



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128204** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)

A61K 39/00
A61K 39/05 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/13 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
A61K 47/08 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2020 00861	(72) Винахідник(и):	Ракеш Кумар (IN), Шарма Індер Джіт (IN), Шітоле Аніл В'янкатрао (IN), Доддапанені Манохар (IN), Шарма Хітт Джоті (IN)
(22) Дата подання заявки:	13.07.2018	(73) Володілець (володільці):	СІРЕМ ІНСТІТЮТ ОФ ІНДІА ПВТ ЛТД., 212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411 028, India (IN)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	09.05.2024	(74) Представник:	Могилевський Валентин Михайлович, реєстр. №13
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	201721025513	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2010/046934 A1, 29.04.2010 WO 2017/048038 A1, 23.03.2017 KUTUB MAHMOOD et. al. Hexavalent IPV-based combination vaccines for public-sector markets of low-resource countries. Human vaccines and immunotherapeutics. US. 19.09.2013. Vol. 9. No. 9. PP. 1894 - 1902 URL: http://dx.doi.org/10.4161/hv.25407 (дата звернення 13.11.2023) CHHATWAL JUGESH et. al. Immunogenicity and safety of a liquid hexavalent vaccine in Indian infants. Indian pediatrics. Calcutta. IN. 05.11.2016. Vol. 54. No. 1. PP. 15 - 20 URL: http://dx.doi.org/10.1007/s13312-017-0989-2 (дата звернення 13.11.2023) WO 2012/093406 A2, 12.07.2012 WO 2004/110480 A2, 23.12.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	18.07.2017		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	IN		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.06.2020, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	08.05.2024, Бюл.№ 19		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IB2018/055180, 13.07.2018		

UA 128204 C2

(54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ З ПОКРАЩЕНОЮ СТАБІЛЬНІСТЮ, ПІДВИЩЕНОЮ ІМУНОГЕННІСТЮ ТА ЗНИЖЕНОЮ РЕАКТОГЕННІСТЮ І СПОСІБ ЇЇ ВИГОТОВЛЕННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до імуногенної композиції, що включає антиген дифтерійного анатоксину (D), антиген правцевого анатоксину (T), поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg), інактивований цілюноклітинний кашлюковий антиген (wP), капсулярний сахарид *Haemophilus influenzae* типу В (Hib), кон'югований з білком-носієм, інактивований антиген вірусу поліомієліту (IPV), додатково з одним або кількома антигенами та спосіб її виготовлення. Повністю рідка комбінована вакцина з підвищеною імуногенністю, зниженою реактогенністю та покращеною стабільністю. Покращені методи інактивації формальдегіду, покращений профіль адсорбції антигену дифтерійного анатоксину (D), антигену правцевого анатоксину (T) та поверхневого антигену гепатиту В (НерВ), адсорбованого окремо на ад'юванті фосфату алюмінію, мінімальний загальний вміст алюмінію (Al³⁺) та оптимізована концентрація 2-феноксіетанолу (2-РЕ) як консерванту.

Галузь техніки

Винаходу відноситься до галузі біотехнологій, і більш конкретно, комбінованої композиції вакцини, яка складається з групи антигенів/імуногенів, та способу її виготовлення. Крім того, винахід стосується вдосконаленої методології у галузі виробництва комбінованої вакцини.

5 Рівень техніки

Комбінована вакцина, яка може забезпечити імуногенність проти великої кількості захворювань, є більш ефективною порівняно з одновалентною вакциною, оскільки при її використанні зменшується кількість ін'єкцій, зменшується кількість ускладнень, пов'язаних з багаторазовими внутрішньом'язовими ін'єкціями, зменшуються витрати на введення та виробництво, зменшуються витрати на зберігання, зменшується ризик затримки або пропуску вакцинації та забезпечується краще дотримання рекомендацій пацієнтом за рахунок зменшення кількості окремих вакцинацій. Більше того, повністю рідкі препарати комбінованої вакцини мають явні переваги порівняно з вакцинами, які потребують розведення. Встановлено, що середній час приготування повністю рідкої вакцини на половину коротший за час приготування не повністю рідкої вакцини. В ході цього ж дослідження майже весь медичний персонал (97,6 %) повідомив, що віддав би перевагу використанню повністю рідкої вакцини у своїй щоденній практиці. (Див.: Soubeyrand B, et al; Оцінка часу підготовки повністю рідкої вакцини порівняно з часом підготовки не повністю рідкої педіатричної шестивалентної вакцини. Вивчення трудового процесу в часі; Vaccine 2015; 33:3976-82).

Наразі відомі та доступні комбіновані вакцини можуть не містити відповідний склад відповідних антигенів у відповідних імуногенних формах для досягнення завдяки одній ін'єкції бажаних рівнів безпечності, ефективності та імуногенності серед уразливої людської популяції щодо ряду захворювань. Існує значна кількість різних комбінацій вакцин, які можна створити за допомогою лише декількох додаткових антигенів. Додаючи від 1 до 4 інших компонентів антигену (наприклад, H1V (ліофілізований або рідкий), HBV, IPV, HAV) або DTwP, чи DTaP, можна отримати 44 можливі різні комбінації вакцин. Кількість збільшилася б до тисяч, якби враховувались окремі компоненти різних виробників. Оскільки кожна нова комбінована вакцина (з урахуванням відмінностей компонентів у залежності від джерела) повинна розроблятися окремо, щоб продемонструвати безпечність, стабільність, сумісність та ефективність, розробка всіх цих вакцин стає складним завданням.

Антигени комбінованої вакцини:

Антигени дифтерії та правця

Дифтерія та правець є гострими інфекціями, спричиненими відповідно *Corynebacterium Diphtheriae* та *Clostridium tetani*. В обох випадках причиною клінічних захворювань є високоактивний екзотоксин цих бактерій. Вакцини, що забезпечують захист від цих бактерій, містять токсини, які хімічно модифіковані, отже, більше не є токсичними, але все ще залишаються антигенними. Дифтерійний токсин і токсин правця виробляються вирощуванням *Corynebacterium Diphtheriae* і *Clostridium tetani*, в середовищі, що містить бичачий екстракт. Токсини інактивуються за допомогою обробки, яка включає тепло, УФ, формалін/формальдегід, глутаральдегід, ацетилетиленімін та ін., для виготовлення анатоксинів [дифтерійний анатоксин (D) та анатоксин правця (T)]. Занепокоєння з приводу губчастої енцефалопатії великої рогатої худоби (BSE), трансмісивної губчастої енцефалопатії (TSE), хвороби Кройцфельда-Якоба (CJD та різновиди хвороби CJD) може виникнути через тваринні компоненти, використовувані в поживному середовищі з вмістом бичачого екстракту, що поширюється через вакцину. (Див.: Керівні принципи ВООЗ щодо трансмісивних губчастих енцефалопатій стосовно біологічних та фармацевтичних препаратів; 2003 & EMEA/CPMP/BWP/819/01; 24 квітня 2001 р.).

Кашлюкові антигени

Введення цілюноклітинних вакцин, що складаються з хімічно- та теплоінактивованих організмів *Bordetella pertussis* в 40-х роках, стало причиною різкого зменшення захворюваності на кашлюк, спричинений *B. pertussis*.

Цілюноклітинні вакцини ДКП зазвичай асоціюються з декількома місцевими небажаними явищами (наприклад, еритемою, набряком та болем у місці ін'єкції), лихоманкою та іншими легкими системними явищами (наприклад, сонливістю, дратівливістю та анорексією) (Див.: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; Характер та частота виникнення небажаних реакцій, пов'язаних із вакцинацією ДКП та ДК у немовлят та дітей. Paediatrics 1981; 68:650-60) & (Див.: Long SS, DeForest A, Pennridge Pediatric Associates, et al. Динамічне дослідження небажаних реакцій після введення вакцини проти дифтерії-правця-кашлюку в грудному віці. Paediatrics 1990; 85:294-302). Більш важкі системні явища (наприклад, судоми (з лихоманкою або без) та гіпотонічні гіпореактивні епізоди) трапляються рідше (співвідношення: один випадок на 1750 введених доз) серед дітей, які отримують цілюноклітинні вакцини ДКП (Див.: Cody CL,

Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; Характер та частота виникнення небажаних реакцій, пов'язаних з вакцинацією ДКП та ДК у немовлят та дітей. *Paediatrics* 1981; 68:650-60). Гостра енцефалопатія зустрічається ще рідше (співвідношення 0-10,5 випадків на мільйон введених доз). Експерти погоджуються з тим, що цільноклітинна вакцина проти кашлюку

5 спричиняє тривале ураження мозку в деяких рідкісних випадках. (Див.: Інститут медицини; Вакцина ДКП та хронічна дисфункція нервової системи, новий аналіз; Washington D.C., National Academy Press, 1994).

Ряд повідомлень про взаємозв'язок між вакцинацією від кашлюку, реактогенністю та серйозними побічними ефектами, призвели до зниження прийняття вакцини і, як наслідок, нових спалахів епідемій (Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H. та Brawson, N.S.B. (1981). Вакцинація проти кашлюку та серйозні гострі неврологічні захворювання у дітей: *Brit Med. J.* 282: 1595-1599).

Небажані реакції, пов'язані з цільноклітинною вакциною проти кашлюку (wP), є перешкодою для подальшого застосування вакцин у всьому світі, і тому комбіновані вакцини на основі wP

15 поступово замінюються в індустріальному світі комбінованими вакцинами на основі ацелюлярного кашлюку.

Зовсім недавно були розроблені визначені компонентні кашлюкові вакцини. Раніше повідомлялося про повністю рідкі шестивалентні ацелюлярні кашлюкові вакцини (DTaP IPV PRP-T-HBsAg) (EP1028750).

20 *Infanrix®* Hexa (GSK) на сьогоднішній день є єдиною на ринку шестивалентною дитячою комбінованою вакциною, що містить Salk IPV. Цей препарат (DTaP3-IPV-HBV//Hib) продається у вигляді шприца, попередньо заповненого п'ятивалентним препаратом, упакованого разом із ліофілізованим кон'югатом Hib-антигену PRP-T в окремому флаконі, який перед використанням необхідно розвести рештою вакцини.

25 Друга шестивалентна вакцина, *Hexyon®* (також її називають *Hexacima®* і *Hexaxim®*) - це повністю рідка шестивалентна вакцина від Sanofi Pasteur; однак також з вмістом aP. Ця вакцина, ймовірно, буде націлена на приватні ринки Європи та у всьому світі. Інша шестивалентна вакцина, також із вмістом aP, що є спільною розробкою компаній Merck та Sanofi Pasteur, на даний час вивчається у клінічних дослідженнях фази III.

30 Bharat Biotech International розробляє семивалентну комбіновану вакцину, яка включає DT, ацелюлярний кашлюк, Sabin IPV (тип 1: 40 DU, тип 2: 8 DU, тип 3: 32DU), одноштамовий інактивованний ротавірус (штам G9, тобто штам 116E), кон'югат PRP *Haemophilus influenza* тип b з TT та вакциною на основі реомбінантного гепатиту B.

Однак виникають занепокоєння щодо довгострокової ефективності вакцин ацелюлярного кашлюку (aP), особливо в країнах, що розвиваються. Останні повідомлення свідчать про те, що імунітет до кашлюку знижується в підлітковому віці і є причиною збільшення випадків захворюваності у немовлят до шести місяців, перш ніж вони будуть повністю вакциновані. Оцінка ефективності вакцини становила 24 відсотки у дітей віком 8-12 років, вакцинованих в грудному віці проти aP. Неекспериментальне дослідження в Австралії також підтвердило більш

40 високий показник випадків захворюваності серед підлітків, які отримали кашлюкову вакцину в грудному віці, порівняно з тими, хто отримував цільноклітинну кашлюкову вакцину (відносний ризик 3,3, 95-відсотковий довірчий інтервал 2,4-4,5).

З точки зору витрат, aP-антигени історично перевищували витрати на антигени wP в 10-30 разів через виробничі відмінності та витрати на авторську винагороду, а отже, становили економічне навантаження для країн, що розвиваються. В результаті вартість шестивалентних вакцин на основі wP була б більш привабливою для використання в державному секторі країн з

45 низьким рівнем ресурсів.

Отже, використання цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP) у шестивалентних вакцинах, призначених для країн, що розвиваються, набуло важливого значення як через вартість, так і через занепокоєння щодо довгострокової ефективності вакцин aP, особливо в

50 країнах, що розвиваються.

У порівнянні з найкращими цільноклітинними вакцинами проти кашлюку (wP), вакцини aP не настільки ефективні в програмах масової імунізації (Vickers et al. 2006; Cherry 2012).

В нещодавніх дослідженнях спалахів серед високоімунізованих груп населення визначено, що тривалість захисту вакцин проти aP занадто коротка (Klein et al. 2012; Misegades et al. 2012), що призводить до зниження імунітету у дітей старшого віку та підлітків і відповідного збільшення випадків захворюваності у цій віковій групі (Skowronski et al. 2002; Klein et al. 2012). Навпаки, вакцини wP забезпечують кращий захист у підлітковому віці (Klein et al. 2012). Внаслідок цих недоліків у країнах, які перейшли на застосування вакцини aP у 90-х роках, зараз у нас є

60 покоління дітей не лише менш захищених від кашлюку, але й тих, хто може бути менш чутливим

до ревакцинації, оскільки первісна вакцина може визначити їх імунну відповідь на подальші ревакцинації (Podda et al. 1995; Mascart et al. 2007; Sheridan et al. 2012; Liko, Robison and Cieslak 2013; Smits et al. 2013).

