовом соотношении 1:10 PS:ADH:CPIP от 1:2:0,7 до 1:10:0,7. реакцию продолжали при pH 9,5 в течение примерно 2 часов, гасили добавлением 2М глицина в количестве в 10 раз большим количества PS по массе, а затем реакцию смесь подвергали диафильтрации с помощью TFF на мембране 10 кДа в 100 мМ буфере MES pH 6,0 для удаления остатков и непрореагировавших компонентов. Конечный образец анализировали на содержание полисахарида.

2) Получение белка:

2А) Получение белка: Высокомономерный столбнячный анатоксин (TT), полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 10-15 мг/мл на мембране 30 кДа и анализировали на содержание белка.

2В) Получение белка: Высокомономерный дифтерийный анатоксин (DT), полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 10-20 мг/мл на мембране 10 кДа и анализировали на содержание белка.

2С) Получение белка: Высокомономерный CRM197, полученный из производственного отдела (SIPL), концентрировали до 10-20 мг/мл на мембране 10 кДа и анализировали на содержание белка.

3) Конъюгация

3А) Конъюгация дериватизированного ADH полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и концентрированного TT:

К PS, дериватизированному ADH, добавляли белок в весовом соотношении 1:0,9 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,86. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 6°C, соотношении PS:PR:EDC 1:0,9:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 23 часа добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

3В) Конъюгация дериватизированного ADH полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и концентрированного DT: Проверку конверсии Rg для DT проводили в тех же условиях, что и для конъюгата TT.

К PS, дериватизированному ADH, добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл

растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,86. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 6°C, соотношении PS:PR:EDC 1:0,8:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 20 часов добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

3С) Конъюгация дериватизированного АДН полисахарида *S.typhimurium* и *S.enteritidis* и концентрированного CRM197: Проверку конверсии Рг для CRM197 проводили в тех же условиях, что и для конъюгата ТТ и DT.

К PS, дериватизированному АДН, добавляли белок в весовом соотношении 1:0,8 и свежеприготовленный EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (30-40 мг/мл растворенный в 100 мМ буфере MES) в весовом соотношении 1:0,86. Реакцию продолжали при pH 6,0, температуре 6°C, соотношении PS:PR:EDC 1:0,8:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ и SB-805 HQ использовали последовательно с ФСБ в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин для мониторинга конверсии белка. Реакцию гасили через 20 часов добавлением 100 мМ фосфатного буфера, содержащего ЭДТА.

4) Очистка конъюгата

4А) Очистка конъюгата ультрафильтрацией: Гашенный конъюгат очищали диафильтрацией при помощи TFF через мембрану 300 кДа в 10 мМ ФСБ, pH 7,2, а затем в 10 мМ трис-буфере, pH 7,2. Конечный концентрированный образец отправляли на анализ.

4В) Очистка конъюгата с помощью ГФХ: Готовили колонку ХК16/70 с использованием смолы ГФХ (Tюpergel HW65F) с высотой слоя 40 см. Колонку набивали при скорости потока 100 см/ч, давали отстояться и пропускали 1М раствор NaCl в количестве 1% от объема колонки для оценки целостности набитой колонки. Колонку уравнивали, используя 0,9% NaCl со скоростью 30 см/час, конъюгат загружали в колонку и фракции собирали с интервалом в 1 минуту. Фракции 2-12 объединяли в соответствии с профилем ВЭЖХ. Конечные объединенные фракции отфильтровывали и отправляли на анализ.

Вывод: С использованием химии обратной конъюгации (активация PS) конъюгация дериватизированного АДН полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и концентрированных ТТ, DT и CRM197 была признана успешной при повышении температуры от 6 до 10°C. Скорость реакции конъюгации повышена; соотношение PS/Рг было очень низким во всех реакциях.

Конъюгация дериватизированного АДН полисахарида *S. typhimurium* и *S. enteritidis* и концентрированных ТТ, DT и CRM197 с использованием химии карбодиимида оказалась успешной. Скорость реакции конъюгации увеличивалась при повышении температуры, но соотношение PS/Рг было низким в обоих экспериментах.

Пример 4: Иммуногенные композиции

Таблица 68А: Моновалентные иммуногенные композиции, содержащие конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i>		
№ п.п.	Компоненты рецептуры	Иммуногенная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]
1	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с TT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
2	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с DT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
3	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с CRM197;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
4	Конъюгированный антиген OSP <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>paratyphi A</i> с TT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
5	Конъюгированный антиген OSP <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>paratyphi A</i> с DT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
6	Конъюгированный антиген OSP <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>paratyphi A</i> с CRM197;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
7	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с TT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
8	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с DT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
9	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с CRM197;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
10	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с TT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
11	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с DT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
12	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с CRM197;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)

Однодозовая композиция не содержит консерванта 2-феноксиэтанол.

Многодозовая композиция может дополнительно содержать 2-феноксиэтанол – 5 мг (1 – 10 мг).

Таблица 68В: Двухвалентные иммуногенные композиции

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Иммуногенная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]					
		1	2	3	4	5	6
1	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)			
2	Конъюгированный антиген OSP <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>paratyphi A</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)			25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	
3	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197		25 мкг (1,25 – 50 мкг)		25 мкг (1,25 – 50 мкг)		25 мкг (1,25 – 50 мкг)
4	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197			25 мкг (1,25 – 50 мкг)		25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)

Таблица 68С: Трехвалентные иммуногенные композиции

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Иммуногенная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]			
		1	2	3	4
1	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)		25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
2	Конъюгированный антиген OSP <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>paratyphi A</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	
3	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)		25 мкг (1,25 – 50 мкг)
4	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с CP; где CP представляют собой или TT или DT или CRM197		25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)

Таблица 68D: Четырехвалентные иммуногенные композиции		
№ п.п.	Компоненты рецептуры	Иммуногенная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]
1	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с СР; где СР представляют собой или ТТ или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
2	Конъюгированный антиген OSP <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>paratyphi A</i> с СР; где СР представляют собой или ТТ или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
3	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с СР; где СР представляют собой или ТТ или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
4	Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с СР; где СР представляют собой или ТТ или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)

Таблица 68Е: Комбинация вспомогательных веществ, испытанная в соответствии с антигенным компонентом, описанным выше

№ п.п.	Вспомогательное вещество	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2	Хлорид натрия (140-160 мМ)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)
3	Трис-буфер (от 10 мМ до 25 мМ)	-	0,61 to 1,52 мг	0,61 to 1,52 мг	0,61 to 1,52 мг									
4	Цитратный буфер (от 10 до 25 мМ), полученный путем растворения моногидрата лимонной кислоты (САМ) и дегидрата тринатрийцитрата (ТCD).	-	-	-		САМ-от 1,05 до 2,63 мг ТCD-1,47-3,68 мг	САМ-от 1,05 до 2,63 мг ТCD-1,47-3,68 мг	САМ-от 1,05 до 2,63 мг ТCD-1,47-3,68 мг						
5	Гистидиновый буфер (от 10 до 25 мМ)	-	-	-					от 0,78 до 1,94 мг	от 0,78 до 1,94 мг	от 0,78 до 1,94 мг			
6	Сукцинатный буфер (от 10 мМ до 25 мМ)	-	-	-								от 0,59 до 1,48 мг	от 0,59 до 1,48 мг	от 0,59 до 1,48 мг
7	Полисорбат-20 (от 0,005 до 0,1% мас./об.)	-	-	25-500 мкг	25-500 мкг		25-500 мкг	25-500 мкг		25-500 мкг	25-500 мкг		25-500 мкг	25-500 мкг
8	Сахароза (от 0,5% до 5,0% масс./об.)				от 2,5 до 25 мг			от 2,5 до 25 мг			от 2,5 до 25 мг			от 2,5 до 25 мг
9	Вода для инъекций (WFI)	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.	по необ.

√ = входит в состав

[illegible]

Таблица 70: Комбинации вакцинных композиций, содержащие стандартную дозу и уменьшенную дозу ИПВ (штамм Salk типа 1 (Mahoney) или типа 2 (MEF) или типа 3 (Saukett)), D, T, HepB, wP, ViPs-TT, конъюгат OSP и антиген Hib ИПВ

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Комбинированная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
1	Дифтерийный анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)	15 ME	15 ME	15 ME	15 ME	15 ME	15 ME	15 ME	15 ME	15 ME
4	антиген HBs	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Конъюгированный антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Инактивированный полиовирус (ИПВ)									
	Тип 1 (D-антигенных единиц)	7,5	8	5	10	10	10	10	4	40
	Тип 2 (D-антигенных единиц)	16	2	2	2	2	2	2	0,5	8
	Тип 3 (D-антигенных единиц)	10	5	5	10	5	12	16	3,2	32
7	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с TT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
8	Конъюгат OSP-CP; CP - или TT или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
9	Общее содержание алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг	Не более 0,5 мг

Дополнительно значение pH композиции регулируют, как описано выше, примерно до 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и доводят объем добавлением физиологического раствора (0,9%).

Может дополнительно содержать одну из комбинаций консервантов

i. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)

ii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (об./об.); или

iii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (об./об.); или

iv. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

Комбинации вакцинных композиций, содержащие уменьшенную дозу ИПВ, D, T, НерВ, ViPs-ТТ, конъюгат OSP, бесклеточный коклюшный антиген и Нib-антиген, могут содержать бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из токсина *Bordetella*, в детоксицированной форме (в частности, генетически или химически детоксицированной), в частности коклюшный анатоксин; филаментный гемагглютинин; пертактин; или фимбриальные белки. В частности, коклюшный анатоксин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - филаментный гемагглютинин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - пертактин: от 1 до 20 мкг (в частности, 2,5 мкг); - необязательно фимбриальные белки: от 2 до 25 мкг; на 0,5 мл.

Таблица 71: Комбинации вакцинных композиций, содержащие стандартную дозу и уменьшенную дозу ИПВ (штамм Sabin типа 1 или типа 2 или типа 3), D, Т, НерВ, wP, ViPs-ТТ и антиген Hib ИПВ

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Комбинированная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Дифтерийный анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Столбнячный анатоксин (Т)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)	15 ME	15 ME	15 ME
4	антиген HBs	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Конъюгированный антиген Hib PRP-ТТ	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Инактивированный полиовирус (ИПВ)			
	Тип 1 (D-антигенных единиц)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (D-антигенных единиц)	16	8	16
	Тип 3 (D-антигенных единиц)	10	5	10
7	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с ТТ;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
8	Общее содержание алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг

Таблица 72: Комбинации вакцинных композиций, содержащие стандартную дозу и уменьшенную дозу ИПВ (штамм Sabin типа 1 или типа 2 или типа 3), D, Т, НерВ, wP, ViPs-ТТ, конъюгат OSP и антиген Hib ИПВ

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Комбинированная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Дифтерийный анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Столбнячный анатоксин (Т)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)	15 ME	15 ME	15 ME
4	антиген HBs	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Конъюгированный антиген Hib PRP-ТТ	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Инактивированный полиовирус (ИПВ)			
	Тип 1 (D-антигенных единиц)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (D-антигенных единиц)	16	8	16
	Тип 3 (D-антигенных единиц)	10	5	10
7	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с ТТ;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
8	Конъюгат OSP-CP; CP - или ТТ или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
9	Общее содержание алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг

Дополнительно значение pH композиции регулируют, как описано выше, примерно до 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и доводят объём добавлением физиологического раствора (0,9%).

Может дополнительно содержать одну из комбинаций консервантов

- i. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)
- ii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (об./об.); или
- iii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (об./об.); или
- iv. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

Комбинации вакцинных композиций, содержащие уменьшенную дозу ИПВ, D, T, HerB, ViPs-TT, конъюгат OSP, бесклеточный коклюшный антиген и Hib-антиген, могут содержать бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из токсина *Bordetella*, в детоксицированной форме (в частности, генетически или химически детоксицированной), в частности коклюшный анатоксин; филаментный гемагглютинин; пертактин; или фимбриальные белки. В частности, коклюшный анатоксин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - филаментный гемагглютинин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - пертактин: от 1 до 20 мкг (в частности, 2,5 мкг); - необязательно фимбриальные белки: от 2 до 25 мкг; на 0,5 мл.

[illegible]

Дополнительно значение pH композиции регулируют, как описано выше, примерНо до 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и доводят объём добавлением физиологического раствора (0,9%).

Может дополнительно содержать одну из комбинаций консервантов

- i. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)
- ii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (об./об.); или
- iii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (об./об.); или
- iv. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

Комбинации вакцинных композиций, содержащие уменьшенную дозу ИПВ, ИРВ, D, Т, НерВ, ViPs-ТТ, бесклеточный коклюшный антиген и антиген Hib, могут содержать бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из токсина *Bordetella*, в детоксицированной форме (в частности, генетически или химически детоксицированной), в частности коклюшный анатоксин; филаментный гемагглютинин; пертактин; или фимбриальные белки. В частности, коклюшный анатоксин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - филаментный гемагглютинин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - пертактин: от 1 до 20 мкг (в частности, 2,5 мкг); - необязательно фимбриальные белки: от 2 до 25 мкг; на 0,5 мл.

Таблица 75: Комбинации вакцинных композиций, содержащие стандартную дозу и уменьшенную дозу ИПВ (штамм Sabin типа 1 или типа 2 или типа 3), D, T, HepB, wP, ViPs-TT и антиген Hib ИПВ

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Комбинированная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Дифтерийный анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Столбнячный анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)	15 ME	15 ME	15 ME
4	антиген HBs	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Конъюгированный антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Инактивированный полиовирус (ИПВ)			
	Тип 1 (D-антигенных единиц)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (D-антигенных единиц)	16	8	16
	Тип 3 (D-антигенных единиц)	10	5	10
7	ИРВ	10 мкг от 1 до 50 мкг	10 мкг от 1 до 50 мкг	10 мкг от 1 до 50 мкг
8	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с TT;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
9	Общее содержание алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг

Таблица 76: Комбинации вакцинных композиций, содержащие стандартную дозу и уменьшенную дозу ИПВ (штамм Sabin типа 1 или типа 2 или типа 3), D, Т, НерВ, wP, ViPs-ТТ и антиген Hib ИПВ

№ п.п.	Компоненты рецептуры	Комбинированная композиция настоящего изобретения [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Дифтерийный анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Столбнячный анатоксин (Т)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Инактивированный антиген <i>B. pertussis</i> (wP)	15 ME	15 ME	15 ME
4	антиген HBs	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Конъюгированный антиген Hib PRP-ТТ	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Инактивированный полиовирус (ИПВ)			
	Тип 1 (D-антигенных единиц)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (D-антигенных единиц)	16	8	16
	Тип 3 (D-антигенных единиц)	10	5	10
7	ИРВ	10 мкг от 1 до 50 мкг	10 мкг от 1 до 50 мкг	10 мкг от 1 до 50 мкг
8	Конъюгированный антиген ViPs <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhi</i> с ТТ;	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
9	Конъюгат OSP-CP; CP - или ТТ или DT или CRM197	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)	25 мкг (1,25 – 50 мкг)
10	Общее содержание алюминия (Al ³⁺)	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг	Не более 0,9 мг

Дополнительно значение pH композиции регулируют, как описано выше, примерНо до 6,0-7,0 с помощью гидроксида натрия/карбоната натрия и доводят объём добавлением физиологического раствора (0,9%).

