



(19) **UA** (11) **44 688** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 39/29 A, A 61K 39/295 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 94105947, 24.03.1993

(24) Дата начала действия патента: 15.03.2002

(30) Приоритет: 27.03.1992 GB 9206786.7
27.03.1992 GB 9206788.3
27.03.1992 GB 9206789.1
27.03.1992 GB 9206797.4

(46) Дата публикации: 15.03.2002

(86) Заявка РСТ:
РСТ/EP93/00712, 19930324

(72) Изобретатель:

Гарсон-Джонсон Натали Мари-Жозеф Клод, FR,
Хозер Пьер, BE,
Тириар Клотильда, BE,
Вое Пьер, BE

(73) Патентовладелец:

СМИТКЛАЙН БИЧЕМ БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А.,
BE

(54) ВАКЦИННЫЙ ПРЕПАРАТ И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНОГО С ИНФЕКЦИЕЙ ВИРУСА ГЕПАТИТА ИЛИ СКЛОННОГО К ИНФИЦИРОВАНИЮ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА

(57) Реферат:

Предложен вакцинный состав для лечения или профилактики инфекции гепатита, особенно гепатита В, состоящий из антигена гепатита и приемлемого носителя, например алюмината с 3-0-дезацелированным монофосфорил-липидом А. Описаны также комбинированные вакцины, включающие указанный вакцинный состав.

Официальный бюлетьень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 3, 15.03.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **44 688** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 39/29 A, A 61K 39/295**
B

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 94105947, 24.03.1993
(24) Effective date for property rights: 15.03.2002
(30) Priority: 27.03.1992 GB 9206786.7
27.03.1992 GB 9206788.3
27.03.1992 GB 9206789.1
27.03.1992 GB 9206797.4

(46) Publication date: 15.03.2002

(86) PCT application:
PCT/EP93/00712, 19930324

(72) Inventor:
Hanson-Johnson Nathalie Mary-Joseph Clod, FR,
Hoser Pierre, BE,
Tiriar Clotilda, BE,
Voe Pierre, BE

(73) Proprietor:
SMITHKLINE BICHEM BIOLOGICALS C. A., BE

(54) **VACCINE FORMULATION AND METHOD FOR TREATMENT OF PATIENTS INFECTED WITH HEPATITIS VIRUS OR PREDISPOSED TO HEPATITIS INFECTIONS**

(57) Abstract:

A vaccine formulation for the treatment or prophylaxis of hepatitis, especially hepatitis B, infections is provided comprising the hepatitis antigen and a suitable carrier such as alum in combination with 3-O-deacylated monophosphoryl lipid A. Combination vaccines including the

vaccine formulation are also described.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 3, 15.03.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **44 688** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 39/29 A, A 61K 39/295 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
94105947, 24.03.1993

(24) Дата набуття чинності: 15.03.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 27.03.1992 GB 9206786.7
27.03.1992 GB 9206788.3
27.03.1992 GB 9206789.1
27.03.1992 GB 9206797.4

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.03.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
РСТ/EP93/00712, 19930324

(72) Винахідник(и):

Гарсон-Джонсон Наталі Марі-Жозеф Клод, FR,
Хозер П'єр , BE,
Тіріар Клотільда , BE,
Воє П'єр , BE

(73) Власник(и):

СМІТКЛАЙН БІЧЕМ БАЙОЛОДЖІКАЛС С.А., BE

(54) ВАКЦИННИЙ ПРЕПАРАТ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ХВОРОГО З ІНФЕКЦІЄЮ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ АБО
СХИЛЬНОГО ДО ІНФІКУВАННЯ ВІРУСОМ ГЕПАТИТУ

(57) Реферат:

Запропоновано вакцинний препарат для
лікування та профілактики інфекції гепатиту,
особливо гепатиту В. До складу препарату входить
антиген гепатиту та прийнятний носій, зокрема

алюмінат в комбінації з 3-О-дезацильованим
монофосфорил-ліпідом А. Описано також
комбіновані вакцини, що включають вказаний
вакцинний препарат.

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к новым вакцинным препаратам, способам их получения и их применению в медицине. В частности, настоящее изобретение относится к новым препаратам для лечения инфекций гепатита и к комбинированным вакцинным препаратам, включающими компонент вакцины против гепатита.

Вирусный гепатит, вызываемый вирусами гепатита А, В, С, D и Е, является очень распространенным вирусным заболеванием. Что касается вирусов В и С, то при их участии, в частности, во многих случаях развивается рак печени. Таким образом, создание эффективных вакцин имеет важнейшее значение, и несмотря на заметный успех в этой области, тем не менее остается задачей дня. Обзор современных вакцин против гепатита, включающий ряд ключевых ссылок можно найти в статье: *Lancet*, 12-го мая 1990 г., стр. 1142 (Проф. A.L.W.F. Essleston). См. также "Вирусный гепатит и заболевания печени" (Труды Международного симпозиума, 1990 г., ред. I.B. Hollinger, S.M. Lemon, H. Margolis, публикация Вильямс энд Вилкинс).

В применяемом здесь значении выражение "антиген гепатита" относится к любому антигенному материалу, происходящему из вируса гепатита, который может быть использован для создания иммунитета к вирусу у человека. Антиген гепатита может представлять собой, например, полипептид, синтезированный методами биотехнологии, или ослабленный штамм вируса гепатита возможно дезактивированный известными способами. Изобретением охватываются все антигены гепатита, будь то гепатит А, В, С, D и Е, примеры которых приводятся ниже.

Инфицирование вирусом гепатита А (ГАВ) является широко распространенной проблемой, но существуют и вакцины, которые могут быть использованы для массовой иммунизации, например, продукт под названием "Хавтрикс" (СмитКлайн Бичам Байолоджикалс), представляющий собой умерщвленную ослабленную вакцину, полученную из штамма HM-175 ГАВ (см. "Дезактивированные вероятные вакцины против гепатита А", F.E. Andre, A. Hepburn, E.D. Hondt, *Prog. Med. Virol*, 37, стр. 72 - 95 (1990) и монографию о продукте "Хавтрикс", опубликованную компанией СмитКлайн Бичам Байолоджикалс (1991)).

В работе Fleming и др. (местн. ссылка, стр. 56 - 71) сделан обзор клинических аспектов, вирусологии иммунологии и эпидемиологии гепатита А, и рассматриваются пути создания вакцин против этой обычной вирусной инфекции.

В применяемом здесь значении выражение "ГАВ антиген" относится к любому антигену, способному стимулировать в человеческом организме нейтрализацию антител к ГАВ. ГАВ антиген может представлять собой живую ослабленную вирусную частицу или дезактивированную ослабленную вирусную частицу, или может быть, например, ГАВ капсидой или ГАВ вирусным белком, который обычно получают методами биотехнологии.