Одним з найважливіших факторів, що сприяють реактогенності wP, є наявність ліпо-
 5 олигосахариду (LOS) – ендотоксину з зовнішньої мембрани бактерій.

Інактивацію токсинів у вакцинах wP можна здійснити різними методами, але жоден активний токсин, стійкий до тепла, не повинен виявлятися у кінцевому продукті. В процесі масового виробництва цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP) для інактивації токсинів wP, який застосовують багато виробників, використовується термічна обробка/формалін. Деякі джерела
 10 повідомляють про використання тімеросалу для інактивації wP. Однак використання тімеросалу призводить до втрати антигенності IPV (Вакцина 1994, том 12 № 9 851-856. Згубний вплив тімеросалу на специфічну активність інактивованої вакцини проти поліовірусу), а тому у разі застосування комбінованої вакцини, що містить IPV, можливо, знадобиться окремий флакон для тімеросалу, що містить wP, щоб зберегти його специфічну активність з часом, або змінити
 15 спосіб інактивації вихідної маси кашлюкового компоненту. Деякі антигени, тобто активні РТ, також можуть слугувати модифікаторами імунної відповіді. Спостерігалися помітні відмінності в імунній відповіді на різні антигени в різних вакцинах (ВООЗ, 1993).

Хімічна екстракція LOS призвела до значного зниження вмісту ендотоксину (на 20 %) та вражаючого зниження токсичності, пов'язаної з ендотоксином (до 97 %), залежно від
 20 використовуваного тесту *in vitro* або *in vivo*. Екстракція LOS не впливала на цілісність продукту і, що ще важливіше, не впливала на специфічну активність та/або стабільність DTP. Крім того, майже не спостерігалось відмінностей у відповідях антитіл та Т-клітин. (Див.: Waldely Oliveira Dias et. al; Вдосконалена цільноклітинна вакцина проти кашлюку зі зниженим вмістом ендотоксину; Вакцини та імунотерапевтичні засоби 9:2, 339–348; Лютий 2012 р.)

25 Антигени гепатиту В

Існують різні штами вірусу гепатиту. Гепатит В - це захворювання, спричинене вірусом гепатиту В (НерВ), який інфікує печінку людини і викликає запалення, яке називається гепатитом. Вакцина проти захворювання містить один з білків вірусної оболонки, поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg). Тепер доступні вакцини, що застосовувалися для масової
 30 імунізації, наприклад, препарати Recombivax HB® та Comvax® від Merck, Engerix-B® та Pediarix® від Glaxo SmithKline Biologicals. Комбінована вакцина, що містить компонент проти гепатиту В, асоціювалась з кращими результатами виконання та дотримання порівняно з одноразовою вакциною проти гепатиту. (Див.: Kurosky. et. al; Вплив комбінованих вакцин на дотримання схеми імунізації вакциною проти гепатиту В у дітей в США; The Pediatric Infectious Disease Journal. 36(7):e189-e196, JUL 2017). В кількох джерелах повідомляється про адсорбцію поверхневого антигену гепатиту В на фосфаті алюмінію в поєднанні з іншими антигенами. Компонент гепатиту В практично не повинен містити тімерсалу (спосіб приготування HBsAg без тімерсалу раніше був опублікований в EP1307473). Нехавас® - комбінована вакцина, яка
 35 була введена з ринку через низьку імуногенність компоненту гепатиту В. Тому існує потреба у комбінованій композиції вакцини, що містить антиген гепатиту В з належною або посиленою імуногенністю.

Антигени *Haemophilus influenzae* (Hib)

Haemophilus influenzae - це грамнегативна коккобактерія, що є звичайною частиною флори верхніх дихальних шляхів. *Haemophilus influenzae* типу b (Hib b) є головною причиною
 45 інвазивних інфекцій менінгіту, що передаються через кров, у дітей раннього віку, і головною причиною менінгіту в перші 2 роки життя. Імунізація проти *Haemophilus influenzae* розпочалася в Канаді в 1987 році із застосуванням полісахаридної вакцини [полірибозилпрібітолфосфату (PRP)]. Капсула полірибозилпрібітол фосфату (PRP) Hib є головним фактором вірулентності для організму. Антитіло проти PRP є основним фактором бактерицидної активності в сироватці
 50 крові, а підвищення рівня антитіл пов'язане зі зниженням ризику інвазивного захворювання. PRP є незалежним Т-клітинним антигеном і, отже, характеризується а) індукцією поганої відповіді на антитіла у немовлят та дітей, які не досягли 18-місячного віку, б) мінливою і кількісно меншою відповіддю на антитіла порівняно з Т-клітинно-залежними антигенами, в) виробленням більш високої частки імуноглобуліну М (IgM) і г) неможливістю індукувати
 55 бустерну реакцію.

Початкові вакцини на основі лише компоненту PRP виявилися неефективними для немовлят. Подальші зусилля були спрямовані на розробку вакцини на основі кон'югату PRP, де PRP кон'югується з білками, званими білками-носіями, такими як білок зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*, антитоксин дифтерії, антитоксин правця та CRM 197. Включення
 60 компонентів-кон'югатів Hib у комбіновані вакцини пов'язане зі зниженою імуногенністю Hib. Крім

того, кон'югати Hib нестійкі у водних середовищах і не можуть пережити тривале зберігання у цій формі. Отже, полісахарид PRP Haemophilus influenzae b (Hib) часто має форму висушеної твердої речовини, яка розводиться під час введення рідким складом інших антигенів. Наприклад, у Infanrix® hexa (WO99/48525).

5 Антиген поліомієліту

Доступні різні види вакцини:

- Жива ослаблена оральна поліомієлітна вакцина (ОПВ) була розроблена доктором Альбертом Сабіном у 1961 році. ОПВ, що включає штами Сабін, вводять перорально.

10 - Інактивована (вбита) вакцина проти поліомієліту (ІПВ) була розроблена в 1955 році доктором Йонасом Солком. ІПВ, що включає штами Солк, вводять у вигляді ін'єкцій.

- Нещодавно був розроблений інактивований поліовірус Сабін для ін'єкцій, який був приготований шляхом інактивації вірусу поліомієліту штамами Сабіна, доступний також у комерційних продуктах.

15 Живі послаблені (ОПВ) та інактивовані (ІПВ) поліовакцини були ефективними у боротьбі із захворюванням на поліомієліт у всьому світі. Вакцина проти поліомієліту може містити штами Солк або Сабін.

20 У 1955 році доктору Йонасу Солку вдалося інактивувати вірус поліомієліту дикого типу, таким чином включивши його у склад ін'єкційного типу, і назвавши його штамом Солк, який включає Mahoney типу 1, MEF типу 2 та Saukett типу 3, які мають використовувались у вакцині проти поліомієліту. До штамів Сабін належать штами Сабін 1 і Сабін 2.

На даний момент прийнятна стандартна доза поліовакцини містить 40 D антигенних одиниць інактивованого поліовірусу типу 1 (Mahoney), 8 D антигенних одиниць інактивованого поліовірусу типу 2 (MEF-I) та 32 D антигенних одиниць інактивованого поліовірусу типу 3 (Saukett), наприклад Infanrix-hexa® (WO99/48525).

25 На даний час ІПВ доступна або як безад'ювантний окремий препарат, або у різних комбінаціях, включаючи DT-IPV (з дифтерійним та правцевим анатоксинами) та шестивалентні ІПВ вакцини (додатково проти кашлюку, гепатиту В та Haemophilus influenzae b), наприклад Infanrix® hexa (WO99/48525).

30 Однак, порівняно з ОПВ, загальна собівартість виробництва ІПВ значно вища. В основному це пов'язано з такими вимогами: (i) більше вірусу на дозу; (ii) додаткова подальша обробка (тобто концентрація, очищення та інактивація) та відповідне тестування контролю якості (iii) втрата антигену або неналежне подальше відновлення і iv) стримування. Досі фінансовий аспект був головним недоліком новаторської розробки та впровадження ІПВ у країнах з низьким та середнім рівнем доходу.

35 Майбутній світовий попит на ІПВ після ліквідації поліовірусів може зрости з нинішнього рівня 80 мільйонів доз до 450 мільйонів доз на рік. Отже, ймовірно, знадобляться підходи до "періодичних" поставок ІПВ.

40 Ефективні вакцинні препарати зі зменшеною дозою, які забезпечують захист від інфекції із застосуванням меншої дози антигену ІПВ, є оптимальними в ситуаціях, коли постачання звичайної вакцини недостатнє для задоволення глобальних потреб або, коли витрати на виготовлення звичайної вакцини не дозволяють продавати вакцину за ціною, доступною для країн, що розвиваються. Також вплив меншої дози ІПВ порівняно з існуючими на ринку препаратами може бути більш безпечним. Таким чином, необхідно оцінити різні стратегії забезпечення ІПВ за більш доступними цінами. Отже, комбінована вакцина зі зменшеною дозою

45 ІПВ може бути доступнішою по ціні та зручнішою для введення. У разі вакцини проти пандемічного грипу використання ад'ювантів дозволило зменшити дозу, збільшити доступність та знизити вартість вакцини. Тому було припущено, що форма вакцини ІПВ на основі ад'юванта дозволить знизити витрати, а також збільшити кількість доступних доз ІПВ у всьому світі.

50 Крім того, солі алюмінію вважаються безпечними й недорогими, вони вже використовуються в комбінованих вакцинах, що містять ІПВ, їх використання завдає менше перешкод при розробці. Однак не відомо чи можна значно зменшити дозу при застосуванні алюмінієвих ад'ювантів.

Інші антигени

55 Іншими антигенами, які можуть бути включені до комбінованої вакцини, є Haemophilus influenzae (серотипи a, c, d, e, f та неінкапсульовані штами), гепатит (штами A, C, D, E, F і G), менінгіт A, B або C, грип, пневмококи, стрептококи, сибірська виразка, денге, малярія, кір, свинка, краснуха, БЦЖ, японський енцефаліт, ротавірус, віспа, жовта лихоманка, тиф, вірус оперізуючого лишая, повітряної віспи та ін.

Діапазон та тип антигенів, що застосовуються у комбінованій вакцині, залежать від віку цільових груп популяції, наприклад, немовлята, діти дошкільного віку, діти шкільного віку, підлітки та дорослі. Відомі перші комбіновані вакцини, які могли б запобігти інфікуванню *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium Diphtheriae* та неонов'язково інактивованого поліовірусу (ІПВ) та/або вірусу гепатиту В та/або *Haemophilus influenzae* типу В (див., наприклад, WO 93/24148, WO97/00697, WO2000/030678, WO2008/028956, US 6013264 & WO2005089794).

Тим часом для багаторазової ін'єкції вакцини необхідно використовувати консервант, щоб уникнути зараження мікроорганізмами. Серед комбінованих вакцинних препаратів, що експортуються ООН в країни, що розвиваються, переважають вакцини, які містять консервант, враховуючи середовище країн, де слід використовувати вакцини, методи розподілу, витрати тощо. Приклади консерванту, що застосовується у вакцинних продуктах, можуть містити тімеросал, 2-ПЕ, фенол, формальдегід та звичайні дози консервантів, відомі в даній галузі техніки.

Винахідники встановили, що імуногенність, реактогенність, стабільність та підтримання правильної форми антигенів у комбінованій вакцинній композиції залежать від способу утворення композиції, що включає процес виготовлення індивідуальних антигенів, послідовність додавання антигенів, використання специфічних ад'ювантів у конкретній кількості для певних антигенів, індивідуальна адсорбція або комбінована адсорбція антигенів на ад'ювантах, ступінь адсорбції антигену на ад'ювантах, загальний вміст алюмінію, концентрація та тип використовуваного консерванту, використання різних параметрів, у тому числі змішування, температура і рН.

Стислий виклад суті винаходу

Розкрито рідку, стабільну комбіновану вакцинну композицію, що демонструє підвищену імуногенність та знижену реактогенність та процес її виготовлення.

Дане розкриття стосується комбінованої вакцинної композиції, що включає:

а) високоочищений дифтерійний анатоксин (D) та анатоксин правця (T), отриманий з використанням напівсинтетичного середовища та згодом детоксифікований.

б) інактивованій цільноклітинний кашлюковий компонент (wP), приготований із застосуванням комбінації теплової та хімічної інактивації, специфічних штамів *Bordetella pertussis* у певному співвідношенні, що призводить до зниження реактогенності та підвищення специфічної активності.

с) капсулярний полісахаридний антиген (PRP) *Haemophilus influenzae* типу В (Hib), кон'югований з білком-носієм (CP)

д) ІПВ (інактивованій поліовірус) зі стандартною або зниженою дозою штаму Солк або штаму Сабін, отриманий за допомогою вдосконалених методів інактивації формальдегіду та може бути додатково адсорбований на гідроксиді алюмінію.

е) оптимальний профіль адсорбції антигену(-ів), такий, що поверхневий антиген гепатиту В (НерВ) адсорбується індивідуально на фосфатно-ад'ювантний фосфат алюмінію, антигени D і T індивідуально адсорбуються на ад'ювант фосфату алюмінію, завдяки чому підвищується імуногенність

f) мінімальний вміст алюмінію, забезпечуючи тим самим знижену реактогенність

g) оптимальна концентрація 2-феноксіетанолу (2-PE) в якості консерванту.

Завдання

Деякі завдання розкриття, які відповідають, щонайменше, одному варіанту винаходу, наведено нижче.