Может дополнительно содержать одну из комбинаций консервантов

- i. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)
- ii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (об./об.); или
- iii. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (об./об.); или
- iv. 2-феноксиэтанол в количестве от 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен в количестве 0,1 – 1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) и пропилпарабен в количестве 0,05 – 0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

Комбинации вакцинных композиций, содержащие уменьшенную дозу ИПВ, ИРВ, D, Т, НерВ, ViPs-ТТ, бесклеточный коклюшный антиген и антиген Hib, могут содержать бесклеточный коклюшный антиген, выбранный из токсина *Bordetella*, в детоксицированной форме (в частности, генетически или химически детоксицированной), в частности коклюшный анатоксин; филаментный гемагглютинин; пертактин; или фимбриальные белки. В частности, коклюшный анатоксин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - филаментный гемагглютинин: от 1 до 50 мкг (в частности, 8 мкг); - пертактин: от 1 до 20 мкг (в частности, 2,5 мкг); - необязательно фимбриальные белки: от 2 до 25 мкг; на 0,5 мл.

Таблица 77: Полностью жидкая иммуногенная композиция

	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)
Men A-TT конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men C-CRM197 конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men Y-CRM197 конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men W-CRM197 конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men X-TT конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Vi-TT конъюгат	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)	-
OSP-CP конъюгат; где CP - или TT или DT или CRM197	-	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)
Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с CP; где CP - или TT или DT или CRM197	-	-	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)
Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с CP; где CP - или TT или DT или CRM197	-	-	-	25 мкг (1,25 – 50 µg)	25 мкг (1,25 – 50 µg)
Хлорид натрия	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)	4,5 мг (1 – 10 мг)
2-феноксиэтанол	5,0 мг (1 – 10 мг)	5,0 мг (1 – 10 мг)	5,0 мг (1 – 10 мг)	5,0 мг (1 – 10 мг)	5,0 мг (1 – 10 мг)
Вода для инъекций	до 0,5 мл	до 0,5 мл	до 0,5 мл	до 0,5 мл	до 0,5 мл

Таблица 78: Лиофилизированная (сублимированная) иммуногенная композиция					
	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)	Одна доза (0,5 мл)
Men A-TT конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men C-CRM197 конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men Y-CRM197 конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men W-CRM197 конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Men X-TT конъюгат	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)	5 мкг (1 – 30 мкг)
Vi-TT конъюгат	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	-
OSP-CP конъюгат; где CP - или TT или DT или CRM197	-	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)
Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>typhimurium</i> с CP; где CP - или TT или DT или CRM197	-	-	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)
Конъюгированный антиген сахарид <i>Salmonella enterica</i> серовар <i>enteritidis</i> с CP; где CP - или TT или DT или CRM197	-	-	-	25 мкг (1.25 – 50 мкг)	25 мкг (1.25 – 50 мкг)
Сахароза	11.90 мг (1- 50мг)	11.90 мг (1- 50мг)	11.90 мг (1- 50мг)	11.90 мг (1- 50мг)	11.90 мг (1- 50мг)
Цитрат натрия (дигидрат)	1.98 мг (1- 50мг)	1.98 мг (1- 50мг)	1.98 мг (1- 50мг)	1.98 мг (1- 50мг)	1.98 мг (1- 50мг)
Трис-буфер	0.48 мг (0.1- 5 мг)	0.48 мг (0.1- 5 мг)	0.48 мг (0.1- 5 мг)	0.48 мг (0.1- 5 мг)	0.48 мг (0.1- 5 мг)

Пример 5: Данные о стабильности

Стабильность моновалентного конъюгата *Salmonella typhi* при 2-8 °С в течение начального (0), 3, 6 месяцев; при 25°С в течение начального (0), 1, 3 месяцев и при 40°С для начального (0), 14, 28 дней:

Таблица 79. Стабильность моновалентного конъюгата <i>Salmonella typhi</i> при 2-8°С в течение начального (0), 3, 6 месяцев																
Температура хранения (по Цельсию): 2-8 градусов С					0 месяцев				3 месяца				6 месяцев			
№ п.п.	Образец	Размер целевого PS (кДа)	Размер SIPL PS (кДа)	№ Партии	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (кДа)	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (кДа)	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (кДа)
1)	SIPL Конъюг ат (основн ой)	180-220	214 (Shoedex)	G7 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 2 B#10	6,9	прозрачна я желтовата я жидкость	4,4	1389	6,8	прозрачна я желтовата я жидкость	6,6	1398	7,2	прозрач ная желтова тая жидкост ь	5,8	1380
2)	SIPL Конъюг ат	300	388 (Shoedex)	G6 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 1 B#9	7,3	прозрачна я желтовата я жидкость	7,5	1359	6,9	прозрачна я желтовата я жидкость	9,7	1350	7,3	прозрач ная желтова тая жидкост ь	8,8	1345
3)	SIPL Конъюг ат	120	80 (Shoedex)	G9 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 4 B#12	6,9	прозрачна я желтовата я жидкость	8,0	1352	7,2	прозрачна я желтовата я жидкость	8,5	1300	6,9	прозрач ная желтова тая жидкост ь	6,7	1310
4)	SIPL Конъюг ат	45	42 (TSK 3000 PWXL)	68 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 3 B#12	6,8	прозрачна я желтовата я жидкость	5,4	1293	7,1	прозрачна я желтовата я жидкость	6,5	1200	6,6	прозрач ная желтова тая жидкост ь	7,7	1187

Таблица 80. Стабильность моновалентного конъюгата *Salmonella typhi* при 25°C в течение начального (0), 1, 3 месяцев

Температура хранения (по Цельсию): 25 градусов С					0 месяцев				1 месяц				3 месяца			
№ п.п.	Образец	Размер целевого PS (кДа)	Размер SIPL PS (кДа)	№ Партии	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (кДа)	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (кДа)	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (кДа)
1)	SIPL Конъю гат (основ ной)	180- 220	214 (Shoedex)	G7 SIPL Vi PS-TT (конъюги рованный) 2 B#10	6,9	прозрач ная желтова тая жидкост ь	4,4	1392	6,8	прозрач ная желтова тая жидкост ь	5,4	1380	6,7	прозрач ная желтов атая жидкос ть	6,1	1387
2)	SIPL Конъю гат	300	388 (Shoedex)	G6 SIPL Vi PS-TT (конъюги рованный) 1 B#9	7,3	прозрач ная желтова тая жидкост ь	7,5	1360	7,2	прозрач ная желтова тая жидкост ь	8,2	1370	7,1	прозрач ная желтов атая жидкос ть	7,3	1350
3)	SIPL Конъю гат	120	80 (Shoedex)	G9 SIPL Vi PS-TT (конъюги рованный) 4 B#12	6,9	прозрач ная желтова тая жидкост ь	8,0	1350	7,1	прозрач ная желтова тая жидкост ь	8,1	1280	7,2	прозрач ная желтов атая жидкос ть	8,5	1268
4)	SIPL Конъю гат	45	42 (TSK 3000 PWWL)	68 SIPL Vi PS-TT (конъюги рованный) 3 B#12	6,8	прозрач ная желтова тая жидкост ь	5,4	1285	6,9	прозрач ная желтова тая жидкост ь	5,9	1180	6,6	прозрач ная желтов атая жидкос ть	5,2	1162

Таблица 81: Стабильность моновалентного конъюгата *Salmonella typhi* при 40°C в течение начального (0), 14, 28 дней

Температура хранения (по Цельсию): 40°C					0 месяцев				14 дней (2 недели)				28 дней (4 недели)			
№ п.п.	Образец	Размер целового PS (κDa)	Размер SIPL PS (κDa)	№ Партии	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (κDa)	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (κDa)	pH	Вид	Свободный PS (%)	Размер конъюгата SIPL PS (κDa)
1)	SIPL Конъюга т (основно й)	180- 220	214 (Shoedex)	G7 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 2 B#10	6,9	прозрачная желтоватая жидкость	4,4	1388	6,7	прозрачная желтоватая жидкость	5,8	1348	6,4	прозрачная желтоватая жидкость	7,5	1355
2)	SIPL Конъюга т	300	388 (Shoedex)	G6 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 1 B#9	7,3	прозрачная желтоватая жидкость	7,5	1356	7,1	прозрачная желтоватая жидкость	9,7	1310	6,8	прозрачная желтоватая жидкость	10,5	1320
3)	SIPL Конъюга т	120	80 (Shoedex)	G9 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 4 B#12	6,9	прозрачная желтоватая жидкость	8,0	1355	6,8	прозрачная желтоватая жидкость	12,3	1266	6,6	прозрачная желтоватая жидкость	14,7	1270
4)	SIPL Конъюга т	45	42 (TSK 3000 PWXL)	68 SIPL Vi PS-TT (конъюгиро ванный) 3 B#12	6,8	прозрачная желтоватая жидкость	5,4	1290	6,7	прозрачная желтоватая жидкость	8,8	1150	6,5	прозрачная желтоватая жидкость	11,5	1168

Результаты:

Свободный Ps («начальный < 4,5%, через 6 месяцев не более 7,5%» для 180–220 кДа по сравнению с Ps «начальный 5,4%, через 6 месяцев не более 10,5% для 388/80/45 кДа» при 40°C/2–8°C/25°C).

Для полисахарида 180-220 кДа наблюдалось низкое начальное содержания свободного Ps, размер конъюгата также сохранялся в течение исследования стабильности, через 6 месяцев наблюдалось меньшее количество свободного Ps по сравнению с другими размерами.

Данные о стабильности по результатам эксклюзионной ВЭЖХ

(конъюгат VI-ТТ в трис, трис-NaCl и 0,17 М NaCl)

Таблица 82: Данные о стабильности по результатам эксклюзионной ВЭЖХ конъюгата Vi-ТТ в трис, трис-NaCl и 0,17 М NaCl			
№ п.п.	Название образца	Размер в эксклюзионной ВЭЖХ (в кДа)	
		0 дней	Неделя 2
1	В#9 Vi-ТТ CJ (в 10мМ Трис) 1:1 разбав. в 1X ФСБ -20°C	1049	1099
2	В#9 Vi-ТТ CJ (в 10мМ Трис + 0,17 М NaCl) 1:1 разбав. в 1X ФСБ -20°C	1108	1035
3	В#13 Vi-ТТ CJ (в 0,17 М NaCl) 1:1 разбав. в 1X ФСБ -20°C	996	1009
4	В#13 Vi-ТТ CJ (0,17 М NaCl + 10мМ Трис) 1:1 разбав. в 1X ФСБ -20°C	1004	1006
5	В#9 Vi-ТТ CJ (в 10мМ Трис) Нативный 2-8°C 1:1 разбав. в 1X ФСБ	1049	996
6	В#13 Vi-ТТ CJ (в 0,17 М NaCl) Нативный 2-8°C 1:1 разбав. в 1X ФСБ	996	965

Вывод:

Конъюгат Vi-TT оказался стабильным в 10 мМ трис-буфере, 10 мМ трис-буфере, содержащем 0,17 М NaCl, и только в 0,17 М NaCl.

Данные для различных концентраций Трис (5 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 50 мМ), показывающие концентрацию 25 мМ Трис является лучшей.

- Концентрация Vi-TT CJ поддерживалась при трех различных концентрациях Трис, pH 7,2, таких как 5 мМ, 10 мМ и 20 мМ. Его хранили в различных температурных условиях, таких как -20°C, 2-8°C, комнатная температура и 37°C.
- Исследование проводилось в течение 2 недель и ежедневно контролировалось значение pH.
- Образцы были проверены на размер частиц и дзета-потенциал.

Результаты измерения pH

Таблица 83: pH конъюгата Vi-TT в 5 мМ, 10 мМ, 20 мМ Трис при -20°C, 2-8°C, комнатной температуре (КТ) и 37°C												
День	Vi TT CJ в 5 мМ Трис pH 7,0				Vi TT CJ в 10мМ Трис pH 7,14				Vi TT CJ в 20мМ Трис pH 7,21			
	-20°C	2-8°C	КТ	37°C	-20°C	2-8°C	КТ	37°C	-20°C	2-8°C	КТ	37°C
0 День	7,0	7,0	7,0	7,0	7,14	7,14	7,14	7,14	7,21	7,21	7,21	7,21
Через 2 недели	6,58	6,95	6,76	6,94	6,56	7,08	6,98	7,06	7,06	7,10	7,19	7,00

Вывод:

- В исследовании Vi-TT CJ конъюгат поддерживали в 5, 10 и 20 мМ Трис, pH 7,2, Значение pH было в диапазоне при температуре 2-8°C и концентрациях 5, 10 и 20 мМ.

Измерение вязкости и осмоляльности конъюгата Vi-TT

Часть А: Результаты измерения вязкости и осмоляльности трис-буфера и хлорида натрия без конъюгата

Таблица 84: Часть А: Вязкость и осмоляльность трис-буфера и хлорида натрия без конъюгата				
Буферная сила (в мМ)	Осмоляльность (мОсм/кг)	Плотность (г/см ³)	Вязкость	
			Кинематическая (мм ² /с)	Динамическая (мПа.с)
1) Трис-буфер рН 7,2				
5	13	0,9986	1,030	1,028
30	61	0,9999	1,020	1,020
50	81	1,0005	1,031	1,031
75	113	1,0014	1,028	1,030
2) Хлорид натрия				
150	270	1,0043	1,013	1,017
308	562	1,0117	1,020	1,031
350	607	1,0110	1,023	1,035

Часть В: Результаты измерения вязкости и осмоляльности трис-буфера и хлорида натрия с конъюгатом

Таблица 85: Часть В: Вязкость и осмоляльность трис-буфера и хлорида натрия с конъюгатом				
Буферная сила (в мМ)	Осмоляльность (мОсм/кг)	Плотность (г/см ³)	Вязкость	
			Кинематическая (мм ² /с)	Динамическая (мПа.с)
I) Трис-буфер + конъюгат				
5	18	0,9985	1,058	1,057
30	53	0,9997	1,061	1,061
50	84	1,0005	1,066	1,067
75	124	1,0017	1,079	1,081
II) Хлорид натрия + конъюгат				
150	281	1,0046	1,048	1,052
308	550	1,0107	1,053	1,064
350	1253	1,0122	1,053	1,066

Вывод:

Конъюгат с различными концентрациями триса оказался изотоническим, и конъюгат с 150 мМ NaCl оказался изотоническим.