Инфицирование вирусом гепатита В (ГВВ) является широко распространенной проблемой, но вакцины, которую можно было бы использовать для массовой иммунизации, не создано. В качестве примера можно указать созданный методами биотехнологии продукт под названием "Энджетрикс-Б" (Смит-Клайн Бичам).

Получение поверхностного антигена вируса гепатита В (HbsAg) хорошо документировано. См., например: Harford и др., *Develop. Biol. Standard* 54, стр. 125 (1983), Greog и др., *Biotechnology*, 5, стр. 479 (1987), EP-A-0 226 846, EP-A-0 299 108 и ссылки в этих публикациях.

В применяемом здесь значении выражение "поверхностный антиген вируса гепатита В" или "HBsAg" включает любой антиген HBsAg или его фрагмент, проявляющие антигенность поверхностного антигена ГВВ. Необходимой указать, что помимо последовательности из 226 аминокислот HBsAg S антигена (см. Tiollais и др., *Nature*, 317, 489 (1985) и прилагаемые к работе ссылки) HbsAg, упоминаемый здесь, может при желании содержать всю или часть предпоследовательности, описанной в вышеприведенных ссылках и в EP-A-0 278 940. В частности HBsAg может представлять собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, включающей остатки 12 - 52, за которыми следуют остатки 133 - 145 и затем остатки 175 - 400 L-белка HBsAg относительно открытой рамки считывания вируса гепатита В ad серотипа (данный полипептид получил обозначение L*, см. EP 0 414 374). HBsAg в объеме изобретения может включать также предS1-предS2-S полипептид, описанный в EP 0 198 474 (Endotronics) или его аналоги, например, аналоги, описанные в EP 0 304 578 (Mc Cormick и Jones). Упоминаемый здесь HBsAg может также относиться к мутантам, такому как например, "ускользнувший" мутант, раскрытый в WO 91/14703 или заявке на Европейский патент, № публикации 0 511 855 A1, особенно HBsAg, в котором замещение аминокислоты в положении 145 представлено заменой глицина на аргинин.

Обычно HBsAg имеет вид частицы. Частицы могут состоять, например, из одного только 3 белка или это могут быть, составные частицы, например (L*, S), где L* принимает вышеуказанные значения и S представляет S-белок HbsAg. Указанная частица предпочтительно имеет ту форму, в которой она экспрессируется в дрожжах.

Вирус гепатита С (ГСВ) подробно рассмотрен в GB 2 212 511B и приведенных в нем ссылках. Указано, что вакцины могут быть получены из одного или нескольких иммуногенных полипептидов, происходящих из ГСВ кДНК.

Вирус гепатита D обсуждается в издании "Вирусный гепатит и заболевания печени" (Симпозиум 1990 г. (см. выше)).

Вирус гепатита Е (ГЕВ) подробно рассмотрен в WO 89/12462 и приведенных в нем ссылках. Пример вакцинного препарата включает рекомбинантный белок или белковую смесь, происходящую из ГЕВ, в фармакологически приемлемом адьюванте.

Хотя экспериментальные и промышленные вакцины гепатита, например: Хаврикс и Энгерикс-Б дают прекрасные результаты, общепризнанный факт, что нужна оптимальная вакцина, которая не только стимулировала нейтрализующие антитела, но также возможно более эффективно стимулировала клеточную

иммунность, передаваемую через Т-клетки. Кроме того существует необходимость в комбинированных вакцинах, содержащих гепатитный компонент, предназначенный стимулировать указанным путем клеточную иммунность. Настоящим изобретением указанные цели достигаются.

Настоящим изобретением дается вакцина, содержащая антиген гепатита в сочетании с 3-0-дезацелированным монофосфориллипидом А (сокращенно МФЛ) и приемлемым носителем.

3-0-Дезацелированный монофосфорил-липид А (или 3-дез-0-ацелированный монофосфорил-липид А) ранее обозначался, как 3Д-МФЛ или д3-МФЛ для указания на то, что положение 3 восстанавливающего конца дез-0-ацелировано. Его получение см. GB 2 220 211 А. С химической точки зрения он представляет собой смесь 3-дезацелированного монофосфорил-липид А с 4, 5 или 6 ацелированными цепями. В данном описании обозначение, 3Д-МФЛ (или д3-МФЛ) сокращенно до МФЛ, поскольку МФЛ ("MPL") - это зарегистрированное фирменное наименование для выпускаемого фирмой Рибиди Иммунокем., Монтана в качестве готового продукта 3-0-дезацелированного Монофосфорил-липид А.

В GB 2 220 211А упоминается, что эндотоксичность ранее применяемых энтеробактериальных липополисахаридов (ЛПС) уменьшается с сохранением при этом иммуногенных свойств. Однако, в GB 2 220 211 эти открытия указаны всего лишь в связи с бактериальными (грам-отрицательными) системами. Ко времени даты приоритета данного изобретения применение 3-дезацелированного монофосфорил-липид А в качестве адьюванта для вакцины, содержащей вирусный антиген гепатита, и не предполагалось.

Однако, неожиданно было обнаружено, что вакцинные препараты изобретения, содержащие вирусные антигены гепатита, обладают особыми преимуществами, как будет показано ниже.

Их главное преимущество состоит в том, что вакцинные составы изобретения очень эффективны в создании защитной иммунности даже при очень низких дозах антигена.

Составы создают прекрасную защиту против первичной инфекции и с успехом стимулируют как специфичную гуморальную (нейтрализующие антитела), так и передаваемую эффекторными клетками (DTH) иммунные реакции.

Еще одно важное, преимущество состоит в том, что вакцинные препараты изобретения могут быть также использованы и в качестве лечебных вакцин.

Вышеуказанный МФЛ обычно присутствует в интервале концентраций 10 - 100уг, предпочтительно 25 - 50уг с одновременным присутствием антигена гепатита в интервале 2 - 50уг на дозу.

Носителем может служить эмульсия типа масло в воде, липидный носитель или алюминат (соль алюминия).

Неядовитые эмульсии, типа масло в воде предпочтительно содержат неядовитое масло, напр., сквален и эмульгатор, например, Твин 80 в водной среде. Водная среда может представлять собой, например, фосфатный буферный солевой раствор.

Одно из воплощений изобретения представлено ТАВ антигеном (например, таким, как в Хавриксе) в смеси с МФЛ и гидроксидом алюминия (см. ниже).

Еще одно воплощение изобретения, описанное ниже, представлено HBSAg S антигеном (например, таким, как в Энгериксе-Б) в смеси с МФЛ и гидроксидом алюминия.