Завданням цього розкриття є поліпшення однієї або декількох проблем рівня техніки або принаймні надання корисної альтернативи.

Іншим завданням цього розкриття є створення рідкої, стабільної, менш реактогенної та більш імуногенної комбінованої вакцинної композиції/рецептури, придатної для профілактики та лікування більш ніж одного хвороботворного стану, що відповідає критерію серопротекції відносно кожного із зазначених імуногенних компонентів.

Ще одним завданням цього розкриття є представлення способу виготовлення такої композиції/рецептури комбінованої вакцини.

Інші завдання та переваги цього розкриття будуть більш зрозумілі з наступного опису, який не призначений для обмеження сфери застосування цього розкриття.

Детальний опис

Згідно з першим варіантом цього розкриття, комбінована вакцинна композиція складається з групи антигенів/імуногенів, вибраних, серед іншого, з таких: дифтерійний анатоксин (D), правцевий анатоксин (T), цільноклітинний *B. pertussis* (wP), *Haemophilus influenzae* типу В (Hib),

кон'югований з PRP-CP, гепатит В (НерВ), інактивований поліовірус (ІПВ) і додатково містить ад'ювант та консерванти на основі алюмінію.

Згідно з другим варіантом цього розкриття, комбінована вакцинна композиція може додатково містити один або більше антигенів, вибраних із групи, що складається, серед іншого, з таких компонентів: Haemophilus influenzae (серотипи a, c, d, e, f та неінкапсульованих штамів), гепатит (штами A, C, D, E, F і G), менингіт A, B, C, Y, W-135, або X, грип, Staphylococcus aureus, антиген(-и) Salmonella typhi, ацелюлярний кашлюковий антиген, модифікована аденілатциклаза, антиген малярії (PTC, S), пневмококи, стрептококи, сибірська виразка, денге, малярія, кір, свинка, краснуха, БЦЖ, вірус папіломи людини, японський енцефаліт, денге, Зіка, Ебола, чикунгунья, ротавірус, жовта віспа, флавівіруси, оперізуючий лишай, антигени вірусу Varicella, відповідно.

Згідно третього варіанту цього розкриття, штами ІПВ, що використовуються у складі комбінованої вакцини, містять інактивовані штами Сабін, обрані з групи типу 1, типу 2 та типу 3, або інактивовані штами Солк, обрані з групи Mahoney типу 1, MEF типу 2 і Saukett типу 3.

В одному з аспектів третього варіанту поліовірус може бути культивований таким способом:

- Клітинна лінія CCL81-VERO (нірка мавпи) використовувалася в якості клітини господаря для культивування поліовірусів, тобто штамів Сабін та Солк.

- Після інфікування клітин-господарів бажаним штамом поліовірусу та інкубації протягом 72 годин середовище, що містить вірус та клітинний дебрис об'єднували та збирали в один контейнер.

- Фільтрат піддавали тангенціальній потоковій фільтрації за допомогою касети 100KDa; діалізували з використанням фосфатного буфера і очищували за допомогою аніонообмінної хроматографії.

- До введення пацієнтам віруси повинні бути інактивовані за допомогою відповідних методів інактивації.

Однак винахідники напрочуд виявили, що високий відсоток втрат пост-формальдегідної інактивації D-антигену може бути зумовлений наявністю фосфатного буфера, який несподівано викликає небажану агрегацію частинок поліовірусу.

Отже, важливий аспект цього розкриття включає вдосконалений процес інактивації формаліну, що складається з таких етапів:

- а) очищений пул вірусів піддавали буферному обміну від фосфатного буфера до трис-буфера в діапазоні (від 30 до 50 мМ) з рН від 7 до 7,5,

- б) до вищевказаної суміші додавали середовище M-199, що містить гліцин (5 г/л)

- с) додавали 0,025 % формальдегіду і потім змішували,

- д) потім суміш інкубували при температурі 37 °C протягом 5-13 днів при постійному перемішуванні маси вірусу на магнітній мішалці,

- е) пост-інкубаційну суміш обробляли на проміжній системі TFF (100 КДа, 0,1 м²) на 7-й день та остаточній фільтрації після інактивації

- ф) згодом відфільтровану частину зберігали при температурі 2-8 °C,

- г) ІФА D-Ag для визначення одиниці D-Ag

Згідно четвертого варіанту цього розкриття, штами ІПВ, що використовуються у складі комбінованої вакцини, містять зменшені дози інактивованих штамів Сабін, обрані з групи типу 1, типу 2 та типу 3, або інактивовані штами Солк, обрані з групи Mahoney типу 1, MEF типу 2 і Saukett типу 3.

Згідно п'ятого варіанту цього розкриття, ІПВ (штами Сабін та Солк) не адсорбуються на будь-якому ад'юванті (наприклад, перед змішуванням з іншими компонентами, якщо є).

Відповідно до шостого варіанту цього розкриття, компонент(и) ІПВ (Сабін та Солк) можуть бути адсорбовані на ад'юванті, вибраному з групи солі алюмінію (Al³⁺), наприклад, гідроксид алюмінію (Al(OH)₃) або фосфат алюмінію (AlPO₄), квасці, фосфат кальцію, MPLA, 3D-MPL, QS21, олігодезоксинуклеотидний ад'ювант, що містить CpG, ліпосома або водно-масляна емульсія чи їх комбінація. (наприклад, до або після змішування з іншими компонентами, якщо є). Якщо адсорбовані, один або кілька компонентів ІПВ можуть адсорбуватися окремо або разом у вигляді суміші на гідроксиді алюмінію.

Компонент(и) ІПВ (штами Сабін та Солк) можуть бути адсорбовані на солі алюмінію за допомогою такої процедури:

- Беруть потрібний об'єм обробленого в автоклаві Al(OH)₃ для отримання кінцевої концентрації алюмінію (Al⁺⁺⁺) від 0,1 до 0,8 мг/доза в контейнері об'ємом 50 мл

- Додають масу ІПВ з доведеною одиницею D-Ag та доводять об'єм до мітки розріджувачем (10x M-199+0,5 % гліцину),

- Доводять рН кінцевого складу та отримують готовий склад з рН від 6 до 6,8.

В одному з аспектів шостого варіанту адсорбція ІПВ, інактивованого формаліном, може бути здійснена на алюмінії (Al^{3+}) з концентрацією, вибраною з 0,1 мг/доза, 0,2 мг/доза, 0,3 мг/доза, 0,4 мг/доза, 0,5 мг/доза, 0,6 мг/доза, 0,7 мг/доза та 0,8 мг/доза, переважно з 0,1 мг/доза до 1,25 мг/доза на серотип та при рН, вибраному з діапазону 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 і 6,8, переважно - 6.5.

У ще одному аспекті шостого варіанту відсоткове відновлення D-Антигену після інактивації формаліном в присутності Tris може бути або 50 %, 60 %, 70 % або 80 %, а відсоток адсорбції після адсорбції гідроксидом алюмінію може бути між 70 % до 80 %, 80 % до 90 % або 90 % до 99 % або 95 % до 99 %.

Згідно з сьомим варіантом цього розкриття, дифтерійний токсин (екзотоксин) та токсин правця (екзотоксин) отримували відповідно з *Corynebacterium Diphtheria* та *Clostridium tetani* та згодом детоксифікували за допомогою відповідного способу інактивації. Отриманий таким чином дифтерійний анатоксин (D) та анатоксин правця (T) був додатково очищений за допомогою гель-фільтрувальної хроматографії. Отриманий таким чином очищений DT далі використовувався для створення комбінованої вакцини.

В одному з аспектів сьомого варіанту дифтерійний токсин продукується культивацією *Corynebacterium Diphtheriae* у напівсинтетичному середовищі, що складається з наведених далі інгредієнтів в оптимальних концентраціях у будь-якій з таких комбінацій:

Комбінація 1:

Казеїновий гідролізат, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, сульфат магнію, β-аланін, пімелова кислота, нікотинова кислота, купорос сульфат, сульфат цинку, хлорид марганцю, L-цистин, дигідрат хлориду кальцію, ортофосфат дигідрогену калію, фосфат гідрогену калію, сульфат заліза і ВДІ.

Комбінація 2:

Казеїн гідролізат, моногідрат мальтози, оцтова кислота льодовикова, натрію лактат, сульфат магнію, β-аланін, пімелова кислота, нікотинова кислота, хлорид марганцю, L-цистин, дигідрат хлориду кальцію, ортофосфат дигідрогену калію, дікалійфосфат, сульфат заліза і ВДІ.

Комбінація 3:

Казеїновий гідролізат, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, β-аланін, пімелова кислота, нікотинова кислота, купорос сульфат, сульфат цинку, хлорид марганцю, L-цистин, дигідрат хлориду кальцію, ортофосфат дигідрогену калію, фосфат гідрогену калію і WFI.

Комбінація 4:

Дріжджовий екстракт, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, сульфат магнію, β-аланін, пімелова кислота, нікотинова кислота, купорос сульфат, сульфат цинку, хлорид марганцю, L-цистин, дигідрат хлориду кальцію, ортофосфат дигідрогену калію, фосфат гідрогену калію, сульфат заліза і ВДІ.

Згідно другого аспекту сьомого варіанту дифтерійний токсин продукується культивацією *Corynebacterium Diphtheriae* у напівсинтетичному середовищі, що складається з наведених далі інгредієнтів в оптимальних концентраціях у будь-якій з таких комбінацій:

Комбінація 1:

Казеїнове середовище, хлорид кальцію, дікалійфосфат, декстроза безводна, натрію хлорид, сульфат магнію, рибофлавін, тіаміну гідрохлорид, піридоксину гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B12 розчин, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та ВДІ

Комбінація 2:

Казеїнове середовище, хлорид кальцію, β-аланін дікалійфосфат, декстроза безводна, натрію хлорид, сульфат магнію, сульфат заліза, рибофлавін, тіаміну гідрохлорид, піридоксину гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B12 розчин, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та ВДІ

Комбінація 3:

Казеїнове середовище, хлорид кальцію, дікалійфосфат, декстроза безводна, натрію хлорид, сульфат цинку, рибофлавін, тіаміну гідрохлорид, піридоксину гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B12 розчин, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та ВДІ

Комбінація 4:

Казеїновий гідролізат, хлорид кальцію, дікалійфосфат, декстроза безводна, натрію хлорид, сульфат магнію, діхлорид марганцю, рибофлавін, тіаміну гідрохлорид, піридоксину гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B12 розчин, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та ВДІ

У ще одному аспекті сьомого варіанту дифтерійний токсин та токсин правця детоксифікували за допомогою одного або комбінації наступних методів інактивації, які включають тепло, УФ, формалін/формальдегід, ацетилетиленімін та ін.

5 Згідно з восьмим варіантом цього розкриття антиген гепатиту (Нер), який використовується в комбінованій вакцинній композиції, містить Нер-антигени, отримані з поверхні штаму гепатиту В (HBsAg).

В одному з аспектів дев'ятого варіанту HBsAg може бути отриманий одним із таких способів.

- Очищення антигену у вигляді частинок з плазми хронічних носіїв гепатиту В, великі кількості HBsAg синтезуються в печінці та вивільняються в кров під час зараження HBV.

10 - Експресія білка методами рекомбінантної ДНК.

Згідно дев'ятого варіанту цього розкриття, дифтерійний анатоксин (D), анатоксин правця (Т) та поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) індивідуально адсорбуються на ад'юванті, вибраного з групи солі алюмінію (Al³⁺), наприклад: гідроксид алюмінію (Al(OH)₃) або фосфат алюмінію (AlPO₄), алюміній, фосфат кальцію, MPLA, 3D-MPL, QS21, олігодезоксинуклеотидний ад'ювант, що містить CrG, ліпосома або водно-масляна емульсія чи їх комбінація.

15 Однак переважно дифтерійний анатоксин (D), анатоксин правця (Т) та поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) індивідуально адсорбуються фосфатом алюмінію.

В одному з аспектів дев'ятого варіанту дифтерійний анатоксин (D) адсорбується на фосфаті алюмінію з відсотковою адсорбцією принаймні 50 %.

20 В іншому аспекті дев'ятого варіанту анатоксин правця (Т) адсорбується на фосфаті алюмінію з відсотковою адсорбцією принаймні 40 %.

У ще одному аспекті дев'ятого варіанту поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) адсорбується на фосфаті алюмінію з відсотковою адсорбцією принаймні 70 %.

25 Відповідно до десятого варіанту цього розкриття, Hib-антиген, який використовується в комбінованій вакцині цього розкриття, походить від капсульного полісахариду штаму Hib b 760705.

Згідно з одним аспектом десятого варіанту, PRP антигену HiP b кон'югується з білком-носієм, обраним із групи білка-носія, що складається, серед іншого, з таких компонентів: CRM197, дифтерійний анатоксин, комплекс зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*, фрагмент С анатоксину правця, кашлюковий анатоксин, білок D *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST та екзотоксин А з *Pseudomonas aeruginosa*, комплекс зовнішньої мембрани с (OMPC), порини, білки, що зв'язують трансферин, пневмолізін, поверхневий білок пневмокока А (PspA), поверхневий пневмококовий адгезин А (PsaA), пневмококовий PhtD, пневмококові поверхневі білки BVH-3 та BVH-11, захисний антиген (PA) *Bacillus anthracis*, детоксифікований набряковий фактор (EF) та летальний фактор (LF) *Bacillus anthracis*, овальбумін, гемоціанін лімфи равлика (KLH), альбумін сироватки людини, альбумін бичачої сироватки (BSA) та сухий туберкулін, очищений від білків середовища (PPD), синтетичні пептиди, білки теплового шоку, білки кашлюку, цитокіни, лімфокіни, гормони, фактори росту, штучні білки, що містять багато епітопів CD4+Т-клітин людини від різних антигенів, похідних від патогенів, таких як N 19, протеїни, що поглинають залізо, токсин А або В з білків *C. difficile* та *S. agalactiae*.