Вязкость конъюгата с различными концентрациями трис-буфера и NaCl одинакова, и такая вязкость пригодна для применения в качестве парентеральных композиций.

Пример 6: Данные об иммуногенности**А. Исследование иммуногенности моновалентной конъюгированной вакцины:**

Иммуногенный потенциал вакцины SIIP Vi TT оценивали на мышинной модели.

Исследование иммуногенности на мышах № 1:

Исследование иммуногенности проводили на мышах, которым внутримышечно вводили неконъюгированную и TT-конъюгированную вакцину SIIP (Vi TT) (по 8 животных в группе). Животных инокулировали на 1-й и 14-й день, а образцы сыворотки собирали на 14-й день (данные не показаны) и на 21-й день. Подробности см. в Таблице 86. Парные образцы сывороток были доступны от всех животных каждой группы. Образец сыворотки использовали для определения антител против введенного полисахарида с использованием подходящего серологического иммунохимического метода, такого как метод ИФА IgG собственной разработки. Сыворотку мышей, получавших неконъюгированный полисахарид SIIP (Vi-PS), использовали в качестве сравнительного контроля индукции ответа IgG в сыворотке мышей, получавших конъюгированный вариант Vi-PS (PS различного размера).

Исследование иммуногенности на мышах № 2:

Другое подобное исследование было проведено на мышах. В обоих исследованиях использовался аналогичный протокол лечения животных. Протокол лечения животных кратко описан ниже. Сыворотки из обоих исследований были протестированы с помощью идентичного иммунологического/серологического аналитического метода анализа, т.е. ИФА IgG. В исследовании использовали самок мышей в возрасте 5-6 недель (линия Balb C; выведены собственными силами) в соответствии с утвержденным IAEC протоколом исследования на животных. Все животные были беспатогенными и содержались в асептических условиях в боксе биологической безопасности во время инокуляции и сбора образцов крови. Мыши весили ~18-20 г. в начале исследования. Каждая мышь получала 2,5 мкг конъюгированной вакцины Vi TT внутримышечно. Вакцину SIIP Vi TT разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в качестве носителя. Адъювант не использовался в исследовании ни для одной из групп лечения.

Схема лечения: В следующей таблице представлен общий план лечения для исследования.

Таблица 86: План лечения мышей							
№ п.п.	Идентификатор	Группы лечения (фактический план)	Животных на группу	Доза Vi PS на	Объем инъекции	День инъекции (ВМ)	День забора крови

	группы		Balb/C (самки) мышь	животное			(сыворотки)
1	G1	Только носитель (ФСБ)	8	ФСБ	100 мкл	1, 14	21
2	G2	Typhar (Неконъюгированная)	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
3	G3	Typhar TCV(Конъюгированная)	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
4	G4	NIBSC Vi PS Стандартная	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
5	G5	SIPL Vi PS (Неконъюгированная)	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
6	G6	G6 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
7	G7	G7 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
8	G8	G8 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
9	G9	G9 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21

Методология и способы, используемые для серологического анализа:

Образец крови отбирали у экспериментальных животных из ретроорбитальной вены с помощью стерильных стеклянных капиллярных пробирок. Изофлуран использовался как безопасный анестетик во время процедуры отбора крови. Сыворотку подвергали анализу на антитела IgG, вырабатываемые в ответ на инъекцию неконъюгированной или конъюгированной вакцины Vi-TT, с использованием метода ИФА IgG собственной разработки. В ИФА использовали эталонный стандарт NIBSC Vi-PS (каталожный номер 16/126; первый международный стандарт для Vi-PS *S. Typhi*) в качестве покрывающего антигена. Уровни IgG оценивали путем анализа оптической плотности (ОП), наблюдаемой в сыворотке мышей, получавших конъюгированный Vi-PS (Vi-TT с PS различного размера), по сравнению с ОП, наблюдаемой в образцах сыворотки мышей, получавших неконъюгированный полисахарид SIPL (Vi-PS).

В следующих таблицах приведены данные по индукции иммуногенности (на 21-й день) для различных Vi TT PS.

Таблицы 87, 88, 89 и 90: Результаты иммуногенности

Таблица 87: Результаты иммуногенности			Таблица 88: Результаты иммуногенности		
Исследование иммуногенности 1			Исследование иммуногенности 1		
G7 SIPL Vi PS-TT			G6 SIPL Vi PS-TT		
Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения	Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения
8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной	8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной
>4-кратное увеличение		63,2	>4-кратное увеличение		67,23
n/N %		100% (8 из 8)	n/N %		100% (8 из 8)
Среднее геометрическое		1,8	Среднее геометрическое		1,8
Минимум		1,45	Минимум		1,57
Максимум		1,95	Максимум		1,98

Таблица 89: Результаты иммуногенности			Таблица 90: Результаты иммуногенности		
Исследование иммуногенности 1			Исследование иммуногенности 1		
G9 SIPL Vi PS-TT			G8 SIPL Vi PS-TT		
Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения	Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения
8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной	8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной
>4-кратное увеличение		65,4	>4-кратное увеличение		62,5
n/N %		100% (8 из 8)	n/N %		100% (8 из 8)
Среднее геометрическое		1,7	Среднее геометрическое		1,7
Минимум		1,50	Минимум		1,05
Максимум		2,287	Максимум		1,95

Результаты:

Группы мышей с Vi TT продемонстрировали более чем в 4 раза более высокую индукцию IgG (по сравнению с мышами, которым вводили неконъюгированный Vi PS), что убедительно указывает на иммуногенный потенциал SIPL VI TT при всех размерах PS. Было проведено два отдельных исследования с Vi TT, и оба этих исследования показали аналогичный ответ на Vi TT по сравнению с Vi PS.

В различных группах сравнивались следующие параметры:

а. >4-кратное увеличение: среднее кратное увеличение было >60-кратным

б. Среднее геометрическое титра антител: все группы демонстрировали более высокое среднее геометрическое значение, чем то, которое наблюдалось в случае неконъюгированного PS ($>1,9$).

с. % мышей с положительным ответом: все мыши во всех группах Vi TT демонстрировали более высокий ответ антител (100% положительных результатов).

Выводы из анализа серологических данных:

Исследование иммуногенности на мышах проводили с 8 мышами (самками) в каждой группе. Индукцию антител оценивали во всех группах в ответ на инъецированный Vi TT (различный размер PS) по сравнению с неконъюгированным Vi PS. Все формы Vi TT PS убедительно свидетельствовали об индукции специфичных антител IgG к Vi TT (день 21; после первой бустерной иммунизации) по сравнению с группой, получавшей только Vi PS. Индукция IgG в сыворотке мышей является сильной детерминантой серологического ответа на Vi TT. Таким образом, моновалентный Vi TT способен индуцировать сильный иммуногенный ответ в мышинной модели и обеспечивает многообещающий потенциал для будущих исследований на высших животных.

Таблица 91. Сводная информация о потенциале иммуногенности моновалентной вакцины SIPL Vi TT на мышинной модели

№ п.п.	Образец	Целевой размер PS (кДа)	Размер PS SIPL (кДа)	Изменения конъюгата	№ Партии	Иммуногенность (Среднее геометрическое)	Кратность увеличения в Среднем геометрическом	% О-ацетилирования (по данным ЯМР)
1)	Конъюгат SIPL (основной)	180-220	214	Очистка: ГФХ	G7 SIPL Vi PS-TT	1,94	69	105%
2)	Конъюгат SIPL	300	388	Очистка: ГФХ	G6 SIPL Vi PS-TT	1,79	64	107%
3)	Конъюгат SIPL	120	80	Очистка: ГФХ	G9 SIPL Vi PS-TT	1,79	64	102%
4)	Конъюгат SIPL	45	42	Очистка: Диафильтрация	G8 SIPL Vi PS-TT	1,75	63	102%
5)	Typbar TCV	250-300	н.д.	н.д.	н.д.	1,69	60	-

Результаты:

1. Данные по иммуногенности оценивали по уровням антител IgG, наблюдаемым в ответ на конъюгаты SIPL Vi TT на мышинной модели.
2. Индукцию IgG измеряли как среднее геометрическое (геометрическое среднее) колориметрического ответа (ОП), наблюдаемого в ИФА IgG.
3. Среднее геометрическое значение, наблюдаемое в ответ на SIPL Vi TT, считаются иммуногенными, если кратное увеличение ОП при лечении VI TT превышает ОП, наблюдаемое в ответ на неконъюгированный Vi PS, более чем в 4 раза.

Выводы:

1. Было обнаружено, что все моновалентные конъюгаты Vi-TT индуцируют иммуногенный ответ, наблюдаемый с помощью серологического анализа.
2. Все моновалентные конъюгаты Vi-TT демонстрировали более высокие уровни IgG, чем наблюдаемые в группе, вакцинированной Typbar TCV.
3. Индукция иммуногенный ответа (среднее геометрическое и >4-кратное увеличение) наблюдалась в следующем порядке: G7 SIPL Vi PS-TT (размер PS 214) > G7 SIPL Vi PS-TT (размер PS 388) > Typbar TCV (коммерческая вакцина).

В. Исследование иммуногенности двухвалентной конъюгированной вакцины

Иммуногенный потенциал двухвалентной (брюшнотифозной и паратифозной) вакцины SIPL оценивали на мышинной модели.

Исследование иммуногенности на мышах № 1:

Исследование иммуногенности проводили на мышах, где изучали действие двухвалентной вакцины, содержащей комбинацию моновалентной вакцины Vi TT и моновалентного O-SP A (О-специфичный полисахаридный антиген *S. Paratyphi A*), конъюгированного с белками-носителями, такими как TT, DT и CRM. Моновалентные и двухвалентные варианты этих вакцин вводили внутримышечно мышам (по 8 животных в группе). Животных инокулировали на 1, 14 и 28 день, а образцы сыворотки собирали на 14, 28 и 42 день. Парные образцы сыворотки были доступны от всех животных в каждой группе. Подробную информацию о плане лечения см. в Таблице 92 ниже. Образцы сыворотки использовали для определения антител против инъецированного полисахарида с использованием подходящего серологического иммунохимического метода, такого как ИФА IgG собственной разработки. Сыворотки мышей, которым вводили соответствующий неконъюгированный полисахарид SIPL (Vi PS) и только O-SP, использовали в качестве сравнительного контроля индукции ответа IgG.

Протокол лечения животных кратко описан в таблице ниже.

Образцы сыворотки тестировали иммунологическим/серологическим аналитическим методом анализом, т.е. ИФА IgG. В исследовании использовали самок мышей в возрасте 5-6 недель (линия Balb C; выведены собственными силами) в соответствии с утвержденным ИАЕС протоколом исследования на животных. Все животные были беспатогенными и содержались в асептических условиях в боксе биологической безопасности во время инокуляции и сбора образцов крови. Мыши весом в пределах ~18-20 г. использовались в исследовании. Каждая мышь получала 2,5 мкг только моновалентного конъюгированного Vi TT или только O-SP A DT/TT/CRM и 2,5 мкг каждого в составе двухвалентной вакцины (моновалентный конъюгированный Vi TT, смешанный с O-SP A DT/TT/CRM) посредством внутримышечной инъекции. Вакцины разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в качестве носителя. Ни для одной из групп лечения в исследовании не использовался адъювант.

Схема лечения: В следующей таблице представлен общий план лечения для исследования.

Таблица 92: План лечения мышей							
№ п. п.	Идентифика тор группы	Группы лечения (фактический план)	Животн ых на группу	Доза Vi PS / O-SP на животное	Объём инъекц ии	День инъекц ии (ВМ)	День забора крови (сыворот ки)
			Balb/C (самки) мыши				
1	G1	Только носитель (ФСБ)	8	ФСБ	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
2	G2	Tyrbar TCV (Конъюгированна я)	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
3	G3	SIPL Vi PS (Неконъюгирован ная)	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
4	G4	SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
5	G5	SIPL O-SP A (Неконъюгирован ная)	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
6	G6	SIPL O-SP A DT/ TT/ CRM	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
7	G7	SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A DT	8	2,5 мкг каждого компонен та	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
8	G8	SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A TT	8	2,5 мкг каждого компонен та	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
9	G9	SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A CRM	8	2,5 мкг каждого компонен та	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
10	G10	SIPL O-SP A CRM + Tyrbar TCV (Конъюгированна я)	8	2,5 мкг каждого компонен та	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42

Методология и способы, используемые для серологического анализа:

Образец крови отбирали у экспериментальных животных из ретроорбитальной вены с помощью стерильных стеклянных капиллярных пробирок. Изофлуран использовался как безопасный анестетик во время процедуры отбора крови. Сыворотку подвергали анализу антител IgG, вырабатываемых в ответ на введенный антиген, с использованием метода ИФА IgG собственной разработки. Уровни IgG определяли в образцах сыворотки крови всех исследуемых групп методом колориметрического анализа.

Результаты:

В следующих таблицах приведены данные индукции иммуногенности (на 21-й день) различных двухвалентных (брюшнотифозных и паратифозных) вакцин SIPL.

Таблица 93, 94, 95, 96: Результаты иммуногенности

Таблица 93: Результаты иммуногенности			Таблица 94: Результаты иммуногенности		
Исследование иммуногенности 1			Исследование иммуногенности 1		
SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A DT			SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A TT		
Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения	Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения
8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной	8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной
>4-кратное увеличение		Да	>4-кратное увеличение		Да
n/N %		100% (8 из 8)	n/N %		100% (8 из 8)

Таблица 95: Результаты иммуногенности			Таблица 96: Результаты иммуногенности		
Исследование иммуногенности 1			Исследование иммуногенности 1		
SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A CRM			SIPL O-SP A CRM + Typhbar TCV		
Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения	Кол-во мышей	Пол	Кратность увеличения
8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной	8	Самки	Конъюгированная по сравнению с Неконъюгированной
>4-кратное увеличение		Да	>4-кратное увеличение		Да
n/N %		100% (8 из 8)	n/N %		100% (8 из 8)

Результаты:

Группы мышей, которым вводили двухвалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SIPL, такую как а) SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A DT, б) SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A TT и в) SIPL Vi PS -TT + SIPL O-SP A CRM Vi TT продемонстрировал более чем в 4 раза более высокую индукцию IgG (по сравнению с мышами, которым вводили неконъюгированный Vi PS или неконъюгированный SIPL O-SP A), что указывает на иммуногенный потенциал двухвалентной вакцины SIPL, содержащей комбинацию Vi TT и SIPL O-SP A (DT/TT/CRM).

Индукция IgG двухвалентной (брюшнотифозной и паратифозной) вакциной SIPL была выше, чем индукция IgG, наблюдаемая в случае двухвалентной вакцины, содержащей SIPL O-SP A CRM и коммерческую вакцину Vi TT Typbar TCV.