Другое характерное воплощение изобретения представлено HBSAg антигеном в виде (L*, S) частиц (определение см. выше) в смеси с МФЛ и гидроксидом алюминия.

В вышеприведенных воплощениях эмульсия типа масло в воде может быть использована вместо алюмината.

Другие воплощения изобретения показаны в нижеследующих примерах.

Изобретением в своем дополнительном аспекте дается вакцинный состав, описанный выше и предназначенный для применения в медицине, в частности, для лечения или профилактики инфицирования вирусом гепатита. В рекомендуемом аспекте изобретения вакцина изобретения является лечебной вакциной, применимой для лечения текущей инфекции гепатита, особенно в случае людей, страдающих инфицированным гепатитом В и/или гепатитом С.

В свете полученных удивительно эффективных результатов еще одним своим рекомендуемым аспектом изобретением дается вакцинный препарат для лечения или профилактики инфицирования гепатитом и/или гепатитом В.

Предпочтительно вакцинный препарат гепатита изобретения содержит другие антигены с тем, чтобы быть эффективным для лечения или профилактики одной или нескольких бактериальных, вирусных или грибковых инфекций.

Соответственно изобретенный вакцинный препарат изобретения предпочтительно содержит хотя бы один другой компонент, выбранный из негепатитных антигенов, для которого известна способность обеспечивать защиту против одного или нескольких следующих заболеваний: дифтерии, коклюша, столбняка, Гемофильного гриппа В (Ггв) и полиомиелита.

Рекомендуется, чтобы изобретенная вакцина включала вышеохарактеризованный HBsAg.

Конкретные комбинированные вакцины, охватываемые объемом изобретения, включают ДСК (дифтерия-столбняк-коклюш)-гепатит. В комбинированный вакцинный состав, Ггв-гепатит В вакцинный препарат, ДСК-Ггв-гепатит В вакцинный состав и ИВП (инактивированная вакцина полиомиелита)-ДСК-Ггв-гепатит В вакцинный состав.

Вышеприведенные комбинации могут с успехом включать компонент; обеспечивающий защиту против

гепатита А, особенно умерщвленный ослабленный штамм, происходящий из НМ-175 штамма, такого, как присутствующий в Хавриксе.

Приемлемые для применения в таких вакцинах компоненты уже выпускаются промышленностью, и касающиеся их подробности могут быть получены во Всемирной Организации Здравоохранения. К примеру, ИВП компонентом может служить инактивированная вакцина полиомиелита Сальк. Вакцина коклюша может состоять из целых клеток или бесклеточного продукта.

Вакцина гепатита или комбинированная вакцина изобретения предпочтительно является педиатрической вакциной.

Вакцинные препараты в целом описаны в издании "Новые направления в создании вакцин", под ред. Voller и др., Университет Парк Пресс, Балтимор, Мериленд, США, 1978. Капсулирование в липосомы описано, например, Fullerton, патент США 4,235,877. Конъюгирование белков с макромолекулами, раскрыто, например: Likhite, патент США 4,372,945 и Armo и др., патент США 4,474,757.

Количество антигена в каждой дозе: вакцины подбирают такое, чтобы это было количество, индуцирующее иммунозащитную реакцию без заметных нежелательных побочных эффектов типичных вакцин. Такое количество будет меняться в зависимости от применяемых специфических иммуногенов. Как правило, ожидается, что каждая доза будет содержать 1 - 1000 μ г общего иммуногена, предпочтительно 2 - 100 μ г, наиболее предпочтительно 4 - 40 μ г. Оптимальное количество для конкретной вакцины может быть выявлено стандартными исследованиями, включающими определение титров антител и других реакций у субъектов. После начальной вакцинации субъекты примерно через 4 недели могут быть подвергнуты бустерному инъектированию.

В своем дополнительном аспекте настоящим изобретением дается способ изготовления вакцины, обладающей эффективностью в предотвращении или лечении инфекции гепатита. Способ состоит в смешивании антигена гепатита (определение см. выше) с МФЛ и носителем.

Применением данного способа рекомендуется смешивать с HBsAg один или несколько дополнительных компонентов с получением комбинированной вакцины, предпочтительно применяемой в педиатрии.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение и его преимущества.

Пример 1. Вакцинный состав против гепатита В

МФЛ получен от фирмы Риби Иммунокем. Рисерч Инк. Гидроксид алюминия получен от фирмы Суперфос (Альгидрогель).

МФЛ суспендируют в воде для инъекций до концентрации в интервале 0,2 - 1 μ г/мл путем обработки ультразвуком на водяной бане, пока размер частиц не достигнет 80 - 500 μ м, при определении фотокорреляцией светорассеивания.

HBsAg (S-антиген такой, как в Энгериксе-Б, 1 - 20 μ г) в фосфатном буферном солевом растворе (1 μ г/мл) адсорбируют на 30 - 100 μ г гидроксида алюминия (раствор с концентрацией Al^{3+} 10,38 μ г/мл) перемешиванием один час при комнатной температуре. Затем к раствору добавляют 30 - 50 μ г ДМФЛ (концентрация раствора 1 μ г/мл). Объем и осмолярность устанавливают до 600 μ л добавлением воды для инъекций и фосфатного буфера в 5х концентрации. Раствор выдерживают один час при комнатной температуре и хранят при 4°C до момента применения. Созревание состава происходит в ходе хранения. В результате получают 10 доз для инъекций, предназначенных для испытания на мышах.

Аналогичный состав может быть получен применением в качестве HBsAg компонента составного (L*, S) антигена, охарактеризованного выше.

Пример 2. Вакцинный состав против гепатита А

МФЛ получен от фирмы Риби Иммунокем. Рисерч Инк. Гидроксид алюминия получен от фирмы Суперфос (Альгидрогель).

ГАВ (360-22 ЭЕ на дозу) предварительно адсорбируют на 10% гидроксида алюминия до конечной концентрации 0,5 μ г/мл, Затем к раствору добавляют МФЛ (12,5 - 100 μ г на дозу).

К раствору добавляют остальное количество гидроксида алюминия и оставляют на один час при комнатной температуре. Объем устанавливают добавлением фосфатного буфера (фосфат 10 μ М, NaCl 150 μ М) и конечный состав хранят при 4°C до момента применения.

Пример 3. Комбинированный вакцинный состав: гепатит В + гепатит А

HBsAg адсорбируют на 90% конечного количества гидроксида алюминия (0,5 μ г/мл) и выдерживают в течение ночи при комнатной температуре. Устанавливают pH 6,2 и препарат оставляют на 14 дней при комнатной температуре для вызревания.