40 Тим не менш, оптимально, щоб Hib b PRP кон'югувався з правцевим анатоксином (ТТ) за допомогою хімії CNBr, хімії відновного амінування, хімії ціанілування або будь-якої іншої хімії, вже розкритої Kniskern et al., "Кон'югація: дизайн, хімія та аналіз" та Ellis et al. "Розробка та клінічне застосування вакцин *Haemophilus b* на основі кон'югату". New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69

45 Згідно другого аспекту десятого варіанту, білок-носії присутній як у вільній, так і у кон'югованій формі в композиції цього розкриття, некон'югована форма переважно становить не більше 20 % від загальної кількості білка-носія в композиції як в цілому і, більш переважно, принаймні менше 5 % по масі.

50 Згідно третього аспекту десятого варіанту Hib-антиген не адсорбується по суті на будь-якому ад'юванті.

Згідно четвертого аспекту десятого варіанту Hib-антиген не може піддаватися навмисній або примусовій адсорбції на будь-якому ад'юванті.

Відповідно до одинадцятого варіанту цього розкриття, антиген цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP), використовуваний у складі комбінованої вакцинної композиції цього розкриття, переважно виготовляють із штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, змішаних у визначеному співвідношенні та згодом інактивованих за допомогою використання вдосконалених методів інактивації без застосування тімеросалу, що призводить до зниження реактогенності та збільшення специфічної активності і може або не може бути адсорбований на ад'ювантах на основі алюмінію.

Згідно першого аспекту одинадцятого варіанту, антиген цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP), використовуваний у складі комбінованої вакцинної композиції цього розкриття, переважно, виготовлений із штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, змішаних у співвідношенні 1:1:0,25:0,25.

5 Згідно другого аспекту одинадцятого варіанту, антиген цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP), використовуваний в комбінованій вакцинній композиції, був інактивований з використанням одного або декількох наступних методів інактивації, які включають тепло, УФ, формалін/формальдегід, ацетилетиленімін та ін.

10 Однак переважно антиген цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP), використовуваний в комбінованій вакцинній композиції, був інактивований комбінацією термічної та хімічної обробки. Однак переважно інактивована теплом при температурі 56 ± 2 °C протягом 10-15 хв у присутності формальдегіду маса wP залишається негрудкуватою і легко гомогенізованою, тим самим призводячи до зниження реактогенності та покращення активності wP протягом більш тривалого часу.

15 Згідно третього аспекту одинадцятого варіанту, антиген цільноклітинного кашлюкового компоненту (wP), використовуваний в комбінованій вакцинній композиції, може або не може бути адсорбований на ад'юванті на основі алюмінію, такому як гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію або їх комбінації (наприклад, до або після змішування з іншими компонентами, якщо є). При адсорбуванні один або кілька штамів wP (тобто 134, 509, 25525 і 6229) можуть бути адсорбовані окремо або разом у вигляді суміші.

20 Згідно дванадцятого варіанту цього розкриття, кількість дифтерійного анатоксину (D) становить 1-40 Lf; анатоксину правця (T) - 4-25 Lf; wP - 4-30 МОО на 0,5 мл; кількість кон'югату PRP-TT *H. Influenzae B* становить 1 - 20 мкг вмісту PRP на 0,5 мл; кількість антигену HBsAg становить від 1 до 20 мкг на 0,5 мл; ІПВ Сабін, що включає тип 1, тип 2 і тип 3, де тип 1 міститься в кількості 1 - 50 DU/0,5 мл, тип 2 в кількості 1 - 20 DU/0,5 мл і тип 3 в кількості 1 - 50 DU / 0,5 мл і додатково містить ад'ювант на основі алюмінію і консерванти в готовій комбінованій вакцинній композиції/рецептурі.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 25 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

30 При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 20 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

35 При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 4 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 2 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

40 При цьому оптимальна кількість wP становить близько 16 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 14 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

45 При цьому оптимальна кількість wP становить близько 12 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість кон'югату *H. Influenzae B* PRP-TT становить близько 13 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість кон'югату *H. Influenzae B* PRP-TT становить близько 10 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

50 При цьому оптимальна кількість кон'югату *H. Influenzae B* PRP-TT становить близько 8 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 15 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

55 При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 10 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 8 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

60 При цьому оптимальна кількість поліовакцини інактивованої штамом Сабін (sIPV), яка включає штами типу 1, типу 2 та типу 3, становить близько 40 DU, 8 DU та 32 DU відповідно на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

Згідно тринадцятого варіанту цього розкриття, кількість дифтерійного анатоксину (D) становить 1-40 Lf; анатоксину правця (T) - 4-25 Lf; wP - 4-30 МОО на 0,5 мл; кількість кон'югату PRP-TT H. Influenzae B становить 1 - 20 мкг вмісту PRP на 0,5 мл; кількість антигену HBsAg становить від 1 до 20 мкг на 0,5 мл; поліовірус, інактивований штамом Солк (IPV), що включає

5

штами Mahoney типу 1, MEF типу 2 та Saukett типу 3, при цьому штам Mahoney типу 1 міститься в кількості 1-50 DU/0,5 мл, MEF типу 2 міститься в кількості 1-20 DU/0,5ml і Saukett типу 3 міститься в кількості 1-50 DU/0,5 мл з додатковим вмістом ад'юванту і консервантів на основі алюмінію у готовій комбінованій вакцинній композиції/складі.

10

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 25 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 20 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

15

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 4 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

20

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 2 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 16 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 14 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

25

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 12 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 13 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

30

При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 10 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 8 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

35

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 15 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 10 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 8 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

40

При цьому оптимальна кількість поліовакцини, інактивованої штамом Солк, яка включає

штами Mahoney типу 1, MEF типу 2 та Saukett типу 3 становить близько 40 DU, 8 DU та 32 DU відповідно на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

Згідно чотирнадцятому варіанту цього розкриття, кількість дифтерійного анатоксину становить 1-40 Lf; анатоксину правця - 4-25 Lf; wP - 4-30 МОО на 0,5 мл; кількість кон'югату PRP-TT H. Influenzae B становить 1 - 20 мкг вмісту PRP на 0,5 мл; кількість Нер-антигену становить від 1 до 20 мкг на 0,5 мл; поліовакцина, інактивована зменшеною дозою штаму Сабін (сіПВ), що використовується у складі комбінованої вакцини і включає тип 1, тип 2 та тип 3, де тип 1 міститься в кількості 2,5-10 DU/0,5 мл, тип 2 міститься в кількості 5-20 DU/0,5 мл, а тип 3 міститься в кількості 1-20 DU/0,5 мл з додатковим вмістом ад'юванту і консервантів на основі алюмінію у готовій комбінованій вакцинній композиції/рецептурі.

45

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 25 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 20 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

55

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (T) становить близько 4 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (Т) становить близько 2 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 16 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

5 При цьому оптимальна кількість wP становить близько 14 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 12 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

10 При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 13 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 10 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 8 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

15 При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 15 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 10 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

20 При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 8 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість поліовакцини, інактивованої зменшеною дозою штаму Сабін (сіПВ), яка включає штами типу 1, типу 2 та типу 3, становить близько 5 DU, 16 DU та 10 DU відповідно на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

25 Згідно п'ятнадцятого варіанту цього розкриття, кількість дифтерійного анатоксину становить 1-40 Lf; анатоксину правця - 4-25 Lf; wP - 4-30 МОО на 0,5 мл; кількість кон'югату PRP-TT H. Influenzae B становить 1 - 20 мкг вмісту PRP на 0,5 мл; кількість Нер-антигену становить від 1 до 20 мкг на 0,5 мл; поліовакцина, інактивована зменшеною дозою штаму Солк, що включає штами Mahoney типу 1, MEF типу 2 та Saukett типу 3, при цьому штам Mahoney типу 1 міститься в кількості 5-15 DU/0,5 мл, MEF типу 2 міститься в кількості 1-18 DU/0,5ml і Saukett типу 3 міститься в кількості 5-15 DU/0,5 мл з додатковим вмістом ад'юванту і консервантів на основі алюмінію у готовій комбінованій вакцинній композиції/складі.

30 При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 25 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

35 При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 20 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість дифтерійного анатоксину (D) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (Т) становить близько 10 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

40 При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (Т) становить близько 4 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість анатоксину правця (Т) становить близько 2 Lf у готовій комбінованій вакцинній композиції.

45 При цьому оптимальна кількість wP становить близько 16 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 14 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість wP становить близько 12 МОО на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

50 При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 13 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 10 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

55 При цьому оптимальна кількість кон'югату H. Influenzae B PRP-TT становить близько 8 мкг вмісту PRP на 0,5 мл.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 15 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 10 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість антигену HBsAg становить близько 8 мкг на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

При цьому оптимальна кількість поліовакцини, інактивованої зменшеною дозою штаму Солк, яка включає штами Mahoney типу 1, MEF типу 2 та Saukett типу 3 становить близько 10 DU, 2 DU та 10 DU відповідно на 0,5 мл у готовій комбінованій вакцинній композиції.

Згідно шістнадцятого варіанту цього розкриття, один або більше антигенів готової комбінованої вакцинної композиції не можуть бути по суті адсорбованими на будь-якому ад'юванті.

Згідно сімнадцятого варіанту цього розкриття, композиція містить один або більше ад'ювантів, вибраних із групи солі алюмінію (Al^{3+}), наприклад, гідроксид алюмінію ($Al(OH)_3$) або фосфат алюмінію ($AlPO_4$), алюміній, фосфат кальцію, MPLA, 3D-MPL, QS21, олігодезоксинуклеотидний ад'ювант, що містить CpG, ліпосому або водно-масляну емульсію.

При цьому оптимальна композиція містить в якості ад'юванту фосфат алюмінію ($AlPO_4$).

В одному з аспектів сімнадцятого варіанту антигени готової композиції можуть бути адсорбовані in situ на гелі ортофосфату алюмінію або на готовому гелі ортофосфату алюмінію чи їх комбінації.

В одному з оптимальних аспектів сімнадцятого варіанту композиція цього розкриття може містити ад'ювант у кількості 2,5 мг/0,5 мл або менше, а конкретно, у кількості від 1,5 мг/0,5 мл до 0,1 мг/0,5 мл

При цьому в іншому оптимальному аспекті сімнадцятого варіанту вміст алюмінію (Al^{3+}) у готовій комбінованій вакцинній композиції/рецептурі може бути не більше 1,25 мг на 0,5 мл, переважно 1 мг на 0,5 мл і найбільш переважно у кількості 0,1 мг на 0,5 мл до 0,63 мг на 0,5 мл.

Згідно вісімнадцятого варіанту цього розкриття, комбінована вакцинна композиція/рецептура може містити консервант, обраний із групи, що включає: 2-феноксіетанол, бензетонію хлорид (фемерол), фенол, тіомерсал, формальдегід, метилові та пропільні парабени або бензиловий спирт чи їх комбінація.

При цьому оптимальна комбінована композиція/рецептура може містити 2- феноксіетанол (2-POE) в якості консерванту.

Згідно ще одного аспекту винаходу кількість 2 - феноксіетанолу в комбінованій вакцині згідно винаходу не може бути більше, ніж оптимально 3,5 мг/0,5 мл; більш оптимально 3,0 мг/0,5 мл; і найбільш оптимально 2,5 мг/0,5 мл.

Згідно дев'ятого варіанту цього розкриття, комбінована вакцинна композиція/рецептура цього розкриття може містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, вибрані з групи, що включає цукри і поліоли, ПАР, полімери, солі, амінокислоти, модифікатори pH (регулювання pH вакцинної композиції) тощо. Приклади цукрів та поліолів, які слід використовувати, можуть включати сахарозу, трегалозу, лактозу, мальтозу, галактозу, маніт, сорбіт, гліцерин тощо. Приклади ПАР можуть включати неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбат 20, полісорбат 80 тощо. Приклади полімерів можуть включати декстран, карбоксиметилцелюлозу, гіалуронову кислоту, циклодекстрин тощо. Приклади солей можуть включати NaCl, $MgCl_2$, KCl, $CaCl_2$ тощо. Приклади амінокислот можуть включати аргінін, гліцин, Приклади модифікаторів pH можуть включати гідроксид натрію, соляну кислоту тощо.

Згідно двадцятого варіанту цього розкриття, зазначена комбінована вакцина може бути ліофілізованою або рідкою композицією, переважно рідкою.

Згідно двадцять першого варіанту цього розкриття, зазначена комбінована вакцина може бути стабільною при температурі 2-8 °C протягом періоду від 12 до 36 місяців; при температурі 25 °C протягом від 2 до 6 місяців; при температурі 37 °C - від 1 тижня до 4 тижнів, з кінцевим pH у діапазоні від 6,0 до 7,0; більш оптимально в діапазоні pH від 6,2 до 6,8; і найбільш оптимально в діапазоні pH від 6,3 до 6,7.