В различных группах сравнивались следующие параметры:

- a. >4-кратное увеличение: среднее кратное увеличение было >10-кратным
- b. Среднее геометрическое титра антител: все группы демонстрировали более высокое среднее геометрическое значение, чем то, которое наблюдалось в случае неконъюгированного PS.
- c. % мышей с положительным ответом: все мыши во всех группах Vi TT демонстрировали более высокий ответ антител (100% положительных результатов).

Выводы из анализа серологических данных:

Исследование иммуногенности на мышах проводили с 8 мышами (самками) в каждой группе. Индукцию антител оценивали во всех группах в ответ на введенную двухвалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SIPL по сравнению с неконъюгированными Vi PS и O-SP A PS. Все двухвалентные (брюшнотифозные и паратифозные) вакцины SIPL четко показали индукцию специфичных к PS антител IgG (день 21; после первой бустерной иммунизации) по сравнению с группой, получавшей только PS (Vi и O-SP A). Индукция IgG в сыворотке мышей является сильной детерминантой серологического ответа на двухвалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SIPL. Таким образом, двухвалентная (брюшнотифозная и паратифозная) вакцина SIPL способна индуцировать сильный иммуногенный ответ в мышинной модели и обеспечивает многообещающий потенциал для будущих исследований на высших животных.

Результаты:

1. Данные об иммуногенности оценивают по уровням антител IgG, наблюдаемым в ответ на двухвалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SIPL на мышинной модели.
2. Индукция IgG измеряется как среднее геометрическое (среднее геометрическое) колориметрического ответа (ОП), наблюдаемого в ИФА IgG.
3. Среднее геометрическое значение, наблюдаемое в ответ на двухвалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SIPL, считается иммуногенным, если кратность увеличения ОП при лечении VI TT более чем в 4 раза выше, по сравнению с ОП, наблюдаемой в ответ на неконъюгированный Vi PS.

Выводы:

1. Было обнаружено, что все конъюгаты двухвалентной (брюшнотифозной и паратифозной) вакцины SIPL индуцируют иммуногенный ответ, наблюдаемый с помощью серологического анализа.
2. Все конъюгаты двухвалентных (брюшнотифозных и паратифозных) вакцин SIPL демонстрировали более высокие уровни IgG, чем наблюдаемые в случае неконъюгированных аналогов.

3. Индукция IgG двухвалентной (брюшнотифозной и паратифозной) вакциной SIPL была выше, чем индукция IgG, наблюдаемая в случае двухвалентной вакцины, содержащей SIPL O-SP A CRM и коммерческую вакцину Vi TT Typvar TCV.

4. У мышей, получавших «двухвалентную (брюшнотифозную и паратифозную) вакцину SIPL», наблюдалась индукция иммуногенного ответа (среднее геометрическое значение и более чем 4-кратное увеличение), и, следовательно, можно сделать вывод о том, что двухвалентная (брюшнотифозная и паратифозная) вакцина SIPL способна индуцировать сильный ответ иммуногенности в мышинной модели, что свидетельствует о её клиническом иммуногенном потенциале.

Пример 7: Набор однодозовой вакцины

А) Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию:

- a) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* A – TT 5 мкг на 0,5 мл;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* C – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* Y – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* W-135 – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* X – TT 5 мкг на 0,5 мл;
- f) сахароза 1 – 12 мг на 0,5 мл;
- g) цитрат натрия (дигидрат) 0,1 – 2 мг на 0,5 мл;
- h) Трис-буфер 0,05 – 0,5 мг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг;
- b) хлорид натрия 1 – 10 мг;
- c) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

Интерпретация:

Отсутствует антигенная интерференция ViPs-TT с антигенами *Neisseria meningitidis*, для профилактики брюшного тифа, вызванного антигенами *Salmonella typhi* и *Neisseria meningitidis*, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей, при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

В) Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию:

- a) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;

- e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- f) сахароза 1 – 12 мг на 0,5 мл;
- g) цитрат натрия (дигидрат) 0,1 – 2 мг на 0,5 мл;
- h) Трис-буфер 0,05 – 0,5 мг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг ; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;
- d) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

Интерпретация:

Отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ; антигена OSP с антигенами *Neisseria meningitidis* для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных антигенами *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и *Neisseria meningitidis*, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

С) Набор для однократной вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую шестивалентную иммуногенную композицию:

- a) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;
- b) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;
- c) столбнячный анатоксин, (Т) антиген в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;
- d) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, коклюшный анатоксин (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютинаина (FHA) 1-50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

е) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

ф) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг ;

б) хлорид натрия 1 – 10 мг ; и/или

с) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг; и/или

д) полисорбат 20; и/или

е) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг; и/или

ф) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

Интерпретация:

Отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ с шестивалентной иммуногенной композицией, для профилактики брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi* и шестивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

Д) Набор для однократной вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую шестивалентную иммуногенную композицию:

а) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

б) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

с) столбнячный анатоксин, (Т) антиген в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

д) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, коклюшный анатоксин (РТ) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1-50 мкг, пертактина (Р69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

е) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

ф) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг ;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) хлорид натрия 1 – 10 мг; и/или
- d) трис-буфер, или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг; и/или
- g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20; и/или
- h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг; и/или
- e) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

Интерпретация:

Отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ, антигена OSP с шестивалентными антигенами для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и шестивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

Е) Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую семивалентную иммуногенную композицию:

- a) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;
- b) антиген инаktivированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инаktivированного ротавируса, присутствующего в количестве от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;
- c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;
- d) столбнячный анатоксин, антиген (Т) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;
- e) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, коклюшный анатоксин (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1–50 мкг, пертактина (Р69 или PRN) 1–20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2–25 мкг; на 0,5 мл;
- f) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;
- g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;
- и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг ;
- b) хлорид натрия 1 – 10 мг;
- c) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

Интерпретация:

Где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ с семивалентной иммуногенной композицией, для профилактики брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi* и семивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

F) Набор для однократной вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую семивалентную иммуногенную композицию:

- a) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;
- b) антиген инактивированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инактивированного ротавируса, присутствующий в количестве от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;
- c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;
- d) столбнячный анатоксин, антиген (Т) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;
- e) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, коклюшный анатоксин (РТ) 1-50 мкг, филаментный гемагглютинин (FHA) 1-50 мкг, пертактин (Р69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальные белки (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5 мл;
- f) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;
- g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;
- и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

- с) хлорид натрия 1 – 10 мг ; и/или
- d) трис-буфер, или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6; и/или
- g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20;
- h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или
- е) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

Интерпретация:

Отсутствует антигенная интерференция ViPs-TT; антигена OSP с семивалентными антигенами для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и семивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:

i) по меньшей мере, один антиген, выбранный из:

- a) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;
- b) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовара *paratyphi A* с белком-носителем;
- c) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi B* с белком-носителем;
- d) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi C* с белком-носителем;
- e) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;
- f) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;
- g) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *choleraesuis* с белком-носителем;
- h) конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *dublin* с белком-носителем; и

ii) необязательно антиген, выбранный из группы, включающей в себя *Salmonella* (нетифоидную), дифтерийный анатоксин (D), столбнячный анатоксин (T), цельноклеточный коклюшный анатоксин (wP), поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), конъюгат PRP *Haemophilus influenzae b* с белком-носителем (Hib), *Haemophilus influenzae* (серотипы a, c, d, e, f и неинкапсулированные штаммы), вирус полиомиелита, конъюгат, содержащий антигены *N. meningitidis* (A, B, C, D, W135, X, Y, Z и 29E), антиген(ы) *Streptococcus pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10F, 10B, 10C, 10A, 11A, 11F, 11B, 11C, 11D, 11E, 12A, 12B, 12F, 13, 14, 15A, 15C, 15B, 15F, 16A, 16F, 17A, 17F, 18C, 18F, 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33A, 33C, 33D, 33E, 33F, 33B, 34, 45, 38, 35A, 35B, 35C, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A, 48), *Streptococcus* spp. группы A, *Streptococcus* spp. группы B (группа Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII и IX.) *Neisseria meningitidis* B bleb или антиген(ы) (fHbp, PorA, химерный fHbp-porA), антиген(ы) *Staphylococcus aureus*, антиген(ы) сибирской язвы, БЦЖ, гепатита (штаммы A, C, D, E, F и G), вирус папилломы человека, ВИЧ, бесклеточный коклюш, модифицированную аденилатциклазу, антиген малярии (RTS, S), корь, эпидемический паротит, краснуху, денге, Зика, Эбола, чикунгунья, японский энцефалит, ротавирус, диарейные антигены (*E. coli* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. *Vibrio cholera*), флавивирус, оспу, желтую лихорадку, опоясывающий лишай, антигены вируса ветряной оспы.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, где композиция содержит, по меньшей мере, одну двухвалентную комбинацию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем.

3. Иммуногенная композиция по п. 1, где композиция содержит, по меньшей мере, одну трехвалентную комбинацию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем.

4. Иммуногенная композиция по п. 1, где композиция содержит четырехвалентную комбинацию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

д) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем.

5. Иммуногенная композиция по п. 1, где композиция содержит, по меньшей мере, одну комбинацию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;

д) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* с белком-носителем;

е) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* с белком-носителем;

ф) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* с белком-носителем;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с белком-носителем;

д) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;

е) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* с белком-носителем;

ф) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* с белком-носителем;

г) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с белком-носителем;

e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;

f) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* с белком-носителем;

g) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* с белком-носителем;

h) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с белком-носителем;

f) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;

g) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* с белком-носителем;

h) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* с белком-носителем;

i) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* с белком-носителем;

e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* с белком-носителем;

f) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* с белком-носителем;

g) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* с белком-носителем;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* A с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* C с белком-носителем.

6. Иммуногенная композиция по п. 1, где композиция содержит, по меньшей мере, одну комбинацию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

d) столбнячный анатоксин, (T) антиген

e) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

f) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

c) антиген ротавируса;

d) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

e) столбнячный анатоксин, (T) антиген

f) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

g) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

h) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

d) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

e) столбнячный анатоксин, (T) антиген

f) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

g) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

h) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) антиген ротавируса;

d) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

е) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

f) столбнячный анатоксин, (T) антиген

g) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

h) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

i) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

е) дифтерийный анатоксин, (D) антиген

f) столбнячный анатоксин, (T) антиген

g) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);

h) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и

i) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

- d) антиген ротавируса;
- e) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin
- f) дифтерийный анатоксин, (D) антиген
- g) столбнячный анатоксин, (T) антиген
- h) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);
- i) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и
- j) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);
- или
- a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;
- d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;
- e) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin
- f) дифтерийный анатоксин, (D) антиген
- g) столбнячный анатоксин, (T) антиген
- h) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);
- i) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и
- j) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib);
- или
- a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;
- d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;
- e) антиген ротавируса;
- f) антиген инактивированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Salk или Sabin

- g) дифтерийный анатоксин, (D) антиген
- h) столбнячный анатоксин, (T) антиген
- i) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) или бесклеточный коклюшный антиген (aP);
- j) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и
- k) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib).

7. Иммуногенная композиция по п. 1, где композиция содержит, по меньшей мере, одну комбинацию:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) антиген ротавируса;

c) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

d) антиген *Shigella* spp.;

e) антиген *Campylobacter jejuni*;

f) антиген *Vibrio cholerae*;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) антиген ротавируса;

d) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

e) антиген *Shigella* spp.;

f) антиген *Campylobacter jejuni*;

g) антиген *Vibrio cholerae*;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) антиген ротавируса;

d) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

e) антиген *Shigella* spp.;

f) антиген *Campylobacter jejuni*;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) антиген ротавируса;

д) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

е) антиген *Shigella* spp.;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) антиген ротавируса;

д) антиген *Shigella* spp.;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

с) антиген ротавируса;

д) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

е) антиген *Shigella* spp.;

ф) антиген *Campylobacter jejuni*;

г) антиген *Vibrio cholerae*;

или

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

д) антиген ротавируса;

е) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

ф) антиген *Shigella* spp.;

г) антиген *Campylobacter jejuni*;

h) антиген *Vibrio cholerae*;

или

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с белком-носителем;

e) антиген ротавируса;

f) антиген диареогенных *Escherichia coli* spp. (энтеротоксигенных и энтерогеморрагических);

g) антиген *Shigella* spp.;

h) антиген *Campylobacter jejuni*;

i) антиген *Vibrio cholera*.

8. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, отличающаяся тем, что белок-носитель (СР) выбран из группы, включающей в себя столбнячный токсин, столбнячный анатоксин (ТТ), фрагмент столбнячного токсина, дифтерийный анатоксин (DT), CRM197, анатоксин *Pseudomonas aeruginosa*, анатоксин *Bordetella pertussis*, анатоксин *Clostridium perfringens*, LT *E.coli*, ST *E. coli*, термолабильный токсин *Escherichia coli* - субъединица В, комплекс наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, rЕРА, белок D *H. influenzae*, флагеллин FliC, гемоцианин мечехвоста, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс наружной мембраны с (ОМРС), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis* и детоксифицированный фактор отека (ЕF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH), сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин (BSA), очищенный белковый дериват туберкулина (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4+ Т-клеток человека к антигенам различных патогенов, таким как N19, белки захвата железа, токсин А или В из белков *C. difficile* и *Sagalactiae* с линкером или без него и их фрагменты, производные, модификации.

9. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовара *typhi* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с белком-носителем; конъюгированный антиген сахарид

Salmonella enterica серовар *enteritidis* с белком-носителем присутствует в диапазоне доз от 5 мкг на дозу до 30 мкг на дозу.

10. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где композиция содержит фармацевтически приемлемый буфер, выбранный из группы, состоящей из хлорида натрия, ацетата, карбоната, цитрата, лактата, глюконата, тартрата, фосфатно-солевого буфера, бората, гистидинового буфера, сукцинатного буфера, HEPES, Трис или цитрат-фосфатного буфера.

11. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, выбранное из группы сахаров, поверхностно-активных веществ, полимеров, солей, аминокислот или модификаторов pH.

12. Иммуногенная композиция по п. 11, где композиция в качестве вспомогательного вещества содержит аминокислоты или белки, выбранные из группы, состоящей из L-гистидина, лизина, изолейцина, метионина, глицина, аспарагиновой кислоты, трицина, аргинина, лейцина, глутамина, аланина, пептида, гидролизованного белка или белка, такого как сывороточный альбумин.

13. Иммуногенная композиция по п. 11, где композиция в качестве вспомогательного вещества содержит сахара, выбранные из группы, состоящей из сахарозы, маннита, трегалозы, маннозы, раффинозы, лактита, лактобионовой кислоты, глюкозы, мальтулозы, изомальтулозы, мальтозы, лактозы, сорбита, декстрозы, фруктозы, глицерина или их комбинации.