Антиген гепатита А (360-22 ЭЕ на дозу) в виде инактивированного производного штамма НМ-175 (как в Хавриксе) предварительно адсорбируют на 10% гидроксида алюминия с конечной концентрацией 0,5 μ г/мл. Затем к раствору добавляют остальное количество гидроксида и перемешивают один час при комнатной температуре.

После этого к составу HBsAg добавляют адсорбированный на гидроксида алюминия. ГАВ.

К раствору ГАВ - HBsAg добавляют МФЛ при конечной концентрации 12,5 - 100 μ г на 1мл дозы, объем доводят до конечного объема дозы и состав хранят при 4°C до момента применения.

Пример 4. Комбинированные вакцины, содержащие дополнительные антигены

Комбинированные вакцины, содержащие ДСК, ИВП, Ггв, бесклеточных или полноклеточных антигенов коклюша, получают добавлением одного или нескольких целевых антигенов к составам, описанным в вышеприведенных примере 1, примере 2 или примере 3.

Пример 5

Повышение гуморальной иммунности и индуцирование передаваемой клетками иммунности иммунизацией мышей HBsAg в составах с гидроксидом алюминия и МФЛ

А. Влияние $Al(OH)_3$ + МФЛ на индуцирование анти-гв антител

Мышей линии Balb/c иммунизируют подкожно или внутривенно, рекомбинантным HBsAg, адсорбированным на $Al(OH)_3$ с МФЛ в качестве адъюванта. Мышей иммунизируют дважды HBsAg/ $Al(OH)_3$ составами и реакцию антител определяют после введения первой и второй доз. Общий Иг определяют методом ФИСА (ELISA) или применением набора AUSAB (Аббот Лаб., ИЛ.), при этом особое внимание обращают на индуцирование антител ИгГ2а изотипа, поскольку данный изотип в основном индуцируется секретированием г-интерферона. Таким образом, индуцирование данного изотипа косвенно отражает активацию передаваемого клетками иммунитета, а именно, активацию Тк1.

Определяют отношение HBsAg/МФЛ, а также размер частиц МФЛ, поскольку суспендирование МФЛ может привести к частицам размером $< 100nm$ или $> 500nm$.

ОПЫТ 1. Влияние дозы МФЛ ($> 500nm$) на иммуногенность рек. HBsAg, адсорбированного на $Al(OH)_3$

Группам из 10 самок Balb/c мышей инъектируют подкожно 2,5мкг рек. HBsAg, адсорбированного на 50мкг $Al+++$ (в виде $Al(OH)_3$), и возрастающими количествами МФЛ (3,1 - 50мкг) с размером частиц $> 500nm$. Мышей инъектируют дважды в объеме 100мкл и с интервалом в 2 недели. Мышам пускают кровь через 2 недели после первой инъекции (частичное кровопускание;) и через неделю после бустерной инъекции. Методом ФИСА определяют общий анти-ГВ ИгГ и специфичный ИгГ2а применением рек. HBsAg в качестве антигена захвата. Титры выражают в виде обратной величины разбавления, соответствующего 50% максимальной величины (разбавление в средней точке). Полученные результаты приведены в таблице 1. Результаты указывают на повышение как ИгГ, так и ИгГ2а с ростом доз МФЛ, особенно для доз в интервале 12,5 - 50мкг. Это влияние показано и для первичной, и для вторичной реакций и особенно очевидно; в случае ИгГ2а (вплоть до 20-тикратного повышения), что косвенно указывает на секретирование г-интерферона, индуцируемое иммунизацией МФЛ.

ОПЫТ II. Сравнение клинических лотов адсорбированного рек. HBsAg, содержащего или не содержащего МФЛ ($> 500nm$)

Получено 3 клинических лота, рек. HBsAg адсорбированного на $Al(OH)_3$: лот DSAH16 не содержал МФЛ и служил в качестве контроля. Лоты DSAR501 и 502 получены одинаковым путем (20мкг рек. HBsAg, адсорбированного на 0,5мг $Al+++$ в виде $Al(OH)_3$), но содержат 50мкг МФЛ ($> 500nm$).

Три лота инъектируют подкожно в группах из 10 мышей (200мкл, содержащих 2,5мкг HBsAg, 100мкг $Al+++$ и 6,25мкг МФЛ) дважды с интервалом в 2 недели. Кровь у мышей берут на 14-ый день и неделю спустя после бустерной инъекции. Анти-ГВ антитела определяют либо для ИгГ, либо для ИгГ2а применением набора AUSAB или самодельного ФИСА. Полученные результаты приведены в таблице 2. Результаты показывают, что 2 недели спустя после первой инъекции два содержащих МФЛ лота индуцируют весьма существенную анти-ГВ реакцию (12,4 и 41,9мИЕ/мл), в то время как не содержащий МФЛ лот индуцирует всего лишь маргинальную реакцию. (0,75мИЕ/мл). Число мышей, показывающих результаты, также более высоко в случае МФЛ (9/10 и 9/10 против 1/10 в отсутствие МФЛ). Действие МФЛ подтверждена после бустерной инъекции, поскольку титры, полученные для лотов DSAR501 и 502, были в 6 раз выше, чем наблюдаемые без МФЛ.

Результаты показывают, что по меньшей мере, для мышей МФЛ ($> 500nm$) способен улучшить как кинетику анти-ГВ реакции, так и уровень анти-ГВ реакции.

Полученные результаты определением специфичных ИгГ и ИгГ2а после иммунизации лотами DSAH16 (без МФЛ) и DSAR502 (с МФЛ): титр анти-ГВ ИгГ в 5 раз (первичная реакция) и 3 раза (вторичная реакция) выше в случае присутствия МФЛ.

Что касается ИгГ2а реакции, то действие МФЛ еще более поразительно, по крайней мере после второй дозы, указывая на преимущественное индуцирование ИгГ2а. Это косвенно отражает активацию передаваемого, клетками иммунитета (секретирование г-интерферона) содержащим МФЛ препаратом.

ОПЫТ III. Действие дозы МФЛ ($< 100nm$) на иммуногенность рек. HBsAg адсорбированного на $Al(OH)_3$

Поскольку МФЛ гораздо проще получить в воспроизводимом режиме в виде частиц размером $< 100nm$, а не частиц размером $> 500nm$, исследовано влияние частиц МФЛ размером $< 100nm$ на иммуногенность рек. HBsAg, предварительно адсорбированного на $Al(OH)_3$.