Згідно двадцять другого варіанту цього розкриття, заявник виявив, що стабільну багатовалентну вакцину з покращеною імуногенністю та зниженою реактогенністю можна отримати, коли вакцина виготовляється способом, представленим нижче, з урахуванням i) процесу виготовлення окремих антигенів ii) послідовності додавання антигенів iii) використання специфічних ад'ювантів у певній кількості для певних антигенів; iv) індивідуальної адсорбції або комбінованої адсорбції антигенів на ад'ювантах v) ступеня адсорбції антигену на ад'юванті; оптимальної концентрації та типу консерванту та viii) використання різних параметрів, включаючи перемішування, температуру та pH.

Біологічне джерело штамів, що використовуються в комбінованій вакцині SIPL

Дифтерійний анатоксин:

Штам *Corynebacterium diphtheriae* PW8 CN2000 був отриманий з дослідницької лабораторії "Wellcome", Лондон, Великобританія, Центральним науково-дослідним інститутом національного органу контролю (C.R.I.) Kasauli, Himachal Pradesh, Індія в ліофілізованому вигляді в 1973 р. Штам був відновлений і додатково ліофілізований як серія виробничого штаму

5 C. diphtheriae CN2000 A1 at C.R.I. Kasauli.

Правцевий анатоксин

Штам *Clostridium tetani* Harvard Strain No.49205 був отриманий Національним органом контролю C.R.I. з Інституту The Rijks Institute Voor de Volksgezondheid (Нідерланди). Kasauli, у ліофілізованій формі.

10 Кашлюк

Виробництво маси кашлюкової вакцини в SIPL передбачає використання чотирьох штамів *Bordetella pertussis* viz. Штами 134, 509, 6229 та 25525. Виробничі штами 134 та 509 отримані з Інституту Rijks, Нідерланди, через Національний орган контролю, Центральний науково-дослідний інститут, Kasauli, Himachal Pradesh, Індія. Виробничі штами 6229 та 25525 отримані з

15 Інституту Лістера, Англія.

Гепатит В:

В Rhein Biotech (Німеччина) розроблено рекомбінантний штам *Hansenulapolyomorpha*, що містить ген поверхневого антигену HBsAg. В Rhein Biotech також створено Головний банк клітин (MCB *Hansenulapolyomorpha* K3/8-1 штам ADW, 12/94) і проведено усі випробування з визначення характеристик цього банку.

20 Наемophilus influenzae типу В:

Вихідним організмом для генерації клітинного субстрату є *Haemophilus influenzae* типу В, штам 760705. Спочатку штам був виділений у хлопчика віком 2 роки 2 місяці (народився 14.08.1974 р.) у листопаді 1976 року. Було проведено три пересіви штаму до його зберігання при температурі -70 °C в Академічному медичному центрі (AMC) університету Амстердаму. Цей штам було передано SIPL у рамках співпраці між SIPL та Нідерландським інститутом вакцин (NVI, Нідерланди).

25

ІПВ:

Штам та джерело поліовірусу представлені нижче.

30 Поліовірус типу 1:

Штам: Mahoney

Джерело: Dr. J.Salk (компанія Pitman & Moore)

Поліовірус типу 2:

Штам: MEF1

35 Джерело: Statens Serum Institute, Копенгаген

Поліовірус типу 3:

Штам: Saukett

Джерело: Statens Serum Institute, Копенгаген

40

В цьому документі специфікації слово "містить" або варіації, такі як "складається з" або "включає", означають, що вони включають вказаний елемент, ціле число або крок, або групу елементів, цілих чисел або кроків, але не виключення будь-якого іншого елемента, цілого чи кроку, або групи елементів, цілих чисел або кроків.

Використання виразу "щонайменше" або "щонайменше один" передбачає використання одного або декількох елементів або інгредієнтів або кількостей, оскільки використання може бути у втіленні винаходу для досягнення однієї або кількох бажаних цілей або результатів. Хоча окремі варіанти винаходів були описані, ці варіанти були представлені лише в якості прикладу і не призначені для обмеження сфери застосування винаходів. Варіанти або модифікації складу цього винаходу в межах винаходу можливі з боку фахівців в даній області техніки при розгляді розкриття в даному документі. Такі варіації або модифікації належним чином відповідають суті

50 цього винаходу.

Числові значення, наведені для різних фізичних параметрів, розмірів і величин, є лише приблизними значеннями, і передбачається, що значення, які перевищують числове значення, присвоєні фізичним параметрам, розмірам і величинам, підпадають у сферу застосування винаходу, якщо немає іншого твердження в специфікації.

55

Незважаючи на те, що було зроблено значний акцент на конкретних особливостях кращого варіанту, слід розуміти, що багато додаткових функцій можна додати та внести зміни до оптимального варіанту, не відхиляючись від принципів розкриття. Ці та інші зміни в оптимальному варіанті розкриття є очевидними для фахівців у цій галузі техніки на основі даного розкриття; тому слід чітко розуміти, що вищевказаний описовий матеріал повинен тлумачитися лише як ілюстративне розкриття, а не як обмеження.

60

Переваги

Дане розкриття, описане в цьому документі, має ряд технічних досягнень та переваг, включаючи, серед іншого, реалізацію комбінованої вакцинної композиції, що включає D, T, wP, HBsAg, кон'югат Hib PRP-TT та ІПВ та спосіб її виготовлення. У порівнянні з іншою

- 5 комбінованою вакцинною композицією, дане розкриття забезпечує наступні переваги:
 1. повністю рідка комбінована вакцина
 2. підвищена імуногенність
 3. знижена реактогенність
 4. підвищена стабільність при температурі 2-8 °C та при кімнатній температурі,

10 випробовувана протягом 12 місяців.

5. Високоочищені дифтерійні анатоксини (D) та анатоксини правця (T), отримані з використанням напівсинтетичного середовища без вмісту трансмісивної губчастої енцефалопатії (TSE) або губчастої енцефалопатії великої рогатої худоби (BSE).

15 6. Антиген цілюноклітинного *B. pertussis* (wP) включає штами *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229 у співвідношенні 1:1:0,25:0,25, тим самим покращуючи специфічну активність та імуногенність проти *B. pertussis*.

7. Удосконалений метод інактивації цілюноклітинного компонента *B. pertussis* (wP) з використанням комбінованої інактивації теплом та формальдегідом. В процесі не використовують тімеросал, а інактивованій цілюноклітинний кашлюковий антиген залишається

20 негрудкуватим та гомогенним, що призводить до зниження реактогенності та покращення специфічної активності протягом більш тривалого часу.

8. Низький вміст вільного PRP (менше 7 %) у загальній масі кон'югату PRP-TT *Haemophilus influenzae* типу b

25 9. Покращений профіль адсорбції антигену дифтерійного анатоксину (D), антигену анатоксину правця (T) та поверхневого антигену гепатиту B (НерВ), адсорбованого окремо на ад'юванті на основі фосфату алюмінію, покращуючи тим самим специфічну активність та імуногенність.

10. Мінімальний вміст алюмінію (Al^{3+}), що забезпечує знижену реактогенність.

11. Оптимальна концентрація 2-феноксіетанолу (2-PE) в якості консерванту.

30 Приклади

Наступні приклади включені для демонстрації оптимальних варіантів винаходу. Фахівцям у цій галузі техніки слід визнати, що композиції та методи, розкриті в поданих нижче прикладах, являють собою методи, відкриті винахідником, які функціонуватимуть належним чином в практиці винаходу, і, таким чином, можна вважати такими, що представляють собою оптимальні

35 способи практичного застосування. Однак, фахівці в даній області техніки повинні, зважаючи на це розкриття, врахувати можливість внесення багатьох змін в конкретні варіанти, які розкриваються і все ще отримують подібні або аналогічні результати, не відступаючи від суті та сфери застосування винаходу.

Приклад 1:

40 Таблиця 1: У цій таблиці наведено короткий опис відсоткової адсорбції окремих антигенів, профілю специфічної активності та стабільності окремих антигенів у комбінованій вакцині SIPL при температурі 2-8 °C протягом 12 місяців.

Таблиця 1

Граничні умови	випробування/Специфікація	0 днів	6 місяців	12 місяців
Гепатит В Специфічна активність In-Vivo R.P (95 % CL)	NLT 1,0	Відповідає	Н/З	Відповідає
Вміст Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Загальний PRP)	Фактичне значення	8,1 мкг/0,5 мл	8,46 мкг/0,5 мл	10,03
Специфічна активність дифтерійного компоненту (МО/доза)	NLT 30 МО/доза.	98,5120 МО/доза (69,9650-137,247)	Н/З	95,8463 МО/доза
Специфічна активність правцевого компоненту (МО/доза)	NLT 40 МО/доза	139,030 МО/доза (88,2850-208,688)	Н/З	382,079 МО/доза
Специфічна активність кашлюкового компоненту (МО/доза)	NLT 4 МО/доза	4,6749 МО/доза (2,6492-8,2763)	4,8410 МО/доза (2,7331-8,6081)	5,131
Адсорбція гепатиту В (%)	Фактичне значення	89,44	82,65	75,52
Адсорбція: Правцевий компонент (%)	Фактичне значення	59,0	41,0	Н/З
Адсорбція: Дифтерійний компонент (%)	Фактичне значення	79,0	72,0	Н/З
D-антиген (DU/0,5 мл)	Тип 1=40 DU/0,5 мл, тип 2=8 DU/0,5 мл та тип 3=32 DU/0,5 мл (= 75 % від номінального значення прийняте)	Відповідає	Відповідає	Відповідає

Н/З - не застосовано

: Короткий опис відсоткової адсорбції окремих антигенів, профілю специфічної активності та стабільності окремих антигенів у комбінованій вакцині при температурі 25±2 °С протягом 12 місяців.

Таблиця 2

Граничні умови	випробування/Специфікація	0 днів	6 місяців	12 місяців
Гепатит В Специфічна активність In-Vivo R.P (95 % CL)	NLT 1,0	Відповідає	Н/З	Відповідає
Вміст Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Загальний PRP)	Фактичне значення	8,6 мкг/0,5 мл	8,20 мкг/0,5 мл	Н/З
Специфічна активність дифтерійного компоненту (МО/доза)	NLT 30 МО/доза.	98,5120 МО/доза (69,9650-137,247)	Н/З	96,5482 МО/доза (65,9292-137,687)
Специфічна активність правцевого компоненту (МО/доза)	NLT 40 МО/доза	139,030 МО/доза (88,2850-208,688)	Н/З	Н/З
Специфічна активність кашлюкового компоненту (МО/доза)	NLT 4 МО/доза	4,6749 МО/доза (2,6492-8,2763)	4,5170 МО/доза (2,4894-8,2672)	3,4899 МО/доза (1,8699*-6,4750)
Адсорбція гепатиту В (%)	Фактичне значення	89,44	83,92	83,00
Адсорбція: Правцевий компонент (%)	Фактичне значення	59,0	31,0	40,0
Адсорбція: Дифтерійний компонент (%)	Фактичне значення	79,0	72,0	69,0
D-антиген (DU/0,5 мл)	Тип 1=40 DU/0,5 мл, тип 2=8 DU/0,5 мл та тип 3=32 DU/0,5 мл (= 75 % від номінального значення прийняте)	Відповідає	Відповідає	Відповідає

Н/З - не застосовано

Приклад 2:

Цей приклад дає короткий опис різних комбінованих вакцинних композицій:

Таблиця 3:

Комбінована вакцинна композиція 1		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf
3	Антиген інактивованого <i>B. pertussis</i> (wP)	12-16 МОО
4	HBs-антиген	7-15 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	7-13 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	2-феноксіетанол	2,5 мг
9	Хлорид натрію	4,5 мг

Таблиця 4:

Комбінована вакцинна композиція 2		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf
3	Антиген інактивованого <i>B. pertussis</i> (wP)	12-16 МОО
4	HBs-антиген	7-15 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	7-13 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	Хлорид натрію	4,5 мг

Таблиця 5:

Комбінована вакцинна композиція 3		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02 Lf
3	Антиген інактивованого <i>B. pertussis</i> (wP)	12 МОО
4	HBs-антиген	8 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	8 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	2-феноксіетанол	2,5 мг
9	Хлорид натрію	4,5 мг

Таблиця 6:

Комбінована вакцинна композиція 4		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02 Lf
3	Антиген інактивованого B. pertussis (wP)	12 МОО
4	HBs-антиген	8 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	8 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	Хлорид натрію	4,5 мг

Таблиця 7:

Комбінована вакцинна композиція 5		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	20 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	04 Lf
3	Антиген інактивованого B. pertussis (wP)	14 МОО
4	HBs-антиген	15 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	10 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	2-феноксіетанол	2,5 мг
9	Хлорид натрію	4,5 мг

Таблиця 8:

Комбінована вакцинна композиція 6		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	20 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	04 Lf
3	Антиген інактивованого B. pertussis (wP)	14 МОО
4	HBs-антиген	15 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	10 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	Хлорид натрію	4,5 мг

Таблиця 9:

Комбінована вакцинна композиція 7		
п/н	Компоненти складу	Антиген одиниця/0,5 мл дози
1	Дифтерійний анатоксин (D)	25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	10 Lf
3	Антиген інактивованого <i>B. pertussis</i> (wP)	16 МОО
4	НВs-антиген	15 мкг
5	Hib-антиген на основі кон'югату PRP-TT	13 мкг PRP
6	ІПВ типу I (одиниці D-антигену)	40
	Типу II (одиниці D-антигену)	8
	Типу III (одиниці D-антигену)	32
7	Адсорбується на фосфаті алюмінію (Al ³⁺)	Не більше ніж 0,6 мг
8	Хлорид натрію	4,5 мг

Вакцина може містити незначну кількість глютаральдегіду, формальдегіду, неоміцину, стрептоміцину та поліміксину В, які використовуються в процесі виготовлення

5 Приклад 3:

Процес виробництва кон'югованої маси *Haemophilus influenzae* типу b

Розгорнутий огляд етапів процесу виробництва кон'югованої маси *Haemophilus influenzae* типу b представлений шляхом опису 53 кроків процесу, коротко описаних нижче:

Крок 1: Колба для культивування інокуляту на етапі I (S1):

10 Флакон з робочим посівним матеріалом використовується для посіву інокуляту в колбі для культивування, яка містить 0,22 мкм відфільтрованого посівного середовища. Використовується одноразова колба ПЕТГ 125 мл з робочим об'ємом 25 мл. Цей етап виконується в шейкері-інкубаторі із контрольованим перемішуванням (200±50 об/хв) при температурі (36±2 °C). Після досягнення відповідного росту бактерій (OD₅₉₀ ≥ 1,0) культуру переносять на наступний етап інокуляції (етап S2), описаний у кроці 2. Виконують забарвлення методом Грама в якості внутрішньовиробничого контролю для забезпечення чистоти культури (грамнегативні кокобацили).