14. Иммуногенная композиция по п. 11, где композиция в качестве вспомогательного вещества содержит неионные поверхностно-активные вещества, выбранные из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанола, октилфеноксиполиэтоксиэтанола, октоксинола 40, ноноксинола-9, триэтаноламина, триэтаноламин полипептидного олеата, гидроксистеарата полиоксиэтилена-660, полиоксиэтилен-35 рицинолеата, соевого лецитина и полоксамера.

15. Иммуногенная композиция по п. 11, где композиция в качестве вспомогательного вещества содержит полимеры, выбранные из группы, состоящей из декстрана, карбоксиметилцеллюлозы, гиалуроновой кислоты, циклодекстрина.

16. Иммуногенная композиция по п. 11, где композиция в качестве вспомогательного вещества содержит соли, выбранные из NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 и MgCl_2 .

17. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где однократная композиция не содержит консервант.

18. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где многократная композиция содержит один или несколько консервантов, выбранных из группы, состоящей из 2-феноксиэтанола, хлорида бензетония (фемерола), фенола, тиомерсала, формальдегида, сложных эфиров парабен

(например, метил-, этил-, пропил- или бутилпарабен), бензилового спирта, м-крезола, хлорида бензалкония, бензилового спирта, хлорбутанола, п-хлор-м-крезола.

19. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где композиция дополнительно содержит адъювант, выбранный из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, гидроксифосфата алюминия и сульфата калия-алюминия или их смеси.

20. Иммуногенная композиция по п.п. 1-7, где композиция дополнительно содержит иммуностимулирующий компонент, выбранный из группы, состоящей из эмульсии масла и воды, MF-59, липосомы, липополисахарида, сапонины, липида А, производных липида А, монофосфорила липида А, 3-деацилированного монофосфорила липида А, AS01, AS03, олигонуклеотида, олигонуклеотида, содержащего, по меньшей мере, один неметилованный CpG и/или липосому, адъюванта Фрейнда, полного адъюванта Фрейнда, неполного адъюванта Фрейнда, адъюванта CRL-8300, мурамилдипептидов, агонистов TLR-4, флагеллина, флагеллинов, полученных из грамотрицательных бактерий, dmLT, агонистов TLR-5, фрагментов флагеллинов, способных связываться с рецепторами TLR-5, QS-21, ISCOMS, хитозана, комбинации сапонинов со стеролами и липидами.

21. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) хлорид натрия 1 – 10 мг
- c) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

22. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) хлорид натрия 1 – 10 мг
- c) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- d) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

23. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

- c) хлорид натрия 1 – 10 мг

- d) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

24. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

- c) хлорид натрия 1 – 10 мг

- d) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

е) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

25. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

26. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) 2-феноксизтанол 1 – 10 мг

е) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

27. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

ф) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

28. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин

полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

29. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

30. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

31. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25- 50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

32. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- е) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

33. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

- ф) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

34. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

- ф) сахарозу 2,5 - 25 мг
- г) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

35. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) хлорид натрия 1 – 10 мг
- d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг
- e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
- f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

36. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) хлорид натрия 1 – 10 мг
- d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг
- e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
- f) сахарозу 2,5 - 25 мг
- g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

37. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) хлорид натрия 1 – 10 мг
- d) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

38. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

e) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

39. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

40. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

41. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

42. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

43. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

44. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

e) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

45. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

46. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

47. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержит:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

48. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

49. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

50. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- е) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

51. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг
- е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
- ф) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

52. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- с) хлорид натрия 1 – 10 мг
- д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг
- е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
- ф) сахарозу 2,5 - 25 мг
- г) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

53. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

ф) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

г) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

54. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

ф) сахарозу 2,5 - 25 мг

г) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

55. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

56. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

e) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

57. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

58. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг

d) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахарозу 2,5 - 25 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

59. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полксамер в количестве 25-500 мкг

ф) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

г) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

60. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

б) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг

д) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

е) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полксамер в количестве 25-500 мкг

ф) сахарозу 2,5 - 25 мг

г) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

х) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

61. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

д) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

62. Иммуногенная композиция по п. 1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
 - b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
- где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
 - d) хлорид натрия 1 – 10 мг
 - e) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
 - f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

63. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
 - b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
- где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
 - d) хлорид натрия 1 – 10 мг
 - e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
 - f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

64. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
 - b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
- где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
 - d) хлорид натрия 1 – 10 мг
 - e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
 - f) сахароза 2,5 - 25 мг
 - g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

65. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

66. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

f) сахароза 2,5 - 25 мг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

67. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол,

октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

68. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) сахарозу 2,5 - 25 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

69. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

70. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- d) хлорид натрия 1 – 10 мг
- e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг
- f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг
- g) сахарозу 2,5 - 25 мг
- h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- i) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

71. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- d) хлорид натрия 1 – 10 мг
- e) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

72. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;
- d) хлорид натрия 1 – 10 мг
- e) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг
- f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

73. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

- a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;
- b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг;
где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

74. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

75. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

76. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

ф) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) сахарозу 2,5 - 25 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

77. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

ф) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

78. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтанолламин, триэтанолламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) сахарозу 2,5 - 25 мг

h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

i) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

79. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

80. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

81. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

82. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

83. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

e) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

f) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

84. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

ф) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) сахарозу 2,5 - 25 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

85. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

д) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

ф) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол, октилфеноксиполиэтоксизтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

86. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

а) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

д) хлорид натрия 1 – 10 мг

е) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

ф) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксизтанол,

октилфеноксиполиэтоксиэтанол, окстоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

g) сахарозу 2,5 - 25 мг

h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

i) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

87. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг;

где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

88. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг;

где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

89. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг;

где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

90. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

g) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

91. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксигэтанол, октилфеноксиполиэтоксигэтанол, окстоксигэтанол 40, ноноксигэтанол-9, триэтанолламин, триэтанолламин полипептидный олеат, полиоксигэтанол-660 гидроксигэтанол, полиоксигэтанол-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

h) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

92. Иммуногенная композиция по п.1, отличающаяся тем, что 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксигликоль, октилфеноксиполиэтоксигликоль, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

h) сахарозу 2,5 - 25 мг

i) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

93. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

c) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

d) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

e) хлорид натрия 1 – 10 мг

f) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксигликоль, октилфеноксиполиэтоксигликоль, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

i) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

94. Иммуногенная композиция по п.1, где 0,5 мл композиции содержат:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с TT 1,25 – 50 мкг;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с CP 1,25-50 мкг; где CP представляет собой или TT, или DT, или CRM197;

с) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

д) конъюгированный антиген сахарид *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* с СР 1,25-50 мкг; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

е) хлорид натрия 1 – 10 мг

ф) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1–1,6 мг

г) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтанолламин, триэтанолламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг

h) сахарозу 2,5 - 25 мг

i) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг

j) воду для инъекций (WFI) при необходимости.

95. Набор для однократной вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию:

а) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* A – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;

б) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* C – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;

с) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* Y – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;

д) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* W-135 – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;

е) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis* X – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;

ф) сахароза 1 – 12 мг на 0,5 мл;

г) цитрат натрия (дигидрат) 0,1 – 2 мг на 0,5 мл;

h) Трис-буфер 0,05 – 0,5 мг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

б) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;

с) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ с антигенами *Neisseria meningitidis*, для профилактики брюшного тифа, вызванного антигенами *Salmonella typhi* и *Neisseria meningitidis*, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков

взрослых и пожилых людей, при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

96. Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию:

- a) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis A* – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- b) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis C* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- c) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis Y* – CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- d) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis W-135* – CRM197 5 мкг на 0,5

мл;

e) конъюгированный антиген сахарид *Neisseria meningitidis X* – ТТ 5 мкг на 0,5 мл;

f) сахароза 1 – 12 мг на 0,5 мл;

g) цитрат натрия (дигидрат) 0,1 – 2 мг на 0,5 мл;

h) Трис-буфер 0,05 – 0,5 мг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий жидкую композицию для восстановления лиофилизированной (сублимированной) иммуногенной композиции, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;

d) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ; антигена OSP с антигенами *Neisseria meningitidis* для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных антигенами *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и *Neisseria meningitidis*, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

97. Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую шестивалентную иммуногенную композицию:

a) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

b) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

c) столбнячный анатоксин, (Т) антиген в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

д) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 МЕ на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (РТ) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1-50 мкг, пертактина (Р69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

е) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

ф) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

б) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

с) трис-буфер или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1-1,6 мг на 0,5 мл; и/или

д) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинол 40, ноноксинол-9, триэтаноламин, триэтаноламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг на 0,5 мл; и/или

е) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

ф) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ с шестивалентной иммуногенной композицией, для профилактики брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi* и шестивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

98. Набор для однократной вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую шестивалентную иммуногенную композицию:

а) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

б) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

с) столбнячный анатоксин, (Т) антиген в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

d) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 МЕ на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1-50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

e) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

c) хлорид натрия 1 – 10 мг; и/или

d) трис-буфер, или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1-1,6 мг на 0,5 мл; и/или

e) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октоксинал 40, ноноксинал-9, триэтанолламин, триэтанолламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг на 0,5 мл; и/или

f) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

g) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ, антигена OSP с шестивалентными антигенами для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и шестивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

99. Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую семивалентную иммуногенную композицию:

a) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

b) антиген инаktivированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инаktivированного ротавируса, присутствующий в количестве от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

d) столбнячный анатоксин, антиген (T) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

e) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 ME на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (PT) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1-50 мкг, пертактина (P69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5 мл;

f) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

a) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

b) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл;

c) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ с семивалентной иммуногенной композицией, для профилактики брюшного тифа, вызванного *Salmonella typhi* и семивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

100. Набор для однодозовой вакцины, включающий в себя:

первый контейнер, содержащий полностью жидкую семивалентную иммуногенную композицию:

a) антиген инаktivированного вируса полиомиелита (ИПВ), выбранный из штамма Sabin или Salk; где ИПВ типа 1 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), ИПВ типа 2 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU) или ИПВ типа 3 в дозе 1-50 D-антигенных единиц (DU), на 0,5 мл;

b) антиген инаktivированного ротавируса, выбранный из CDC-9, CDC-66 или любых других штаммов инаktivированного ротавируса, присутствующий в количестве от 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

c) дифтерийный анатоксин, (D) антиген в количестве от 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

d) столбнячный анатоксин, антиген (T) в количестве от 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

е) цельноклеточный коклюшный антиген (wP) в количестве от 1 до 50 МЕ на 0,5 мл или бесклеточный коклюшный антиген (aP), содержащий одну или несколько модифицированных аденилатциклаз, выбранный из коклюшного анатоксина (РТ) 1-50 мкг, филаментного гемагглютиниона (FHA) 1-50 мкг, пертактина (Р69 или PRN) 1-20 мкг или фимбриальных белков (FIM 1, 2 и 3) 2-25 мкг; на 0,5 мл;

ф) поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типа b (Hib) в количестве от 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

и

второй контейнер, содержащий полностью жидкую иммуногенную композицию, включающую в себя:

а) конъюгированный антиген ViPs *Salmonella enterica* серовар *typhi* с ТТ 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл;

б) конъюгированный антиген OSP *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с СР 1,25 – 50 мкг на 0,5 мл; где СР представляет собой или ТТ, или DT, или CRM197;

с) хлорид натрия 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

д) трис-буфер, или цитратный буфер, или гистидиновый буфер, или сукцинатный буфер 0,1-1,6 мг на 0,5 мл; и/или

g) полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80, полисорбата 85, нонилфеноксиполиэтоксиэтанол, октилфеноксиполиэтоксиэтанол, октосинол 40, ноноксинал-9, триэтанолламин, триэтанолламин полипептидный олеат, полиоксиэтилен-660 гидроксистеарат, полиоксиэтилен-35 рицинолеат, соевый лецитин и полоксамер в количестве 25-500 мкг на 0,5 мл; и/или

h) 2-феноксиэтанол 1 – 10 мг на 0,5 мл; и/или

е) воду для инъекций (WFI) при необходимости;

где отсутствует антигенная интерференция ViPs-ТТ; антигена OSP с семивалентными антигенами для профилактики брюшного тифа и паратифов, вызванных *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* и семивалентными антигенами, где указанная вакцинная композиция достаточна для индукции необходимого Т-зависимого иммунного ответа против *S. typhi* и *paratyphi*, в том числе у детей младше 2 лет, подростков взрослых и пожилых людей при введении только одной инъекции, составляющей полный график вакцинации.

101. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем включает в себя:

а. Периодический режим культивирования с подпиткой для получения высокого выхода капсульного Vi-полисахарида *Salmonella typhi* (ViPs), при котором при культивировании используется комбинация пеногасителя, соевого пептона в диапазоне от 40 до 70 г/л и дрожжевого экстракта в диапазоне от 40 до 70 г/л, что приводит к повышению выхода (100-700 мг/л), и параметры ферментации включают в себя поддержание значения pH в диапазоне от 6,7 до 7,1,

поддержание температуры в диапазоне 34,0-38,0°C, поддержание уровня растворенного кислорода в пределах 36-39%, перемешивание со скоростью от 150 до 500 об/мин и поддержание осмоляльности в диапазоне 400-600 мОсмоль/кг;

b. Очистку капсульных ViP *Salmonella typhi* путем обработки анионным детергентом, более предпочтительно додецилсульфатом натрия (SDS) менее 2%, и катионным детергентом, предпочтительно СТАВ, этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) (от 4 до 10 мМ), ацетатом натрия (от 5% до 10%), осаждение спиртом (от 30% до 60%), а также концентрирование и диафильтрация с использованием мембран с отсечением по молекулярной массе 30 кДа на разных этапах, где способ обеспечивает значительное снижение уровней эндотоксина (< 100 ЕЭ эндотоксина на мкг PS), белка ($< 1\%$) и примесей нуклеиновой кислоты ($< 2\%$), более высокое извлечение капсульного полисахарида в диапазоне от 40% до 65%, с желаемыми уровнями О-ацетила ($> 2,0$ ммоль/г полисахарида), выход очищенного Vi-полисахарида в диапазоне от 100 до 4000 мг/л, распределение по размеру молекул, при котором $>50\%$ PS элюируется до достижения коэффициента распределения (KD) 0,25, и средняя молекулярная масса очищенного Vi-полисахарида может находиться в диапазоне от 40 до 400 кДа, предпочтительно от 150 до 250 кДа;

c. Конъюгацию очищенного ViPs с белком-носителем (CP) с использованием реакции конъюгации карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования

d. Очистку конъюгата ViPs-белок-носитель с использованием гель-фильтрационной хроматографии или ультрафильтрации, при которой основная масса конъюгата концентрируется, по меньшей мере, в 3 раза и практически все непрореагировавшие соединения, неконъюгированные полисахариды, неконъюгированные белки удаляются с получением очищенной вакцины конъюгата Vi-полисахарида, имеющего размер от 1000 до 1500 кДа, где выход конъюгата составляет $\geq 50\%$.

102. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.101, отличающийся тем, что перед конъюгацией ViP подвергают деполимеризации/уменьшению размера с помощью химических средств, выбранных из группы, состоящей из FeCl_3 , H_2O_2 , метапериодата натрия и ацетата натрия, или механических средств, выбранных из группы, состоящей из разрушения клеток высоким давлением, гомогенизатора, обработки ультразвуком.

103. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.101, отличающийся тем, что очищенные ViPs ковалентно связаны с белком-носителем (CP) с использованием реакции конъюгации карбодиимида в присутствии 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDAC), смешанные в соотношении от 1:0,5 до 1:2 по массе ViPs:EDAC, и соотношение Vi-полисахарида и белка-носителя составляет от 0,5 до 1,5, соотношение ViPs:CP:EDAC предпочтительно составляет 1:1:2 или 1:0,9:2, или 1:0,8:1,8, или 1:0,7:1,8, реакцию проводят при pH в диапазоне от 5 до 7, температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

104. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.п. 101 и 103, отличающийся тем, что перед конъюгацией полисахарид или белок-носитель дериватизируют гетеро- или гомобифункциональным линкером, выбранным из группы, состоящей из гидразина, карбогидразид, хлорид гидразина, дигидразида, ϵ -аминогексановой кислоты, хлоргексанолдиметилацетата, D-глюкуронолактона, цистамина и п-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6-диаминооксигексана или β -пропинамидо, нитрофенилэтиламина, галогеналкилгалогенида, 6-аминокапроновой кислоты с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

105. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.104, отличающийся тем, что перед конъюгацией белок-носитель (CP) дериватизируют линкером дигидразида адипиновой кислоты (ADH) в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDAC), продолжительность реакции составляет 1 час, её проводят при значении pH в диапазоне от 5 до 7.

106. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.п. 101, 102, 103, 104 и 105, отличающийся тем, что белок-носитель выбран из группы, включающей в себя столбнячный токсин, столбнячный анатоксин, фрагмент столбнячного токсина, дифтерийный анатоксин, CRM197, анатоксин *Pseudomonas aeruginosa*, анатоксин *Bordetella pertussis*, анатоксин *Clostridium perfringens*, LT *E.coli*, ST *E. coli*, термолабильный токсин *Escherichia coli* - субъединица B, комплекс наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, rEPA, белок D *H. influenzae*, флагеллин FliC, гемоцианин мечехвоста, экзотоксин A из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс наружной мембраны с (OMP), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок A (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин A (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, протективный антиген (PA) *Bacillus anthracis* и детоксифицированный фактор отека (EF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумин, гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH), сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин (BSA), очищенный белковый дериват туберкулина (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4+ Т-клеток человека к антигенам различных патогенов, таким как N19, белки захвата железа, токсин A или B из белков *C. difficile* и *S.galactiae* с линкером или без него и их фрагменты, производные, модификации.

107. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.106, отличающийся тем, что белком-носителем является столбнячный анатоксин (TT).

108. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.106, отличающийся тем, что белком-носителем является дифтерийный анатоксин (DT).

109. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *typhi* с белком-носителем по п.106, отличающийся тем, что белком-носителем является CRM197.

110. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем включает в себя:

а. Очистку О-специфичного полисахарида (OSP) липополисахарида (LPS) *Salmonella paratyphi A* кислотным гидролизом LPS, предпочтительно уксусной кислотой (конечная концентрация 0,5–5%), pH ~ 2,0–3,0, нейтрализацию до pH 7,0 раствором аммиака, дезоксихолатом натрия (конечная концентрация 0,5–5%), а также концентрирование и диафильтрацию с использованием мембран с отсечением по молекулярной массе от 10 кДа до 30 кДа на разных этапах, где способ обеспечивает значительное снижение уровней эндотоксина (< 100 ЕЭ эндотоксина на мкг PS), белка (< 1%) и примесей нуклеиновой кислоты (< 2%), более высокое извлечение капсульного полисахарида в диапазоне от 40% до 65%, с желаемыми уровнями О-ацетила (> 2,0 ммоль/г полисахарида), распределение по размеру молекул, при котором >50% PS элюируется до достижения коэффициента распределения (KD) 0,25, и средняя молекулярная масса очищенного О-специфичного полисахарида (OSP) может находиться в диапазоне от 40 до 400 кДа;

б. Конъюгацию очищенного OSP с белком-носителем (CP) с использованием реакции конъюгации карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

с. Очистку конъюгата OSP-белок-носитель с использованием гель-фильтрационной хроматографии или ультрафильтрации, при которой основная масса конъюгата концентрируется, по меньшей мере, в 3 раза и практически все непрореагировавшие соединения, неконъюгированные полисахариды, неконъюгированные белки удаляются с получением очищенной вакцины конъюгата OSP-белок-носитель, где выход конъюгата составляет $\geq 50\%$.

111. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.110, отличающийся тем, что перед конъюгацией OSP подвергают деполимеризации/уменьшению размера с помощью химических средств, выбранных из группы, состоящей из FeCl₃, H₂O₂, метапериодата натрия и ацетата натрия, или механических средств, выбранных из группы, состоящей из разрушения клеток высоким давлением, обработки ультразвуком и гомогенизатора.

112. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.110, отличающийся тем, что очищенный OSP ковалентно связан с белком-носителем (CP) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования выбран из группы: тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP), 1-цианоимидазол (1-CI), 1-цианобензотриазол (1-CBT), тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния ('CDAP'), п-нитрофенилцианат и тетрафторборат N-цианотриэтиламмония ('CTEA') или 2-цианопиридазин-3(2H)он (2-CPO).

113. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.112, где очищенный OSP ковалентно связан с белком-носителем (CP) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагентом цианилирования является тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT), смешанный в соотношении от 1:0,5 до 1:2 по массе OSP:CPPT, и соотношение OSP и белка-носителя может находиться в пределах от 0,5 до 1,5, реакцию проводят при pH в диапазоне от 5 до 7, температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

114. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.п. 112 и 113, отличающийся тем, что перед конъюгацией белок-носитель дериватизируют гетеро- или гомобифункциональным линкером, выбранным из группы, состоящей из гидразина, карбогидразид, хлорид гидразина, дигидразид, ϵ -аминогексановой кислоты, хлоргексанолдиметилацетата, D-глюкуронолактона, цистамина и п-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6-диаминооксигексана или β -пропинамидо, нитрофенилэтиламина, галогеналкилгалогенида, 6-аминокапроновой кислоты с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

115. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.114, отличающийся тем, что перед конъюгацией белок-носитель (CP) дериватизируют линкером дигидразид адипиновой кислоты (ADH) в присутствии карбодиимида, такого как 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDAC), смешанного в соотношении от 1:1 до 1:10 по массе OSP:ADH, и соотношение OSP:EDAC может находиться в пределах от 0,5 до 1,5, продолжительности реакции составляет 1-2 часа, её проводят при pH в диапазоне от 5 до 7 и температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

116. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.110, отличающийся тем, что очищенный OSP ковалентно связан с белком-носителем (C) с использованием реакции конъюгации карбодиимида в присутствии 1-этил-3(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDAC), смешанного в соотношении от 1:0,5 до 1:2 по массе OSP:EDAC, и соотношение полисахарида OSP и белка-носителя может находиться в пределах от 0,5 до 1,5, реакцию проводят при pH в диапазоне от 5 до 7 и температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

117. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.116, отличающийся тем, что перед конъюгацией OSP дериватизируют гетеро- или гомобифункциональным линкером, выбранным из группы, состоящей из гидразина, карбогидразид, хлорид гидразина, дигидразид, ϵ -аминогексановой кислоты, хлоргексанолдиметилацетата, D-глюкуронолактона, цистамина и п-нитрофенилэтиламина, гександиамина, этилендиамина, 1,6-диаминооксигексана или β -пропинамидо, нитрофенилэтиламина, галогеналкилгалогенида, 6-аминокапроновой кислоты с использованием реакции карбодиимида, восстановительного аминирования или цианилирования.

118. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.117, отличающийся тем, что перед конъюгацией OSP дериватизируют линкером дигидразида адипиновой кислоты (ADH) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования выбран из группы: тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP), 1-цианоимидазол (1-CI), 1-цианобензотриазол (1-CBT), тетрафторборат 1-циано-4-(диметиламино)пиридиния ('CDAP'), п-нитрофенилцианат и тетрафторборат N-цианотриэтиламмония ('CTEA') или 2-цианопиридазин-3(2H)он (2-CPO).

119. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п. 118, где перед конъюгацией OSP дериватизируют линкером дигидразида адипиновой кислоты (ADH) с использованием химии конъюгации цианилирования, где реагент цианилирования представляет собой тетрафторборат 1-циано-4-пирролидинопиридиния (CPPT) (CPIP), смешанный в соотношении от 1:1 до 1:10 по массе OSP:ADH, и соотношение OSP:CPPT может находиться в пределах от 0,5 до 1,5, продолжительность реакции составляет 1-2 часа, её проводят при pH в диапазоне от 7 до 10 и температуре в диапазоне от 2°C до 30°C.

120. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.п. 110-119, отличающийся тем, что белок-носитель выбран из группы, включающей в себя столбнячный токсин, столбнячный анатоксин, фрагмент столбнячного токсина, дифтерийный анатоксин, CRM197, анатоксин *Pseudomonas aeruginosa*, анатоксин *Bordetella pertussis*, анатоксин *Clostridium perfringens*, LT *E.coli*, ST *E. coli*, термолabile токсин *Escherichia coli* - субъединица В, комплекс наружной мембраны *Neisseria meningitidis*, gEPA, белок D *H. influenzae*, флагеллин FliC, гемоцианин мечехвоста, экзотоксин А из *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс наружной мембраны с (OMP), порины, трансферрин-связывающие белки, пневмолизин, пневмококковый поверхностный белок А (PspA), пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), пневмококковый PhtD, пневмококковые поверхностные белки BVH-3 и BVH-11, протективный антиген (PA) *Bacillus anthracis* и детоксифицированный фактор отека (EF) и летальный фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овалбумин, гемоцианин лимфы фисуреллы (KLH), сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин (BSA), очищенный белковый дериват туберкулина (PPD), синтетические пептиды, белки теплового шока, белки коклюша, цитокины, лимфокины, гормоны, факторы роста, искусственные белки, содержащие множественные эпитопы CD4+ Т-клеток человека к антигенам различных патогенов, таким как N19, белки захвата железа, токсин А или В из белков *C. difficile* и *S.galactiae* с линкером или без него и их фрагменты, производные, модификации.

121. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.120, отличающийся тем, что белком-носителем является столбнячный анатоксин (TT).

122. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.120, отличающийся тем, что белком-носителем является дифтерийный анатоксин (DT).

123. Способ получения конъюгата сахара *Salmonella enterica* серовар *paratyphi A* с белком-носителем по п.120, отличающийся тем, что белком-носителем является CRM197.

124. Иммуногенная композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенная композиция получена для применения в способе профилактики брюшного тифа, паратифа и нетифоидных инфекций, уменьшения тяжести при возникновении или предотвращения инфекций, вызванных *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* и нетифоидными видами *Salmonella*, способе, включающем в себя введение эффективного количества иммуногенной композиции субъекту-человеку в возрасте 2 лет или младше, подростку, взрослому или пожилому человеку путем парентерального, или подкожного, или внутрикожного, или внутримышечного, или внутрибрюшинного, или внутривенного введения, или инъекционного введения, или пролонгированного высвобождения из имплантатов или введения в виде глазных капель, или назального, или ректального, или буккального, или вагинального, перорального или внутрижелудочного введения, или введения через слизистую оболочку, или перлингвального, альвеолярного или десневого, или обонятельного введения, или введения через слизистую оболочку дыхательных путей, или любыми другими способами иммунизации.

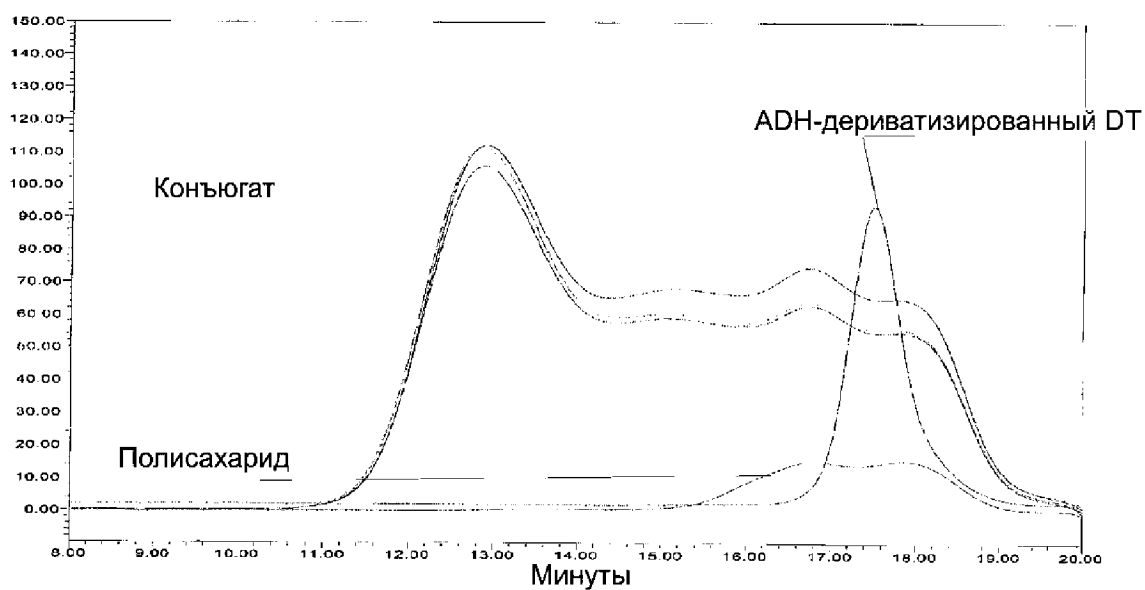
125. Иммуногенная композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенная композиция стабильна при температуре 2-8°C, 25°C и 40°C в течение периода времени продолжительностью шесть месяцев.

126. Иммуногенная композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенная композиция стабильна при температуре 2-8°C, 25°C и 40°C и содержание в ней свободного полисахарида через 6 месяцев составляет не более 7,5% для полисахарида 180-220 кДа, и содержание в ней свободного полисахарида составляет не более 10,5% для полисахарида 388 кДа, 80 кДа и 45 кДа.