Группы из 10 мышей (Balb/c, самки, возраст 7 недель) инъектируют подкожно 1мкг рек. HBsAg адсорбированного на 50мкг $Al+++$ (в виде $Al(OH)_3$), и в присутствии увеличивающихся количеств (3,1 - 25мкг) МФЛ ($< 100nm$). Мышей инъектируют дважды с интервалом в 2 недели и в объеме 200мкл. Кровь у мышей берут через 2 недели после первой инъекции и неделю спустя после бустерной инъекции. Анти-ГВ реакцию выявляют методом ФИСА (общий Иг, ИгГ, ИгГ2а) на объединенной сыворотке. Титры выражают в виде разбавлений в средних точках (обратная величина разбавления, дающего 50% от наивысших величин). Полученные результаты показывают, что уже 3,1мкг МФЛ индуцируют сильное повышение реакции, как в случае первичной реакции, так и в случае вторичной реакции. Максимум реакции наблюдается при дозе 6,25мкг, после чего понижается и становится равной реакции без МФЛ при более высоких применяемых дозах МФЛ (25мкг).

Характер реакции антител аналогичен для ИгГ, ИгГ2а и общего Иг. В этом отличие от результатов, полученных для МФЛ с большим размером частиц (7500nm) (см. опыт 1), и это наталкивает на мысль о том, что МФЛ с меньшим размером частиц ($< 100nm$) более эффективен, чем МФЛ с более крупными частицами ($> 500nm$) (по меньшей мере для гуморального иммунитета), поскольку для достижения максимального эффекта требуется меньше МФЛ. Наивысшая активность МФЛ с меньшим размером частиц подтверждена в нескольких экспериментах.

Как показано для частиц МФЛ большего размера ($> 500\text{nm}$), действие МФЛ в качестве адъюванта более эффективно для ИГ2а, чем для общего Иг и ИГ. При максимальном проявлении вторичной реакции (6,25мкг МФЛ) наблюдается 25-тикратное повышение ИГ2а, в то время как повышение для ИГ и для общего Иг составляет соответственно 7,6 и 4,3 раза.

В. Индуцирование передаваемого клетками иммунитета рек. HBsAg, адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$, влияние МФЛ

Если гуморальный иммунитет достаточен для защиты от гепатита В, то индуцирование передаваемого клетками иммунитета (CTL, Th1) может быть особо важно для лечения болезни.

Поэтому требуется новые составы для лечебных вакцин, поскольку $\text{Al}(\text{OH})_3$ способен улучшить гуморальный иммунитет, но не передаваемый через клетки иммунитета.

Нами исследовано влияние МФЛ на индуцирование Th1 клеток, способных секретировать ИЛ-2 и г-(т.е. гамма) интерферон у Balb/c мышей, иммунизированных адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ рек. HBsAg.

ОПЫТ 1. Влияние МФЛ ($> 500\text{nm}$) на индуцирование Th1 клеток после иммунизации Balb/c мышей адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ HBsAg.

Группу из 10 Balb/c мышей (самки, возраст 5 недель) иммунизируют инъекций в подошвы каждой лапки 30мкл, содержащих 10мкг HBsAg, 15мкг Al^{+++} (в виде $\text{Al}(\text{OH})_3$) и 15мкг МФЛ. Контрольных мышей инъектируют аналогично тем же количеством рек. HBsAg, смешанным либо с ПАФ (положительный контроль), либо адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ без МФЛ (отрицательный контроль).

Через шесть дней после иммунизации мышей убивают и у них удаляют подколенные лимфатические узлы. Клетки лимфатических узлов (КЛУ, 2105клеток/мл) культивируют различное время (от 24 часов до 74 часов) в RPMI среде с добавкой 1% отрицательной мышиной сыворотки и содержащей 5мкг/мл рек. HBsAg. После прекращения культивирования определяют количество секретируемых в среду ИЛ-2, ИНФ-г и ИЛ-4, ИЛ-2 выявляют по его способности стимулировать пролиферацию (устанавливают введением 3Н-тимидина) ИЛ-2-зависимой CTL линии (VDA2 клетки) и титр выражают в виде индекса стимулирования (ИС = количеству 3Н-тимидина, введенного в стимулированные клетки/количество 3Н-тимидина, введенного в нестимулированные клетки). Количества ИЛ-4 и ИНФ-г определяют промышленных ФИСА наборов (Холланд Биотекнологии для ИНФ-г и Эндоген для ИЛ-4). Титры выражают в пг ИНФ-г/мл.

Полученные результаты показывают, что ИЛ-2, ИЛ-4 или ИНФ-г не секретируются в заметных количествах КЛУ от мышей, иммунизированных адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ HBsAg. Напротив, отмечен высокий уровень секреции ИЛ-2 (ИС = 38 за 48ч) и значительные количества ИНФ-г КЛУ от мышей, иммунизированных HBsAg, адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ + МФЛ. Секретирование аналогично (ИНФ-г) или выше (ИЛ-2) в сравнении с наблюдаемым для мышей, иммунизированных HBsAg + ПАФ, и секретирование *in vitro* происходит раньше.

Никакого ИЛ-4 не обнаружено после иммунизации HBsAg, адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$, даже в присутствии МФЛ.

Такой характер секретирования указывает, что специфичные Th1 клетки (ИЛ-2, ИНФ-г) индуцируются иммунизацией адсорбированным HBsAg в присутствии МФЛ, но не в отсутствие МФЛ. Тем не менее в данных условиях иммунизации никаких Th2 клеток (ИЛ-4) не обнаружено.

ОПЫТ 11. Влияние дозы МФЛ ($< 100\text{nm}$) на индуцирование Th1 клеток после иммунизации Balb/c мышей адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$ рек. HBsAg

Группы из 5 Balb/c мышей иммунизируют инъекций в подошвы каждой из 2 лапок 30мкл, содержащих 10мкг рек. HBsAg, адсорбированного на 15мкг Al^{+++} (в виде $\text{Al}(\text{OH})_3$), и возрастающие количества МФЛ (100нм, 0 - 15мкг).

Через шесть дней после инъектирования и подколенные клетки лимфатических узлов (КЛУ) культивируют в концентрации 2106клеток/мл в RPMI среде с добавкой 1% отрицательной мышиной сыворотки, культивирование ведут различное время (от 24 часов до 96 часов) в присутствии 5мкг/мл рек. HBsAg.

Секретирование ИЛ-2 определяют стимулированием пролиферации VDA2 клеток и концентрацию ИЛ-2 выражают в виде индекса стимулирования (ИС); секретирование ИНФ-г определяют с помощью промышленного набора и выражают в пг/мл.

Обнаружено, что секретирование ИЛ-2 резко возрастает при самой низкой дозе МФЛ (7,5мкг), и максимальный эффект достигается при 15мкг МФЛ.

Секретирование ИЛ-2 в целом более важно через 24ч, чем через 48ч или 72ч.