Крок 2: Колба для культивування інокуляту на етапі II (S2):

20 Етап інокуляції S2 передбачає використання колб Фернбаха на 2 л (S2A і S2B) з робочим об'ємом 800 мл. Колба S2A використовується для вимірювання OD₅₉₀, доки OD₅₉₀ не досягне критеріїв прийнятності, а колбу S2B використовують для інокуляції на етапі S3. В обидві колби завантажують стерилізоване шляхом фільтрації середовище, ідентичне етапу інокуляції S1. Колбу для етапу S1 використовують для інокуляції обох колб для етапу II. Цей етап виконується в шейкер-інкубаторі з контрольованим перемішуванням (200±50 об/хв) при температурі (36±2 °C). Після досягнення відповідного росту бактерій (OD₅₉₀ ≥ 1,0) культуру переносять на наступний етап інокуляції (етап S3), описаний в кроці 3. Виконують забарвлення методом Грама в якості внутрішньовиробничого контролю для забезпечення чистоти культури (грамнегативні кокобацили).

Крок 3: Ферментер для інокуляту етапу III:

30 На етапі інокуляції S3 використовують ферментер на 120 л з робочим об'ємом 35 л. У ферментер завантажують середовище, ідентичне попереднім етапам інокуляції. Використовують колбу для етапу S2 для посіву інокуляту в ферментері. Культивування здійснюють при температурі 2 °C, DO (10 % від заданої точки), перемішуванні (300-600 об/хв), аерації (1-5 LPM) і зворотному тиску (0,2 бар) у ферментері інокулята. Після досягнення відповідного росту бактерій (OD₅₉₀ ≥ 1,0) культуру переносять на наступний виробничий етап (етап S4), описаний в кроці 4. Виконують забарвлення методом Грама в якості внутрішньовиробничого контролю для забезпечення чистоти культури (грамнегативні кокобацили).

Крок 4: Ферментативне розщеплення у виробничому масштабі 1200 л:

40 Виробничий ферментер на 1200 л має робочий об'єм 800 л, в який завантажено компоненти основного середовища та стерилізований паром *in situ*. Згодом додають різні добавки для носія після проходження фільтра з розміром пор 0,22 мкм. Ферментер інокують культурою на етапі S3, отриманою під час виконання кроку 3. Ферментацію проводять при контрольованому розчиненому кисні (20 % - задана температура), температурі (36±2 °C), pH (7,1-7,4), перемішуванні (40-400 об/хв), аерації (50-300 LPM) і тиску (0,2 бар). Під час ферментації додають дві дискретні біогенні речовини. Зростання контролюється за допомогою вимірювання

OD₅₉₀ (OD₅₉₀ ≥ 3,5), а ферментація вважається завершеною після досягнення стійкого рівня. Під час росту та фази стійкого рівня полісахаридний продукт секретується та накопичується у бульйонній культурі. Виконують забарвлення методом Грама в якості внутрішньовиробничого контролю для забезпечення чистоти культури (грамнегативні кокобацilli).

5 Крок 5: Обробка формаліном:

Зниження біонавантаження на цьому етапі досягають за допомогою хімічного агента (формаліну). Додають 0,1 % формаліну і інкубують ферментований бульйон протягом НМН 2 годин при температурі 37 °С. Після обробки формаліном посудину швидко охолоджують до <15 °С. Валідовано, що додавання формаліну дозволяє досягти зменшення біологічного навантаження. Це підтверджується за допомогою культуральних планшетів після періоду інкубації. Бульйон зі зменшеним біонавантаженням готовий до збирання, як описано в кроці 6.

10 Крок 6: Збирання при постійному центрифугуванні:

Безперервне центрифугування застосовують як основний етап збирання. Цей етап виконується для відділення полісахариду, що містить сирий бульйон, від інактивованої біомаси. Безперервну центрифугу використовують з метою вилучення > 90 % біомаси на основі вимірювань відповідно до показників зменшення OD₅₉₀. Центрифуга працює приблизно при 15000 г та при швидкості потоку рідини 200-500 л/год. Центрифугований супернатант додатково обробляють, як описано в кроці 7.

20 Крок 7: Глибина фільтрація 50LP:

Центрифугований супернатант пропускають через фільтр глибиною 50LP для видалення грубого матеріалу, такого як клітинний дебрис. Під час виконання цього кроку продукт пропускають через фільтрат відповідно до застосування додаткового глибинного фільтра, як описано в кроці 8.

25 Крок 8: Глибина фільтрація 90LP:

Фільтрат, отриманий з глибинного фільтра 50LP далі пропускають через глибинний фільтр 90LP (номінальний показник 0,22 мкм) для подальшого видалення будь-якого нерозчинного матеріалу, який, можливо, не був відфільтрований попереднім глибинним фільтром. Цей крок гарантує, що фільтрат, по суті, не містить клітинного дебрису і його можна пропустити через фільтр з розміром пор 0,22 мкм. Наступний крок фільтрації описаний в кроці 9.

30 Кроки 9 та 10: Фільтрація при розмірі пор фільтра 0,22 мкм:

Фільтрат після проходження глибинного фільтра 90LP далі пропускають через фільтр з розміром пор 0,22 мкм, фільтрат збирають у накопичувальний резервуар.

35 Кроки 11 та 12: Концентрація та діафільтрація 100 кД:

Цей крок проводиться для видалення компонентів середовища та домішок з невеликою молекулярною масою. Крім того, проводиться концентрація для зменшення робочого об'єму. Обирають граничне значення молекулярної маси 100 кД, оскільки молекулярна маса полісахариду Hib (PRP) становить ≥ 500 кД. Бульйон концентрують приблизно в 10 разів і згодом діафільтрують для отримання обсягів НМН 5, використовуючи 0,01 М фосфатно-сольового буферного розчину (pH 7,2). Отриманий у концентраті продукт називається "сирим PRP" і далі обробляється, як описано в кроці 13. Концентрований бульйон переносять в зону DSP через порт для перенесення через 0,22 мкм-фільтр, щоб гарантувати, що жодна бактерія не потрапить в зону DSP.

40 Крок 13: Осадження ЦТАБ:

ЦТАБ (цетилтриметиламоній бромід) – це катіонний миючий засіб, який використовується для осадження полісахариду. ЦТАБ складається з гідрофільної області, а також гідрофобної частини і осаджує білок, нуклеїнову кислоту та полісахарид. Неочищений PRP, отриманий під час виконання кроку 12, осаджують при концентрації 1 % ЦТАБ й інкубують протягом > 2 годин. Збір гранул ЦТАБ описаний в кроці 14.

50 Кроки 14, 15 і 16: Центрифугування, збирання та зберігання гранул ЦТАБ:

У SEZ-3, FF, гранули ЦТАБ центрифугують з використанням центрифуги безперервної дії при 15000 об/хв. Гранули ЦТАБ збирають, зважують, аліквотують і зберігають при ≤ -20 °С для подальшої обробки. Це перший внутрішньовиробничий крок утримування.

55 Кроки 17 та 18: Розморожування та розчинення пасти ЦТАБ:

Заморожену пасту ЦТАБ розморожують до кімнатної температури. Розморожені гранули розчиняють у 5,85 % розчині NaCl. Розчинення здійснюють у змішувачі, а полісахаридний продукт розчиняють у водній фазі. У резервуарі міститься певна кількість нерозчинного матеріалу, який надходить з осаджених білків та нуклеїнової кислоти. Цю суспензію додатково обробляють, як описано в кроці 19.

Крок 19: Центрифугування:

Матеріал, отриманий під час виконання кроку 18, центрифугують при температурі 2-8 °С, 5000-6500 об/хв протягом 20-30 хвилин для видалення нерозчиненого матеріалу. Центрифугований супернатант збирають і далі обробляють, як описано в кроці 20.

Крок 20: Осадження 72 % етанолу:

5 72 % етанол використовують для осадження PRP. 96 % етанол використовують для отримання готової концентрації 72 % етанолу з урахуванням супернатанту, отриманого при виконанні кроку 19. Осадження здійснюють при температурі 2-8 °С протягом ночі. Отриманий осад збирають, як описано в кроці 21.

Кроки 21 та 22: Центрифугування та розчинення гранул:

10 Осад 72 % -ного етанолу збирають центрифугуванням при температурі 2-8 °С, 5000-6500 об/хв протягом 20-30 хвилин. Отримані гранули розчиняють у ВДІ до отримання видимої прозорості. Подальша обробка солубілізованих гранул описана в кроці 23.

Крок 23: Осадження DOC та 32 % етанолу:

15 До матеріалу, отриманого під час виконання кроку 22 додають 6 % ацетат натрію та 1 % дезоксихолат натрію (DOC). 96 % етанол використовують для отримання готової концентрації 32 % етанолу. DOC і 32 % спирт призводять до осадження білкових домішок, дозволяючи полісахариду перебувати в рідкій фазі. Цей осад витримують при температурі 2-8 °С протягом ночі (НМН 8 год.).

Крок 24: Центрифугування:

20 Матеріал, отриманий під час виконання кроку 23, центрифугують при температурі 2-8 °С, 5000-6500 об/хв протягом 20-30 хвилин для видалення осаду. Центрифугований супернатант збирають і далі обробляють як описано в кроці 25.

Крок 25: Глибина та вуглецева фільтрація:

25 Супернатантний розчин, отриманий при виконанні кроку 24, містить розчинний PRP і піддається глибинній фільтрації з подальшою вуглецевою фільтрацією для видалення нуклеїнових кислот і барвника. Видалення нуклеїнових кислот контролюється шляхом періодичного вимірювання поглинання при 260 нм (A_{260}). Після досягнення необхідного значення A_{260} розчин фільтрують через фільтр з розміром пор 0,22 мкм і цей відфільтрований розчин додатково обробляють, як описано в кроці 26.

30 Крок 26: Осадження 64 % етанолу:

Відфільтрований матеріал, отриманий при виконанні кроку 25, додатково осаджують 96 % етанолом при готовій концентрації 64 % етанолу. Осадження здійснюють при температурі 2-8 °С протягом ночі. Отриманий осад збирають шляхом центрифугування і далі обробляють як описано в кроці 27.

35 Крок 27: Збір та розчинення гранул:

Супернатант декантирують і відкидають для збору гранул. Гранули розчиняють у ВДІ при кімнатній температурі.

Крок 28: Концентрація та діаліфільтрація 300 кД:

40 Розчин розчинених гранул концентрують за допомогою мембрани NMWCO 300 кД. Потім додатково діаліфільтрують не менше ніж (НМН) 8 разів за допомогою ВДІ. Отриманий концентрат обробляють далі, як описано в кроці 29.

Кроки 29 та 30: 0,22 мкм фільтрація та зберігання очищеного PRP:

45 Концентрат UF 300 кД пропускають через фільтр з розміром пор 0,22 мкм в якості кроку очистки для мінімізації біологічного навантаження. Отриманий очищений PRP аліквотують і зберігають при температурі ≤ -20 °С до подальшого використання, як описано в кроці 31. Зразок очищеного PRP відправляють на аналіз контролю якості.

Крок 31: Розморожування та об'єднання:

50 Виходячи з обсягу серії кон'югату, розморожують відповідну кількість нативного полісахариду, отриманого при виконанні кроку 30. Об'єднаний матеріал аналізують на вміст PRP, який необхідний для подальшої обробки, як описано в кроці 32.

Крок 32: Концентрація 100 кД:

Для подальшої обробки мінімальна концентрація об'єднаного очищеного полісахариду повинна становити 8-12 мг/мл. Якщо концентрація полісахариду в пулі нижче необхідної, об'єднаний розчин полісахариду концентрують за допомогою мембрани 100 кД UF NMWCO.

55 Пробу відбирають після концентрації, щоб забезпечити досягнення мінімальної концентрації для наступних кроків (крок 33).

Крок 33: Лужна деполімеризація:

Концентрований полісахарид (еквівалентний 74 г/110 г), отриманий при виконанні кроку 32, деполімеризують в легких лужних розчинах, використовуючи карбонат-бікарбонатний буфер.

Після досягнення необхідного об'єму полісахариду деполімеризований полісахарид активують, як описано в кроці 34.

Крок 34: Активація полісахариду:

5 Деполімеризований полісахарид, отриманий при виконанні кроку 33, активують за допомогою бромиду ціаногену. Активація проводиться в азотному середовищі. Ціаноген бромід є високотоксичною хімічною речовиною, тому слід дотримуватися необхідних заходів з техніки безпеки під час поводження з цим хімікатом.