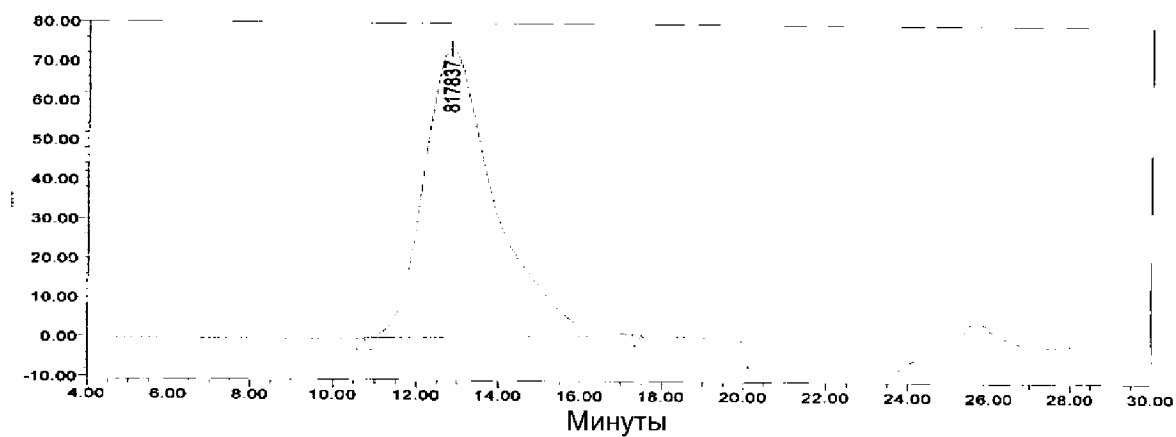
127. Иммуногенная композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенная композиция получена для введения человеку в возрасте 2 лет или младше, подросткам, взрослым или пожилым людям в соответствии с однократным режимом, состоящим из одной дозы указанной вакцинной композиции.

128. Иммуногенная композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенная композиция получена для введения человеку в возрасте 2 лет или младше, подросткам, взрослым или пожилым людям в соответствии с двухкратным режимом, состоящим из первой дозы и второй дозы, которая должна быть введена в период времени от 3 месяцев до 2 лет после первой дозы.

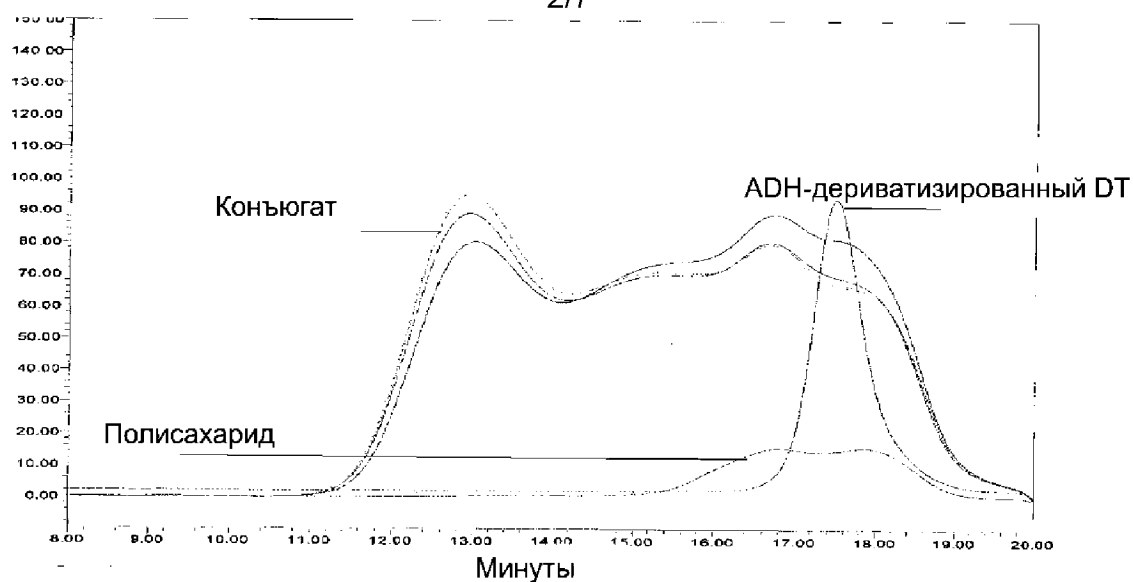
129. Иммуногенная композиция по любому из предшествующих пунктов, где иммуногенная композиция получена для введения человеку в возрасте 2 лет или младше, подросткам, взрослым или пожилым людям в соответствии с трехдозовым режимом, состоящим из первой дозы, второй дозы, которая должна быть введена в период времени от 3 месяцев до 2 лет после первой дозы, и третьей дозы, которая должна быть введена в период времени от 3 месяцев до 2 лет после второй дозы.



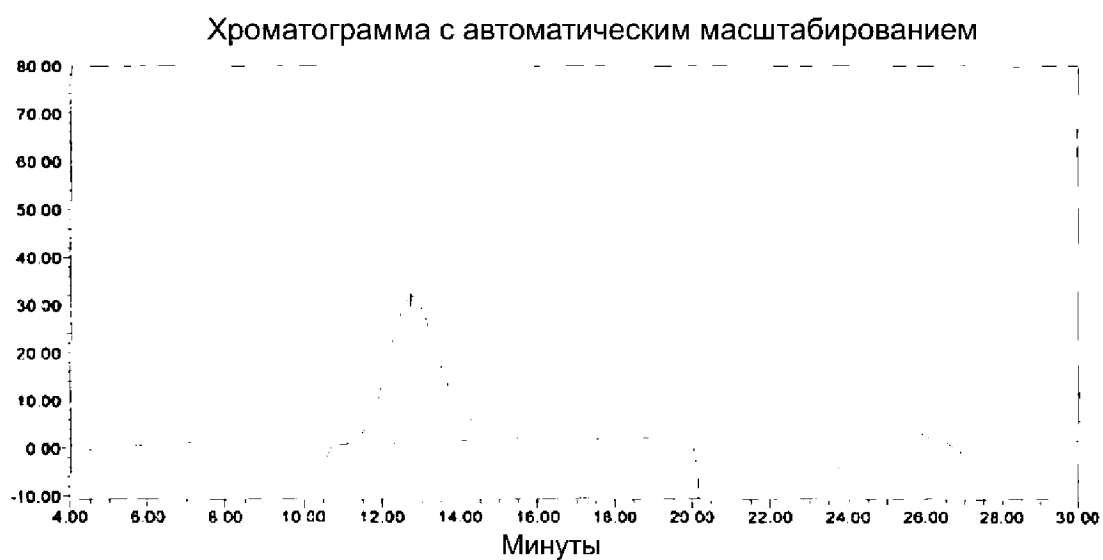
Фиг. 1: Хроматограмма сравнения очищенного полисахарида, белка и хода процесса конъюгации (PS:PR:CPIP - 1:0,8:1,3)



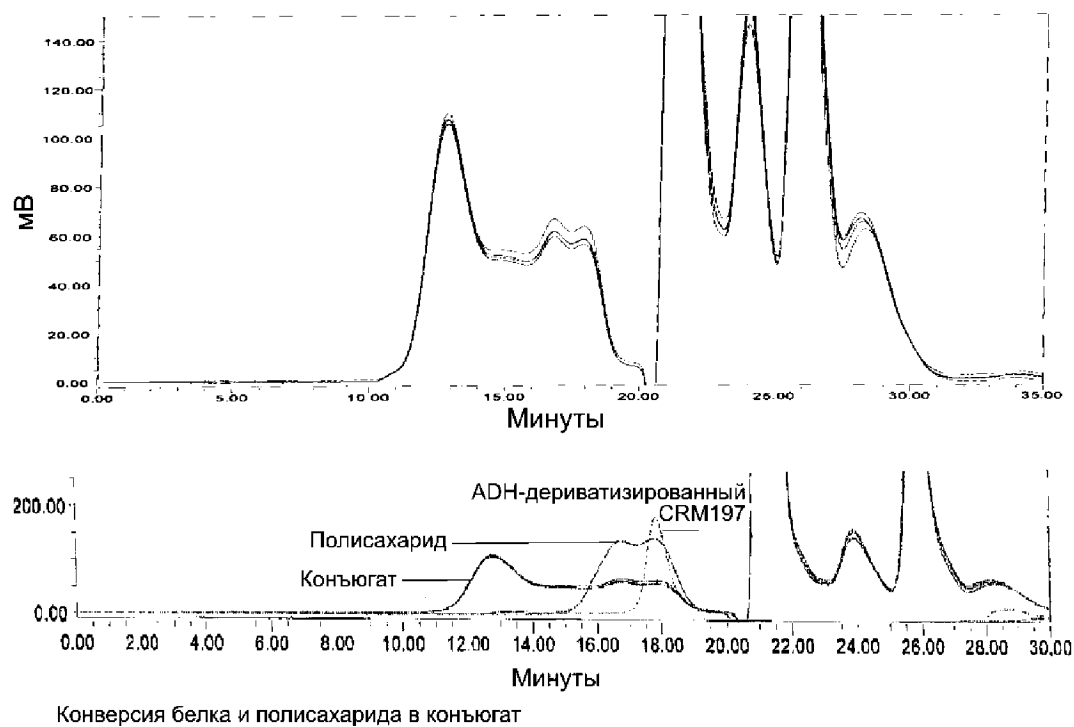
Фиг. 2: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP - 1:0,8:1,3)



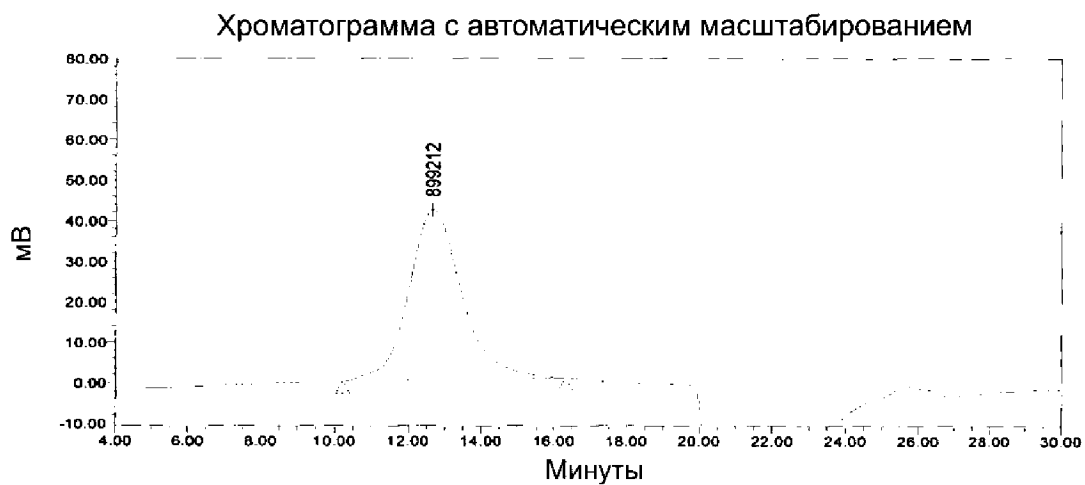
Фиг. 3: Хроматограмма сравнения очищенного полисахарида, белка и хода процесса конъюгации (PS:PR:CPIP - 1:0,8:1,1)



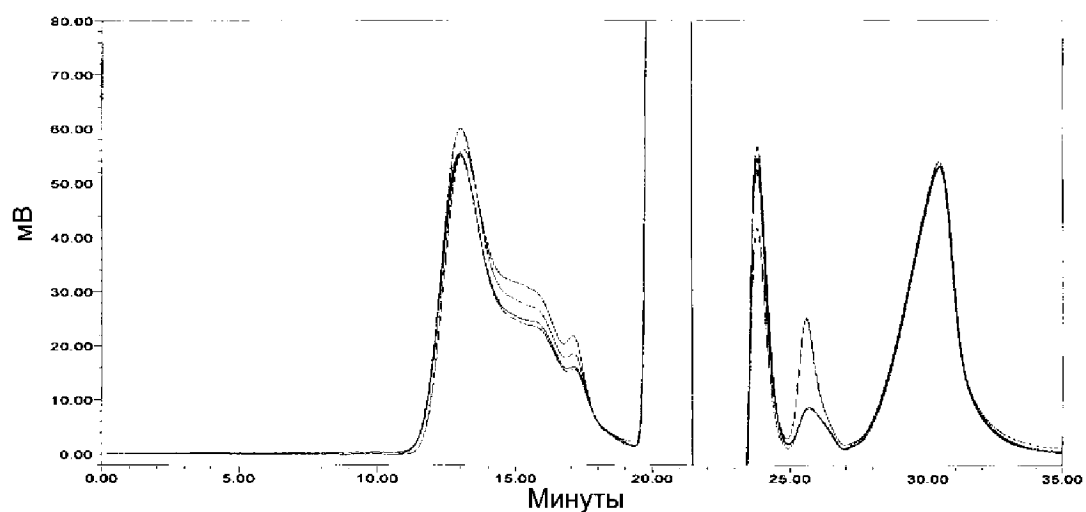
Фиг. 4: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP - 1:0,8:1,1)



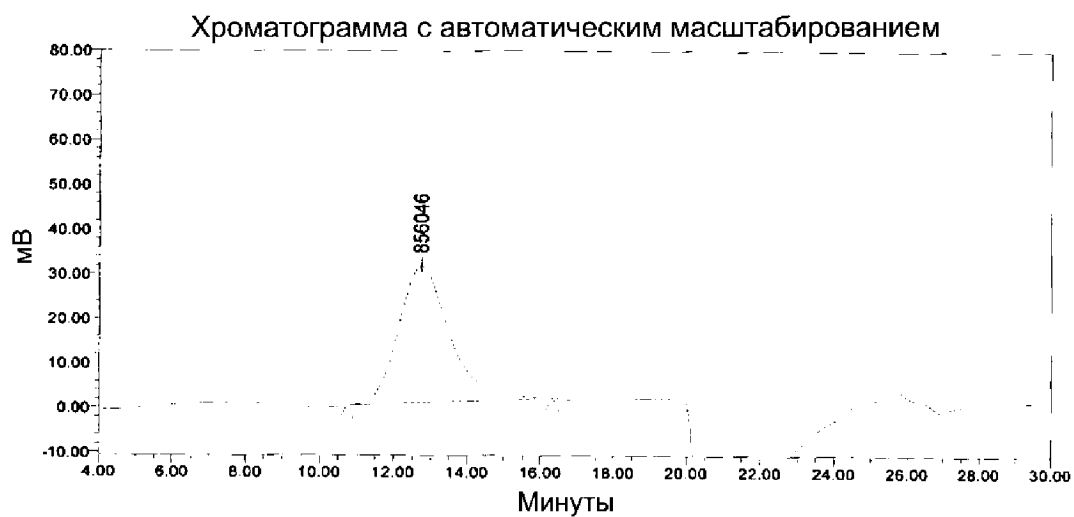
Фиг. 5 и 6: Хроматограмма сравнения очищенного полисахарида, белка и хода процесса конъюгации (PS:PR:CPIP - 1:1:1,3)