Секретирования ИНФ-г не происходит, если HBsAg адсорбирован на $\text{Al}(\text{OH})_3$ в отсутствие МФЛ. Небольшая доза МФЛ (7,5мкг) индуцирует секретирование ИНФ-г, и в этом случае максимальный эффект достигается при 15мкг МФЛ. В отличие от результатов, наблюдаемых для ИЛ-2, секретирование ИНФ-г замедлено и возрастает со временем вплоть до 96 часов.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что МФЛ (100нм) является эффективным индуктором Th1 клеток в сочетании с HBsAg, адсорбированным на $\text{Al}(\text{OH})_3$.

С. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано действие состава, содержащего HBsAg, адсорбированного на $\text{Al}(\text{OH})_3$, и МФЛ, как на гуморальный, так и передаваемый клетками иммунитет у Balb/c мышей. Результаты показывают, что МФЛ явно улучшает кинетику анти-ГВ реакции, поскольку после как первичной, так и вторичной иммунизации наблюдается гораздо больше анти-ГВ антител. Меняется также и качество антител и наблюдается преимущественное индуцирование ИГ2а, косвенно отражающего секретирование ИНФ-г, т.е. индуцирование передаваемого клетками иммунитета.

Прямое исследование индцирования Th1 клеток составами, содержащими HBsAg, $\text{Al}(\text{OH})_3$ и МФЛ, четко

указывает на то, что МФЛ является эффективным индуктором Th1 клеток, секретирующих и ИЛ-2, и ИНФ-γ. Таким образом, составы такого типа имеют важное значение для создания лечебных вакцин.

Что касается Таблиц, показывающих результаты вышеописанных экспериментов, см. нижеследующие Таблицы 1 – 6.

Пример 6

Клиническое применение МФЛ в качестве адъюванта к HBsAg. Предварительные результаты

Исследование МФЛ-ГВВ-002 (продолжаются)

Данным исследованием HBsAg сравнивается с Энгериксом-Б в экспериментах на молодых здоровых непримированных добровольцах.

Цели

Иммуногенность: величина реакции анти-ГВ антител

Кинетика реакции анти-ГВ антител

Передаваемый клетками иммунитет, индуцируемый обеими вакцинами (in vitro и in vivo)

Реактогенность, токсикология и безопасность

Материалы и методы

а) Вакцины

	HBsAg (как в Энгериксе-Б)	Алюминат	МФЛ
I	20мкг	500мкг	50мкг
II	20мкг	500мкг	Отсутствие

б) Контингент

- Здоровые взрослые добровольцы в возрасте 18 - 30 лет.

- Добровольцы должны быть отрицательными на маркеры ГВВ и никогда прежде не вакцинированными против гепатита В.

с) Методика

- Дважды слепой неупорядоченный метод исследования.

- План вакцинации: 0, 1, 6 месяцев.

- Наблюдение до 12-го месяца.

- Образцы крови:

- Тест на анти-ГВ антитела проводят до 7 дней, 15 дней, 30 дней после каждой вакцинации.

- Биохимию и гематологические параметры определяют до и 2 дня спустя после каждой дозы.

- Кровь на определения передаваемого клетками иммунитета берут до и после курса первичной вакцинации и бустерной инъекции.

- Реактогенность:

Необходимо регистрировать в карте вакцинации субъектов появление местных и общих признаков и симптомов в день вакцинации и в течение 7 последующих дней.

Результаты

Результаты исследований вплоть до 2 месяцев после второй дозы приводятся ниже.

Контингент:

Всего 29 субъектов дали свое информированное согласие, но только 27 (15 мужчин и 12 женщин) отвечали предъявляемым требованиям. 15 субъектов образовали группу 1 и 12 - группу 11.

Безопасность:

Никаких серьезных нежелательных проявлений не отмечено, и ни один из субъектов не был выведен или должен быть выведен из эксперимента. Никаких клинически значимых изменений в гематологических или биохимических параметрах не наблюдалось. Частота и тяжесть общих и местных признаков и симптомов была одинаковой в обеих группах.

Иммуногенность:

Титры анти-ГВ антител определялись вплоть до 90-го дня после введения второй дозы. Степень сероконверсии (СС в %) определяется, как появление антител у первоначально серонегативных субъектов.

Степень сероконверсии определяется, как процент субъектов с титрами защитных анти-ГВ антител.

Очевидно, если не наблюдается четкой разницы в величине реакции, антител с ГЗТ, сравнимым для двух групп, в этом случае; кинетика реакции будет различной, и в этом явное преимущество содержащей МФЛ вакцины. В самом деле, через 7 дней после введения второй дозы 93% и 80% субъектов, вакцинированных МФЛ-ГВВ, оказались серопреобразованными и соответственно защищенными. В этом случае степень сероконверсии составляет 95%. Для сравнения степень сероконверсии в группе, вакцинированной Энгериксом-Б, составляет 58%.

Эта разница сохраняется и через два месяца после введения второй дозы и особенно очевидно в случае степени сероконверсии. В указанный момент времени все субъекты, вакцинированные МФЛ-ГВВ, были защищены в сравнении с 58% субъектов, вакцинированных вакциной с адъювантом.

Исследование МФЛ-ГВВ-003 (продолжаются)

Материалы и методы аналогичны тем, которые применялись при исследовании МФЛ-ГВВ-002 (см. выше). Но схема вакцинации была другой.

Группа	Число субъектов	Вакцина	Схема
--------	-----------------	---------	-------

I	25	МФЛ-НВsAg-алюм.	0 - 2 месяца
II	25	Энгерикс-Б	0 - 2 месяца
III	25	МФЛ-НВsAg-алюм.	0 - 6 месяцев
IV	25	Энгерикс-Б	0 - 6 месяцев

Результаты

Хотя кинетика реакций анти-ГВ антител не изучалась столь же тщательно, как в предыдущем исследовании, в настоящем исследовании, видимо, можно сделать те же выводы. Субъекты, вакцинированные вакциной с МФЛ в качестве адъюванта, дают лучшую реакцию по сравнению с субъектами, инъецированными вакциной без МФЛ. Все, кроме одного субъекта (95,8%) имеют защитные титры через месяц после введения второй дозы МФЛ-ГВВ в сравнении с 72,7% в группе, вакцинированной Энгетриком-Б. Более того, в отличие от предыдущего исследования МФЛ-ГВВ вакцина, видимо, индуцирует более высокие титры антитела по сравнению с Энгетриком-Б (214 и 72мИЕ/мл соответственно). Возможно важную роль играет увеличение интервала между двумя дозами.