Крок 35: Додавання лінкера:

10 Свіжоприготовлений розчин дигідрозиду адипінової кислоти (ADH) додають протягом 6-10 хвилин до реакційної суміші, отриманої при виконанні кроку 34. Реакцію проводять протягом НМН 16 годин при температурі 2-10 °С. Роль лінкера ADH полягає у забезпеченні в полісахариді аміногруп, необхідних для реакції кон'югації.

Крок 36: Концентрація та діафільтрація:

15 Реакційну суміш, отриману при виконанні кроку 35, концентрують і діафільтрують за об'ємом за допомогою фосфатно-сольового буферного розчину (PBS), використовуючи мембрану 10 кД UF-NMWCO для видалення вільної ADH. Видалення ADH контролюють за допомогою BPERX та продовжують діафільтрацію доки рівень вільної ADH не буде нижче 5 %. Отриманий концентрат додатково діафільтрують буфером NLT 5X MES-NaCl. Далі концентрують для отримання концентрації НМН 20 мг/мл. Цей концентрований оброблений PRP витримують при температурі 2-8 °С до подальшого використання, як описано в кроці 37.

20 Кроки 37 та 38: фільтрація через фільтр з розміром пор 0,22 мкм та зберігання обробленого PRP:

Концентрат, отриманий при виконанні кроку 36, пропускають через фільтр з розміром пор 0,22 мкм, що слугує етапом очищення. Це також забезпечує контроль рівня біологічного навантаження під час процесу, який виконується в зоні класу С. Відфільтрований активований полісахарид збирають, відбирають пробу, аліквотують і зберігають при температурі 2-8 °С до подальшої обробки. З обробленого полісахаридного пулу беруть зразок для аналізу, який включає молекулярний розмір PRP (кД), вміст PRP та ступінь активації PRP. Подальша обробка PRP описана в кроці 40.

30 Крок 39: Концентрація та діафільтрація 10 кД:

Реакція кон'югації потребує двох компонентів, а саме. обробленого полісахариду і білка-носія (ТТ). Білок-носії концентрують і діафільтрують буфером MES-NaCl з використанням мембрани 10 кД UF NMWCO. Потім цей діафільтрований білок-носії далі концентрують до НМН 20 мг/мл, використовуючи ту ж мембрану.

35 Крок 40: Кон'югація:

Реакція кон'югації потребує двох компонентів, а саме. обробленого полісахариду і білка-носія (ТТ). Активований полісахаридний компонент отримують при виконанні кроку 38. Білок-носії отримують при виконанні кроку 39. Два компоненти змішують у відповідних кількостях у співвідношенні PRP: ТТ=1:1 (мас./мас.) у присутності EDC при перемішуванні. Реакцію кон'югації контролюють за допомогою BPERX і продовжують доки конверсія білка не буде становити $\geq 85\%$ (на основі конверсії вільного білка в кон'югат).

Крок 41: Гасіння:

Після того як досягнуто критерії прийнятності реакції кон'югації відносно конверсії (крок 40), реакцію припиняють гасінням. Реакцію кон'югації гасять за допомогою фосфатного буфера ЕДТА. Реакція кон'югації згодом обробляється, як описано в кроці 42.

Крок 42: Фільтрація через фільтр 30 SP із розміром пор 0,22 мкм:

Кон'югат, отриманий при виконанні кроку 41, фільтрують через фільтр 30 SP з подальшою фільтрацією 0,22 мкм. Це забезпечує видалення будь-яких великих часточок. Відфільтрований кон'югат обробляють, як описано в кроці 43.

50 Крок 43: Ультрафільтрація та діафільтрація 300 кД:

Суміш, отриману після реакції кон'югації при виконанні кроку 42, діафільтрують 0,05 % -ним фізіологічним розчином з використанням мембрани 300 кД UF NMWCO. Діафільтрація проводиться для видалення кон'югаційних реагентів і ТТ, що не вступили у реакцію. Отриманий концентрат додатково обробляють, як описано в кроці 44.

55 Кроки 44 та 45: фільтрація через фільтр із розміром пор 0,22 мкм та зберігання попереднього PRP:

Концентрат, отриманий при виконанні кроку 43, пропускають через фільтр з розміром пор 0,22 мкм, що слугує етапом очищення. Це також забезпечує контроль рівня біологічного навантаження під час процесу, який виконується в зоні класу С. Відфільтрований попередній

кон'югат збирають, відбирають пробу та зберігають при температурі 2-8 °С до подальшої обробки. Подальша обробка попереднього кон'югату описана в кроці 46.

Крок 46: Розведення попереднього кон'югату:

Попередній кон'югат, отриманий при виконанні кроку 45, розводять ВДІ до цільової концентрації 4 ± 1 мг/мл, якщо потрібно, та додатково обробляються під час кроків осадження, як описано в кроці 47.

Крок 47: Осадження сульфату амонію:

Розведену суміш реакції кон'югації додатково обробляють для видалення вільного PRP з використанням сульфату амонію (матковий розчин 50 % мас./об.). Крок осадження виконують при температурі менше 15 °С та перемішуванні. При виконанні кроку осадження кон'югат осаджується і в супернатанті залишається вільний PRP. Після додавання сульфату амонію отриману суспензію зберігають при температурі менше 15 °С без перемішування протягом НМН 12 годин.

Крок 48: Збір та розчинення гранул:

Суспензію, отриману при виконанні кроку 47, центрифугують при ~ 7000 г при температурі 2-8 °С протягом 40 ± 10 хвилин. Супернатант відкидається декантацією, а отримана гранула розчиняється в трис-фізіологічному розчині.

Крок 49: Діафільтрація 300 кД:

Розчин, отриманий при виконанні кроку 48, фільтрують через глибинний фільтр 30 SP і діафільтрують 20 мМ трис-фізіологічним розчином з використанням мембрани NMWCO 300 кД.

Крок 50: Очищення за допомогою гель-фільтраційної хроматографії:

Розчин, отриманий при виконанні кроку 49, завантажують на колонку гель-фільтраційного хроматографа приблизно 70 L, що містить гідроксильований метакриловий гель з гранулами полімеру Toyopearl HW-65F для виконання ексклюзійної хроматографії за розміром. Використання гель-фільтраційної хроматографії для обробленого кон'югату (після обробки сульфатом амонію) знижує рівні вільного PRP в отриманому матеріалі. Колонку елюють із використанням розчину 20 мМ Tris 0,9 % NaCl, і збирають фракції на основі A_{280} . Відповідні фракції, на основі критеріїв прийнятності щодо вільного PRP, співвідношення та молекулярного розміру, об'єднують. Потім пул додатково обробляють, як описано в кроці 51.

Крок 51: Діафільтрація 300 кД:

Об'єднаний елюат кон'югату, отриманий при виконанні кроку 50, діафільтрують розчином 20 мМ Tris з використанням мембрани 300 кД UF NMWCO. Потрібний об'єм концентрату має бути таким, щоб вміст PRP в ньому становив приблизно 1 мг/мл.

Кроки 52 та 53: Фільтрація 0,22 мкм:

Масу кон'югату, отриману при виконанні кроку 51, фільтрують через фільтр з розміром пор 0,22 мкм в середовищі класу А для забезпечення стерильності. Фільтр з розміром пор 0,22 мкм випробовують на цілісність. Зразок відфільтрованої маси кон'югату надсилають для повного аналізу контролю якості. Відфільтрований кон'югат маркують як "Стерильна маса кон'югату Hib" і зберігають при температурі 2-8 °С. Маса кон'югату зберігатиметься при температурі 2-8 °С протягом максимум 3 місяців, після чого, якщо він не використовується, його можна зберігати при температурі -70 °С протягом до 1 року.

Якісні характеристики отриманого антигену кон'югату Hib PRP-TT:

Вміст PRP (мкг/0,5 мл): 8,1

Співвідношення (PRP:TT): 0,5

Вільний PRP (%): 4,8 %

PMW (kD): 983

Сер. MB (kD): 752

Приклад 4:

Метод інактивації цільноклітинного кашлюкового (wP) антигену:

Оптимізація методу інактивації виконується після проведення різних експериментів, які включають інактивацію при температурі 56 °С протягом 10 хв у присутності формальдегіду, 56 °С протягом 15хв у присутності формальдегіду, 56 °С протягом 10хв у присутності гімїну, 56 °С протягом 15хв у присутності гімїну і лише нагрівання при 56 °С протягом 30 хв. Значної різниці в специфічній активності за цими методами не спостерігалось. З цих методів вибирають 56 °С протягом 10 хв у присутності формальдегіду, оскільки маса клітин кашлюку, отримана за допомогою цього методу, є більш однорідною порівняно з іншими способами, зазначеними вище.

Процес виробництва інактивованого wP-антигену включає наступні етапи:

а). Інактивація при температурі 56 °С протягом 10 - 15 хвилин у присутності формальдегіду штамів Bordetella pertussis 134

b). Інактивація при температурі 56 °C протягом 10 - 15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 509

c). Інактивація при температурі 56 °C протягом 10 - 15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 25525 та 6229

5 d). Інактивація при температурі 56 °C протягом 10 - 15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 6229

e). Згодом змішують інактивовані штами *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229 у співвідношенні 1:1:0,25:0,25.

f). Необов'язково адсорбують на ад'юванті на основі алюмінію.

10 В процесі не використовують тімеросал, а інактивованій цільноклітинний кашлюковий антиген залишається негрудкуватим та гомогенним, що призводить до зниження реактогенності та покращення специфічної активності протягом більш тривалого часу.

Приклад 5: Процес виробництва інактивованого поліовірусу (ІПВ)

Поліовірус можна культивувати за допомогою таких методів:

15 - Клітинна лінія CCL81-VERO (нирка мавпи) використовувалася в якості клітини господаря для культивування поліовірусів, тобто штамів сабін та солк.

- Після інфікування клітин-господарів бажаним штамом поліовірусу та інкубації протягом 72 годин середовище, що містить вірус та клітинний дебрис об'єднували та збирали в один контейнер.

20 - Фільтрат піддавали тангенціальній потоковій фільтрації за допомогою касети 100KDa; діалізували з використанням фосфатного буфера і очищували за допомогою аніонообмінної хроматографії.

- До введення пацієнтам віруси повинні бути інактивовані за допомогою відповідних методів інактивації.

25 Етапи інактивації формаліном:

a) очищений пул вірусів піддавали буферному обміну від фосфатного буфера до трис-буфера в діапазоні (від 30 до 50 мМ) з рН від 7 до 7,5,

b) до вищевказаної суміші додавали середовище M-199, що містить гліцин (5 г/л)

c) додавали 0,025 % формальдегіду і потім змішували,

30 d) потім суміш інкубували при температурі 37 °C протягом 5-13 днів при постійному перемішуванні маси вірусу на магнітній мішалці,

e) пост-інкубаційну суміш обробляли на проміжній системі TFF (100 КДа, 0,1 м²) на 7-й день та остаточній фільтрації після інактивації

f) згодом відфільтровану частину зберігали при температурі 2-8 °C,

35 g) ІФА D-Ag для визначення одиниці D-Ag

Приклад 6:

В цьому прикладі стисло викладено процес виробництва комбінованої вакцинної композиції, що включає D, T, wP, HBsAg, Hib PRP-TT кон'югат і ІПВ:

1. Процедура формування компоненту I:

40 a). Перенесення фосфату алюмінію в контейнер/посудину

b). Додавання дифтерійного анатоксину

c). Регулювання рН до 4,5-5,5 за допомогою оцтової кислоти/гідроксиду натрію

d). Вичікування для стабілізації

e) Регулювання рН до 5,5-6,5 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію

45 f) Вичікування для стабілізації

2. Процедура формування компоненту II:

a). Перенесення фосфату алюмінію в контейнер/посудину

b). Додавання правцевого анатоксину

c). Регулювання рН до 4,5-5,5 за допомогою оцтової кислоти/гідроксиду натрію

50 d). Вичікування для стабілізації

e) Регулювання рН до 5,5-6,5 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію

f) Вичікування для стабілізації

3. Процедура формування компоненту III:

a). Перенесення фосфату алюмінію в контейнер/посудину

55 b). Додавання поверхневого антигену гепатиту В

c). Регулювання рН до 4,5-5,5 за допомогою оцтової кислоти/гідроксиду натрію

d). Вичікування для стабілізації

e) Регулювання рН до 5,5-6,5 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію

f) Вичікування для стабілізації

60 4. Змішування компоненту I у компоненті II і перемішування при RT.

5. До вищевказаної суміші додавали інактивований wP-антиген з подальшим перемішуванням при RT.

6. Компонент III додавали до суміші, отриманої при виконанні кроку 5 при RT

7. Кон'югат Hib PRP додавали до суміші, отриманої при виконанні кроку 6, при температурі 6-16 °C.

8. Антиген IPV додавали до суміші, отриманої при виконанні кроку 6, при температурі 6-16 °C.

9. 2-феноксіетанол додавали до суміші, отриманої при виконанні кроку 7, при температурі 6-16 °C.

10. Перевіряють pH, якщо потрібно, доводять pH 6,0 до 7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію

11. До суміші, отриманої при виконанні кроку 10, додавали NaCl з подальшим перемішуванням протягом 3 годин.