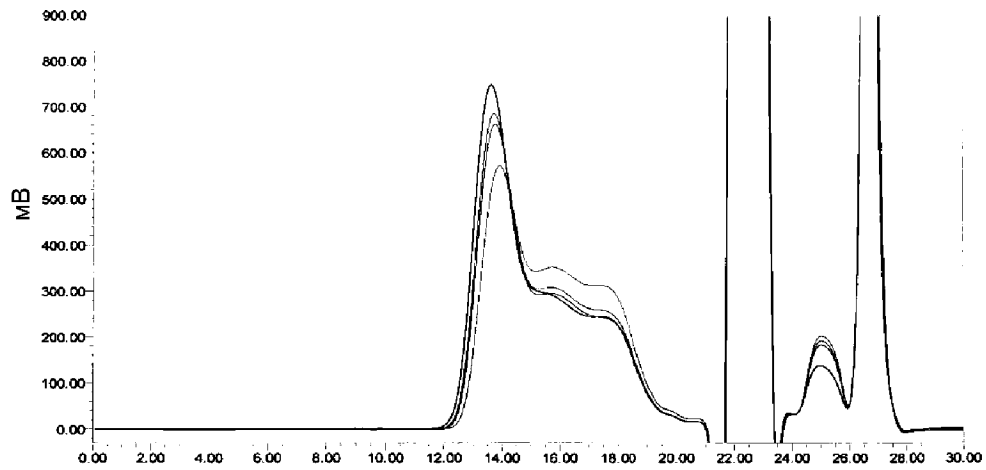
Фиг. 7: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP - 1:1:1,3)



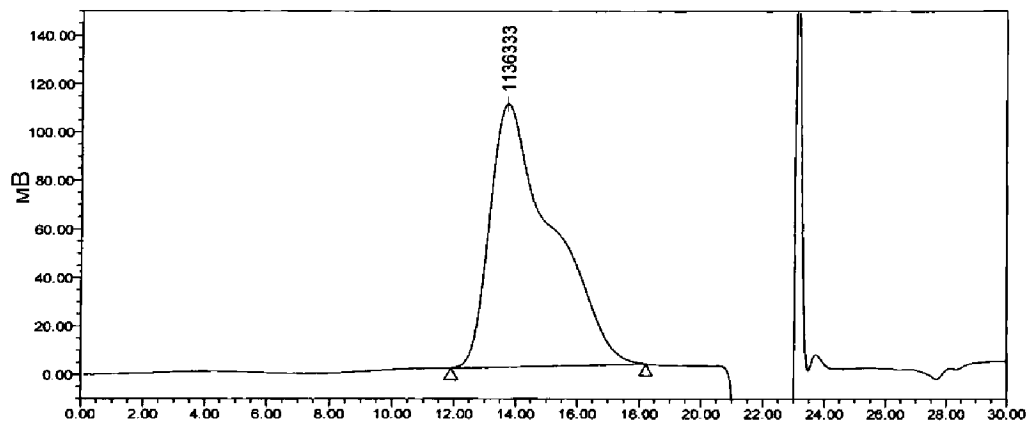
Фиг. 8: Хроматограмма, показывающая ход конъюгации
(PS:PR:CIP - 1:0,8:1,25)



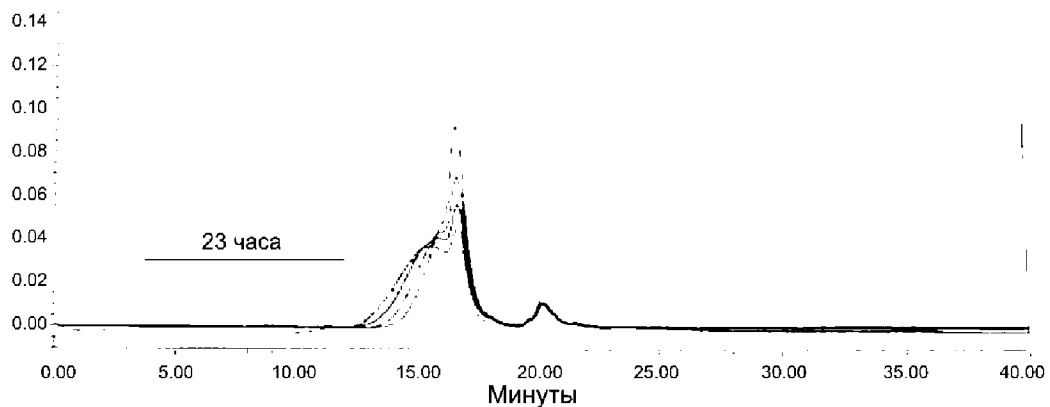
Фиг. 9: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата
OSP-DT ADH (PS:PR:CIP - 1:0,8:1,25)



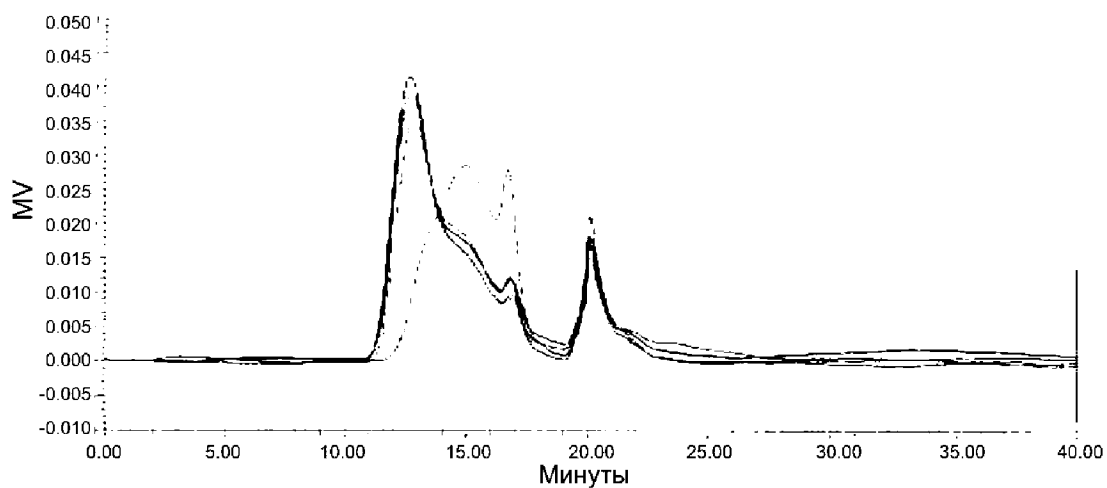
Фиг. 10: Хроматограмма, показывающая ход конъюгации
(PS:PR:CIP - 1:0,9:1,3)



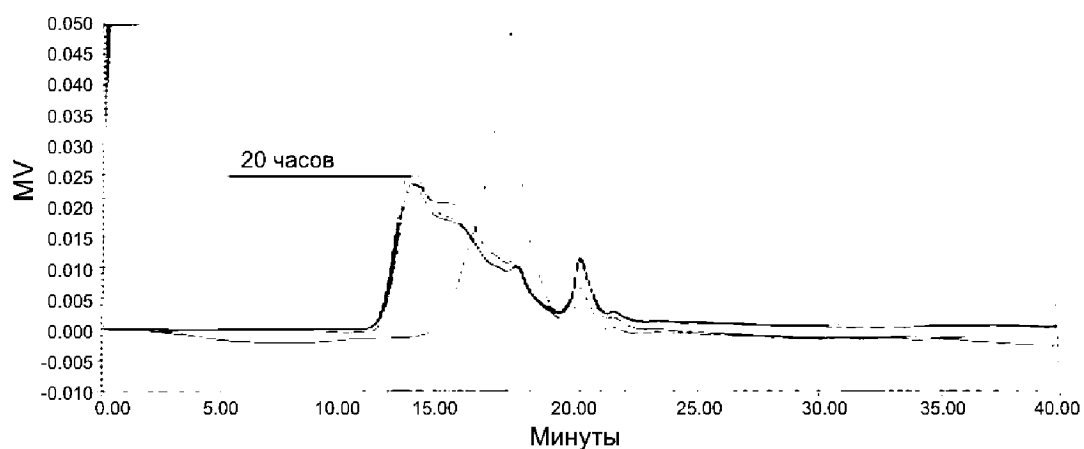
Фиг. 11: Хроматограмма очищенного при помощи ГФХ конъюгата
OSP-DT ADH (PS:PR:CIP - 1:0,9:1,3)



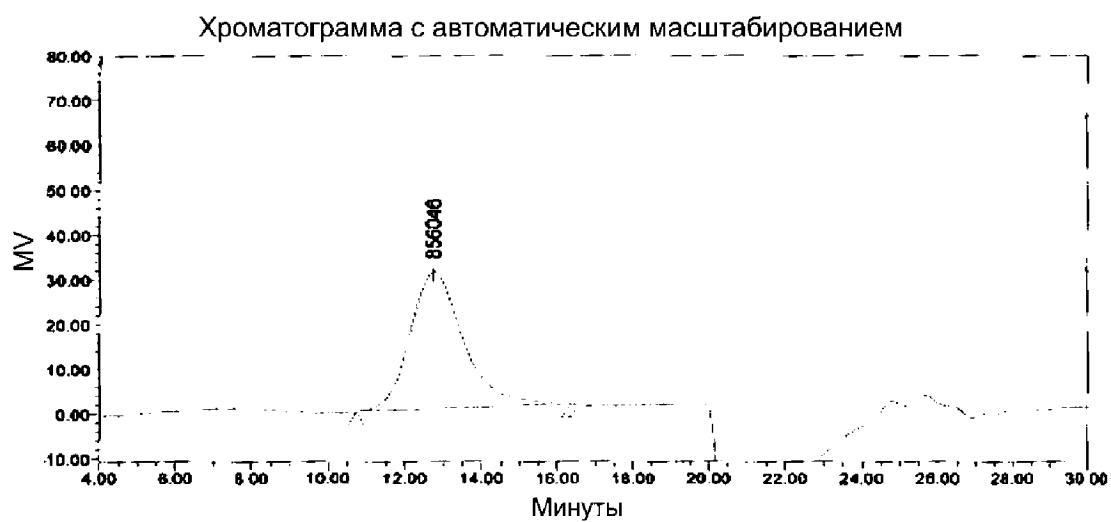
Фиг. 12: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации
(остановка реакции через 23 часа)



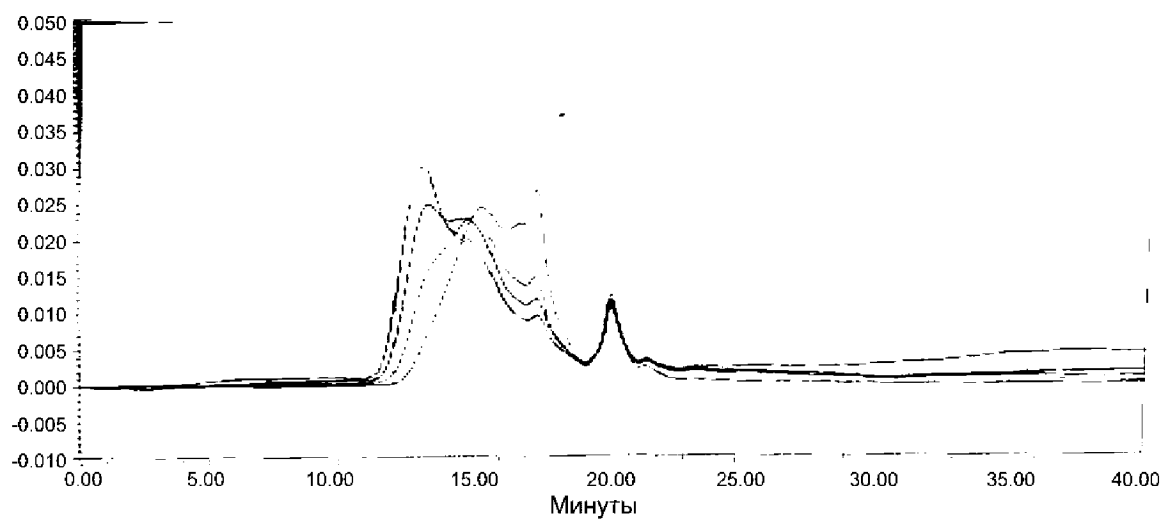
Фиг. 13: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации



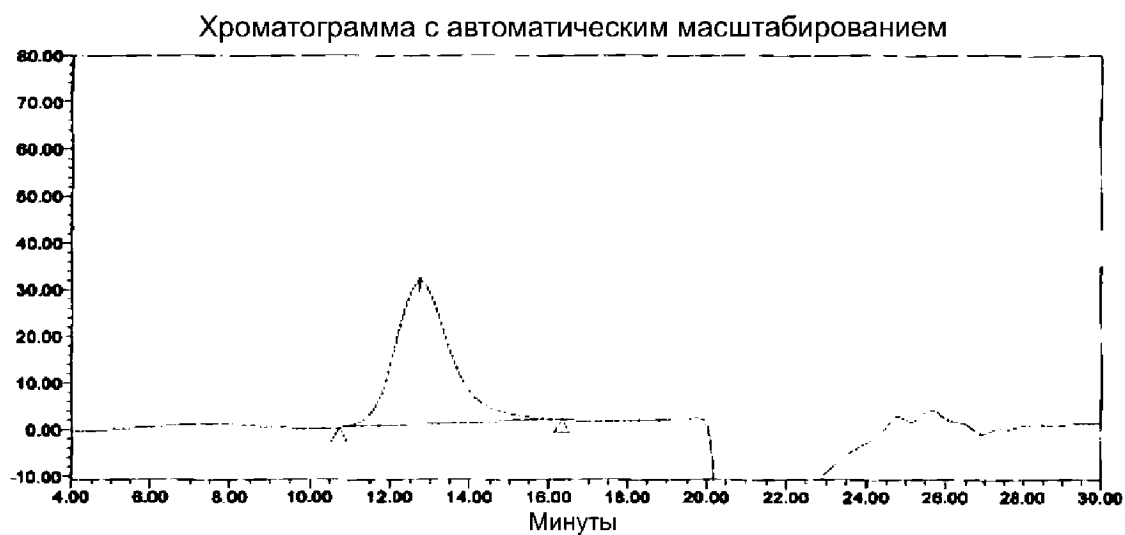
Фиг. 14: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации (остановка реакции через 20 часов)



Фиг. 15: Хроматограмма очищенного конъюгата (объединённые фракции)



Фиг. 16: Хроматограмма, изображающая ход реакции конъюгации (остановка реакции через 4 часа)



Фиг. 17: Хроматограмма очищенного конъюгата