Выводы

В этих двух исследованиях на здоровых взрослых добровольцах испытана вакцина против гепатита В (содержит НВsAg такой, как в Энгетрике-Б, и алюминат) с МФЛ в качестве адъюванта, которая сравнивалась с Энгетриком-Б (НВsAg S-антиген в смеси с алюминатом) с применением различных схем вакцинации. Если, видимо, не существует разницы в иммуногенности между двумя вакцинами после одной дозы, то МФЛ-ГВВ вакцина показывает явное преимущество после второй дозы, особенно с точки зрения более высокого процента субъектов с титрами защитного антитела. ГЗТ также более высоко в этой группе, если интервал между двумя дозами два месяца, а не один.

Это могло бы указывать на лучшее примирование реакции при добавлении к антигену МФЛ. Поэтому такая вакцина могла бы иметь большую ценность для субъектов с замедленной или низкой реакцией на вакцинацию против гепатита В, например, людей старшего возраста или иммунокомпрометированных субъектов.

Что касается Таблиц, в которых приведены результаты вышеописанных экспериментов, см. нижеследующие Таблицы 7 - 9.

Пример 7

Гепатит А. Исследования МФЛ на мышах

Следующий эксперимент показывает, что добавление МФЛ к вакцине против гепатита А оказывает благоприятное воздействие. Это показано более низкими значениями ЭД50 (доза, выраженная в ФИСА единицах (ФЕ), вызывающая серологическую реакцию у 50% инъецированных животных).

Метод

Мышей линии NMRI инъецируют 1 дозой экспериментальной вакцины против ГАВ, содержащей 360, 120, 40, 13,3ФЕ/дозу в сочетании с различными концентрациями МФЛ (0, 1,5, 6, 12,5мкг/дозу). Через 20 дней после инокуляции берут образцы крови и сыворотку анализируют в НАВАВ анализа (с применением 20%-го отброса). Подсчитывают ЭД50 (выраженную в ФЕ), которая соответствует дозе, индуцирующей серологическую реакцию у 50% испытуемых животных.

Результаты

Результаты суммированы в нижеследующей Таблице. Вакцина, не содержащая МФЛ, имела ЭД50 в 123,7, в то время как вакцина, содержащая 1,5мкг/мл МФЛ, имела значение ЭД50 в 154. Более высокие дозы МФЛ оказывают благоприятное воздействие (ЭД50 наблюдались при более низких значениях ФЕ). При 12,5мкг МФЛ на дозу наблюдаемая ЭД50 составляет 47,1ФЕ.

Выводы

Комбинация соответствующего количества МФЛ с вакциной против ГАВ улучшает действие данной вакцины при испытании ее эффективности на мышах (0 - 6 месяцев).

Таблица 1	
Влияние прибавления МФЛ на вакцину против гепатита А	
Доза ММ, добавляемого к вакцине против ГАВ (мкг/дозу)	ЭД50 (в ФЕ/дозу)
0	123,7
1,5	154
6	101,1
12,5	47,1

Таблица 2				
Влияние возрастающих доз МФЛ (> 500нм) на иммуногенность рек. НВsAg, адсорбированного на Al(OH) ₃				
Количество МФЛ (мкг/доза)	Анти-ГВ реакция			
	Общий ИгГ		ИгГ2а	
	Д14	Д21	Д14	Д21
0*	69	743	3,2	11
3,13	122	541	3,8	20
6,25	296	882	6,4	24
12,5	371	1359	10	48

25	456	1493	189	138
50	403	1776	33	242

5

Таблица 3				
Сравнение 3 клинических лотов, содержащих или не содержащих МФЛ, А АВ реакция				
Лот	Доза HBsAg на Al(OH) ₃ (мкг)	Доза VAK (мкг)	ГЗТ анти-ГВ (мИЕ/мл)	
DSAH16	2,5	0	0,75	15,1
DSAR501	2,5	6,25	12,4	96,7
DSAR502	2,5	6,25	41,9	89,2

10

15

Таблица 4						
Сравнение 2 клинических лотов, содержащих или не содержащих МФЛ (> 500нм) Реакция анти-ГВ ИгГ и ИгГ2а						
Лот	Доза HBsAg на Al(OH) ₃ (мкг)	Доза МФЛ (мкг)	Анти-ГВ реакция			
			ИгГ		ИгГ2а	
			Д15	Д21	Д15	Д21
DSAH16	2,5	0	20	178	5	5
DSAR502	2,5	6,25	113	641	5	28

20

25

Таблица 5							
Влияние дозы МФЛ (< 100нм) на иммуногенность рек. HBsAg, адсорбированного на Al(OH) ₃							
Доза HBsAg на Al(OH) ₃ (мкг)		Доза МФЛ (<100нм) (мкг)		Анти-ГВ реакция			
				Общий ИгГ		ИгГ	
				Д15	Д21	Д15	Д21
1		0	30	637	67	516	15
1		3,12	312	2302	335	3532	167
1		6,25	538	2719	856	3932	261
1		12,5	396	2104	485	3625	125
1		25	38	446	141	638	28

30

35

Таблица 6										
Влияние МФЛ (> 500нм) на индуцирование HBsAg специфичных Th1 клеток у Balb/c мышей										
Доза HBsAg (мкг/мышь)		Состав		Секретирование in vitro						
				ИЛ-2 (ИС)			ИНФ-γ (пг/мл)		ИЛ-4 (пг/мл)	
				24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч	72ч
20		FCA	1,3	2,0	8,0	< 125	< 125	385		
-		FCA	0,7	1,8	0,7	< 125	< 125	< 125		
20		Al(OH) ₃	1,0	1,4	1,2	< 125	< 125	< 125	< 40	< 40
20		Al(OH) ₃ + МФЛ 30мкг	2	38	10	< 125	280	280	< 40	< 40

40

45

Таблица 7									
Влияние различных доз МФЛ (< 100нм) на индуцирование HBsAg специфичных Th1 клеток									
Доза HBsAg (мкг/мышь)		Состав		Секретирование in vitro					
				ИЛ-2 (ИС)			ИНФ-γ (пг/мл)		
				24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
20		0	2,6	28	21,8	< 67	< 67	< 67	< 67
20		7,5	207	173	58	< 67	207	522	698
20		15	270	71	36	275	878	1249	1582
20		30	41	59	36	< 67	< 67	< 67	207

50

55

Таблица 8						
МФЛ-ГВВ-002						
Группа	Вакцина	Время	№	Степень сероконверсии (%)	ГЗТ	Степень серозащиты (%)

60

65

У А 4 4 6 8 8 С 2

I	МФЛ- HBsAg (20мкг)	Pre	15	0,0	0	0,0
		PI (д7)	15	0,0		0,0
		PI (д15)	14	42,9	4	7,1
		PI (д30)	15	40,0	13	26,7
		PII (д37)	15	93,3	41	80,0
		PII (д45)	15	100,0	42	73,3
		PII (д60)	15	100,0	25	80,0
		PII (д90)	15	100,0	44	100,0
II	Энгерикс В (20мкг)	Pre	12	0,0	0	0,0
		PI (д7)	12	0,0		0,0
		PI (д15)	12	33,3	26	25,0
		PI (д30)	12	50,0	9	25,0
		PII (д37)	12	75,0	37	58,3
		PII (д45)	12	83,3	20	41,7
		PII (д60)	12	66,7	36	50,0
		PII (д90)	12	83,3	31	58,3
Таблица 9						
Исследование МФЛ-002: степень серозащиты (титры анти-ГБ антител > =10МЕ/мл						

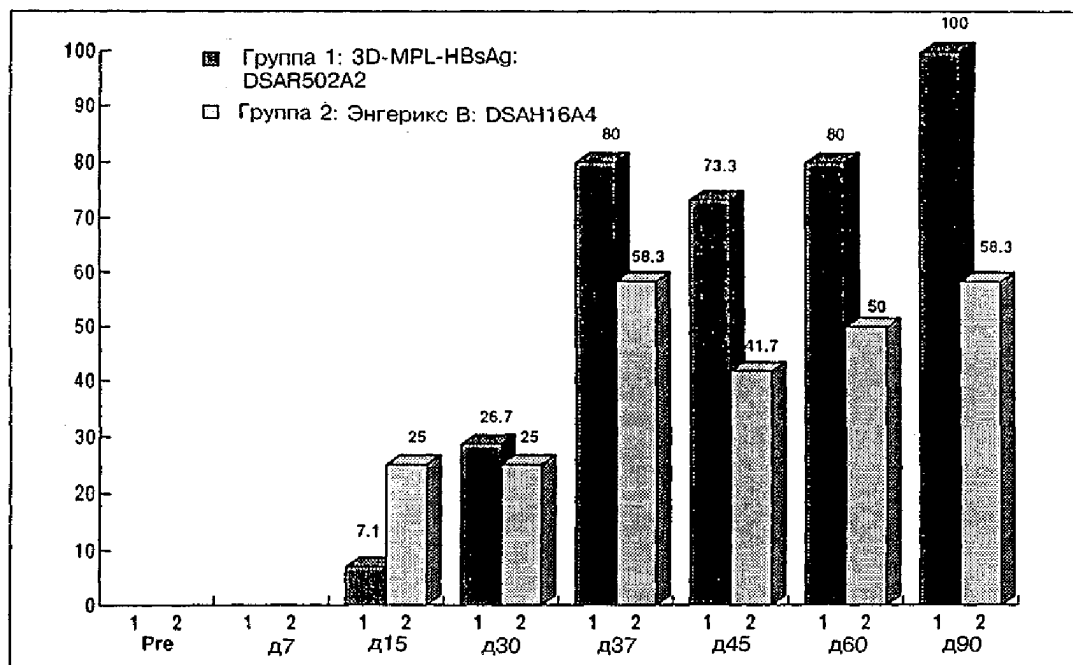


Таблица 10						
Исследование МФЛ-ГВВ-003						
Группа	Вакцина	Время	№	Степень сероконверсии (%)	ГЗТ	Степень серозащиты (%)
I	МФЛ- HBsAg (20мкг)	Pre	25	0,0	0	0,0
		P1 (м1)	23	56,5	1	26,1
		P1 (м2)	24	66,7	6	16,7
		P2 (м3)	24	100,0	214	95,8
II	Энгерикс В (20мкг)	Pre	25	0,0	0	0,0
		P1 (м1)	24	41,7	12	29,2
		P1 (м2)	19	52,6	4	5,3
		P2 (м3)	22	90,9	72	72,7

Формула винаходу

1. Вакцинный препарат, содержащий антиген вируса гепатита и фармацевтически приемлемый носитель, отличающийся тем, что он содержит антиген вируса гепатита в комбинации с 3-О-деацилированным монофосфорил-липидом А в количестве 10-100 мкг на дозу.

2. Вакцинный препарат по п. 1, отличающийся тем, что в качестве носителя он содержит алюминат.

3. Вакцинный препарат по п. 1, отличающийся тем, что в качестве носителя он содержит эмульсию типа масло в воде или иной носитель на липидной основе.

4. Вакцинный препарат по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что антигеном вируса гепатита является антиген вируса гепатита А.

5. Вакцинный препарат по п. 4, отличающийся тем, что антигеном вируса гепатита является инактивированный препарат, который происходит из штамма НМ-175.

6. Вакцинный препарат по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что антигеном вируса гепатита является антиген вируса гепатита В.

7. Вакцинный препарат по п. 6, отличающийся тем, что антигеном вируса гепатита является поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) или его вариант.

10. Вакцинный препарат по п. 7, отличающийся тем, что HBsAg представляет собой S антиген HbsAg, содержащий 226 аминокислот.

9. Вакцинный препарат по п. 8, отличающийся тем, что HBsAg дополнительно содержит пред-S последовательность.

15. Вакцинный препарат по п. 7 или 8, отличающийся тем, что HBsAg является составной частицей формулы (L*, S), где L* представляет модифицированный L-белок вируса гепатита В с аминокислотной последовательностью, содержащей остатки 12-52, за которыми следуют остатки 133-145, а затем - остатки 175-400 L-белка, при этом S представляет собой S-белок HBsAg.

11. Вакцинный препарат по любому из пп. 6-10, отличающийся тем, что он дополнительно содержит антиген вируса гепатита А.

20. Вакцинный препарат по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что он содержит один или несколько антигенов вируса гепатита и по меньшей мере один другой компонент, выбранный из негепатитного антигена, который обеспечивает защиту от одного или нескольких следующих заболеваний: дифтерии, столбняка, коклюша, Haemophilus influenzae b (Hib) и полиомиелита.

25. Вакцинный препарат по п. 12, отличающийся тем, что он выбран из группы, состоящей из комбинации DTP (дифтерия-столбняк-коклюш)- HBsAg, комбинации Hib- HBsAg, комбинации DTP-Hib-HBsAg и комбинации IPV (инактивированная вакцина полиомиелита)-DTP- HBsAg.

14. Вакцинный препарат по п. 12, отличающийся тем, что он дополнительно содержит антиген вируса гепатита А.

30. Вакцинный препарат по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что он предназначен для использования в медицине.

16. Способ лечения больного, страдающего от протекающей инфекции вирусом гепатита или склонного к инфицированию вирусом гепатита, включающий введение вакцинного препарата, отличающийся тем, что больному вводят эффективное количество вакцинного препарата по любому из пп. 1-15.

35. Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 3, 15.03.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.