Приклад 7:

15 Дослідження токсичності шестивалентної вакцини

Наступні дослідження токсичності проводили із застосуванням вакцини DTwP-НерВ-IPV-Hib згідно плану дослідження відповідно до Таблиці "Y" та рекомендацій ВООЗ щодо доклінічної оцінки вакцин та у відповідності до Принципів ОЕСР щодо належної лабораторної практики.

1. Дослідження токсичності разової дози, яку вводили підшкірно щурам лінії Спрег-Доулі

20 Всього 20 щурів-самців та 20 самиць у віці 5-6 тижнів на початку обробки були випадковим чином розділені на чотири групи. Кожна група складалася з 5 самців та 5 самиць. Готові плацебо, ад'ювант, односторову вакцину DTwP-НерВ-IPV-Hib та багаторозову вакцину вводили підшкірно. За щурами спостерігали протягом 14 днів після введення дози.

2. Дослідження токсичності кількох доз, які вводили внутрішньом'язово щурам лінії Спрег-Доулі

25 Загалом 100 щурів-самців та 100 самиць були випадковим чином розділені в основну групу та групу відновлення. Готові до використання контроль плацебо, контроль ад'юванту, односторову вакцину DTwP-НерВ-IPV-Hib та багаторозову вакцину вводили повільно глибокою внутрішньом'язовою ін'єкцією в дні 1, 29, 57 та 85. Тваринам у групах відновлення нічого не вводили та спостерігали за ними протягом 28 днів.

3. Дослідження токсичності разової дози, яку вводили підшкірно новозеландським білим кроликам

35 Всього 16 самців та 16 самиць кроликів були випадковим чином розділені на чотири групи. Готові до використання плацебо, ад'ювант, односторову вакцину DTwP-НерВ-IPV-Hib та багаторозову вакцину вводили підшкірно кожній тварині відповідної групи. Кроликам вводили разову підшкірну дозу і спостерігали протягом 15 днів.

4. Дослідження токсичності повторних доз, які вводили внутрішньом'язово новозеландським білим кроликам

40 Всього 40 самців та 40 самиць кроликів були випадковим чином розділені в основну групу та групу відновлення. Готові до використання контроль плацебо, контроль ад'юванту, та різні дози односторової та багаторозової вакцини DTwP-НерВ-IPV-Hib вводили повільно глибокою внутрішньом'язовою ін'єкцією в дні 1, 29, 57 та 85. Тваринам у групах відновлення нічого не вводили та спостерігали за ними протягом 28 днів.

45 На підставі результатів було зроблено висновок, що односторова та багаторозова шестивалентна вакцина [дифтерія, правець, кашлюк (цільноклітинний), гепатит-В, поліомієліт (інактивований) та кон'югат *Haemophilus influenzae* типу b (адсорбована)] не призводили до будь-яких системних небажаних явищ у щурів лінії Спрег-Доулі та новозеландських білих кроликів, коли їм вводили разову дозу для людини (0,5 мл) підшкірно або внутрішньом'язово в передбачених умовах випробування. Запальні реакції в місці ін'єкції та результати імунологічної відповіді, що спостерігалися у групах, які отримували вакцину, зазвичай є очікуваними та спостерігаються в дослідженнях токсичності при введенні адювантних вакцин на основі алюмінію. Отже, досліджуваний препарат "Вакцина DTwP-НерВ-IPV-Hib" у найвищій дозі 0,5 мл/тварина (1 людська доза) вважається таким, що "Не викликає спостережуваних небажаних ефектів" (NOAEL), в умовах випробувань та при застосовуваних дозах.

55 Приклад 8:

Таблиця 10: У цій таблиці наведено порівняння відсоткової адсорбції окремих антигенів, специфічної активності, вмісту вільного PRP комбінованої вакцини SIPL та и Easy Six (Panacea):

Таблиця 10

	Комбінована вакцина SIPL	Комбінована вакцина Rapasea Easy-Six™
Адсорбція 'D'. (%)	79,0	38,0
Адсорбція 'T'. (%)	59,0	30
Адсорбція HBsAg (%)	95,44	Більше ніж 95,0
Специфічна активність 'D' (МО/доза)	98,5120	Більше ніж 40
Специфічна активність 'T' (МО/доза)	139,030	Більше ніж 50
'HBsAg' Специфічна активність In-Vitro (мкг/мл)	35,490 (34,210-36,818)	23,167
'HBsAg' Специфічна активність In-Vivo (R/P)	1,07 (0,74-1,57)	0,71 (0,42-1,13)
Специфічна активність 'wP' (МО/доза)	4,6749 (2,6492-8,2763)	3,2221 (1,8032-5,7706)
HIB (загальний PRP) мкг/0,5 мл	8,1	13,20
HIB (вільний PRP) (%)	4,8	18,45
Вільний формальдегід (% мас./об.)	0,0013	0,0011
Вміст 2-феноксіетанолу (мг/0,5 мл)	2,71	3,3
Загальний вміст алюмінію (мг/0,5 мл)	0,2863	0,6034
D-антиген 'ІПВ' (DU/0,5 мл)	Тип-I=39,046 Тип-II=7,280 Тип-III=33,058	Тип-I=43,504 Тип-II=8,056 Тип-III=39,840

D - антиген дифтерійного анатоксину

T - антиген правцевого анатоксину

wP - антиген цільноклітинного кашлюку

HBsAg - поверхневий антиген гепатиту В

ІПВ - антиген інактивованого поліовірусу

Адсорбція (%) - відсоткова адсорбція антигену на солі алюмінію (Al³⁺)

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Імуногенна композиція, що включає на 0,5 мл:
 - (i) дифтерійний анатоксин (D) в діапазоні від 10 до 25 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 50 %;
 - (ii) анатоксин правця (T) в діапазоні від 2 до 10 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 40 %;
- 10 (iii) інактивованний цільноклітинний кашлюковий антиген (wP), що належить до штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, у співвідношенні 1:1:0,25:0,25, в діапазоні від 12 до 16 МОО;
- (iv) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) в діапазоні від 7 до 12 мкг, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 70 %;
- 15 (v) капсулярний сахарид *Haemophilus influenzae* типу b (Hib), кон'югований з правцевим анатоксином як білком-носієм з використанням бромиду ціаногену як реагенту ціанілування, в діапазоні від 7 до 12 мкг;
- (vi) інактивованний антиген вірусу поліомієліту (IPV), що включає IPV-антиген типу 1 у кількості 1-50 DU (д-антигенних одиниць), типу 2 у кількості 1-20 DU або типу 3 у кількості 1-50 DU, відповідно;

(vii) фосфат алюмінію як ад'ювант з вмістом фосфату алюмінію (Al^{3+}) в діапазоні від 0,1 до 0,5 мг;

(viii) 2-феноксіетанол як консервант в діапазоні від 1 до 3 мг; і

(ix) хлорид натрію (NaCl) як середовище для розведення або буферний розчин у кількості від 0,5 до 1,5 %, при цьому імуногенна композиція - це повністю рідка комбінована вакцина.

2. Імуногенна композиція за п. 1, в якій антигенами IPV є штами Salk, вибрані з групи Mahoney типу 1, MEF типу 2, Saukett типу 3 або штами Sabin, вибрані із групи, що містить тип 1, тип 2 та тип 3.

3. Імуногенна композиція за п. 1, в якій антиген Hib являє собою полісахарид полірибозилрибітол фосфату (PRP), кон'югований з білком-носієм, використовуючи хімію кон'югації ціанілування або хімію кон'югації відновного амінування, де реагент ціанілування вибраний із броміду ціаногену, 1-ціано-4-диметиламінопіридину тетрафтороборату (CDAP), 1-ціано-4-піролідінопіридину тетрафтороборату (CPPT), 1-ціаноімідазолу, а саме (1-Cl), 1-ціанобензотриазолу (1-CBT) або 2-ціанопіридазин-3(2H)ону (2-CPO); а білок-носіє вибраний із групи, що включає CRM197, анатоксин дифтерії, зовнішній мембранний комплекс *Neisseria meningitidis*, фрагмент С анатоксину правця.

4. Імуногенна композиція за п. 1, в якій інактивовані цільноклітинний кашлюковий антиген, антиген Hib та інактивовані антиген вірусу поліомієліту не адсорбовані на жодному ад'юванті.

5. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-4, яка містить дифтерійний анатоксин (D)-антиген у кількості від 10 до 25 Lf на 0,5 мл; анатоксин правця (T)-антиген у кількості від 2 до 10 Lf на 0,5 мл; wP-антиген у кількості від 12 до 16 МОО на 0,5 мл; HBsAg у кількості від 7 до 15 мкг на 0,5 мл; Hib-антиген у кількості від 7 до 13 мкг на 0,5 мл; IPV-антиген Salk типу 1 у кількості 1-50 DU, Salk типу 2 у кількості 1-20 DU або Salk типу 3 у кількості 1-50 DU, відповідно, на 0,5 мл; фосфат алюмінію у кількості від 0,1 до 2,5 мг на 0,5 мл; 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 6 мг на 0,5 мл; хлорид натрію у кількості від 0,5 до 1,5 %.

6. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-5, яка містить дифтерійний анатоксин (D)-антиген у кількості від 10 до 25 Lf на 0,5 мл; анатоксин правця (T)-антиген у кількості від 2 до 10 Lf на 0,5 мл; wP-антиген у кількості від 12 до 16 МОО на 0,5 мл; HBsAg у кількості від 7 до 15 мкг на 0,5 мл; Hib-антиген у кількості від 7 до 13 мкг на 0,5 мл; IPV-антиген Sabin типу 1 у кількості 1-50 DU, Sabin типу 2 у кількості 1-20 DU або Sabin типу 3 у кількості 1-50 DU, відповідно, на 0,5 мл; фосфат алюмінію у кількості від до 2,5 мг на 0,5 мл; 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 6 мг на 0,5 мл; хлорид натрію у кількості від 0,5 до 1,5 %.

7. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-6, яка містить дифтерійний анатоксин (D)-антиген у кількості 10 Lf на 0,5 мл; анатоксин правця (T)-антиген у кількості від 2 Lf на 0,5 мл; wP-антиген в кількості 12 МОО на 0,5 мл; HBsAg у кількості 8 мкг на 0,5 мл; Hib-антиген у кількості 8 мкг на 0,5 мл; IPV-антиген Salk типу 1 у кількості 40 DU, Salk типу 2 у кількості 8 DU або Salk типу 3 у кількості 32 DU, відповідно, на 0,5 мл; фосфат алюмінію у кількості 1,25 мг на 0,5 мл; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг на 0,5 мл; хлорид натрію у кількості 0,9 %.

8. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-7, яка містить дифтерійний анатоксин (D)-антиген у кількості 20 Lf на 0,5 мл; анатоксин правця (T)-антиген у кількості 4 Lf на 0,5 мл; wP-антиген у кількості 14 МОО на 0,5 мл; HBsAg у кількості 15 мкг на 0,5 мл; Hib-антиген у кількості 10 мкг на 0,5 мл; IPV-антиген Salk типу 1 у кількості 40 DU, Salk типу 2 у кількості 8 DU або Salk типу 3 у кількості 32 DU, відповідно, на 0,5 мл; фосфат алюмінію у кількості 1,25 мг на 0,5 мл; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг на 0,5 мл; хлорид натрію у кількості 0,9 %.

9. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-8, яка містить дифтерійний анатоксин (D)-антиген у кількості 25 Lf на 0,5 мл; анатоксин правця (T)-антиген у кількості 10 Lf на 0,5 мл; wP-антиген у кількості 16 МОО на 0,5 мл; HBsAg у кількості 15 мкг на 0,5 мл; Hib-антиген у кількості 13 мкг на 0,5 мл; IPV-антиген Salk типу 1 у кількості 40 DU, Salk типу 2 у кількості 8 DU або Salk типу 3 у кількості 32 DU відповідно на 0,5 мл; фосфат алюмінію у кількості 1,25 мг на 0,5 мл; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг на 0,5 мл; хлорид натрію у кількості 0,9 %.

10. Спосіб виготовлення повністю рідкої імуногенної комбінованої композиції вакцини, яка включає на 0,5 мл:

(i) дифтерійний анатоксин (D) в діапазоні від 10 до 25 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 50 %;

(ii) анатоксин правця (T) в діапазоні від 2 до 10 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 40 %;

(iii) інактивовані цільноклітинний кашлюковий антиген (wP), що належить до штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, у співвідношенні 1:1:0,25:0,25, в діапазоні від 12 до 16 МОО;

(iv) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), в діапазоні від 7 до 12 мкг, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 70 %;

- (v) капсулярний сахарид *Haemophilus influenzae* типу b (Hib), кон'югований з правцевим анатоксином як білком-носієм з використанням броміду ціаногену як реагентом ціанілування, в діапазоні від 7 до 12 мкг;
- 5 (vi) інактивований антиген вірусу поліомієліту (IPV), що включає IPV-антиген типу 1 у кількості 1-50 DU (д-антигенних одиниць), типу 2 у кількості 1-20 DU або типу 3 у кількості 1-50 DU, відповідно;
- (vii) фосфат алюмінію як ад'ювант з вмістом фосфату алюмінію (Al^{3+}) в діапазоні від 0,1 до 0,5 мг;
- 10 (viii) 2-феноксіетанол як консервант в діапазоні від 1 до 3 мг; і
- (ix) хлорид натрію (NaCl) як середовище для розведення або буферного розчину, у кількості від 0,5 до 1,5%, що включає етапи:
- 15 а) додавання в посудину або контейнер для змішування звичайного фізіологічного розчину;
- б) додавання в посудину або контейнер для змішування компонента I, що містить дифтерійний анатоксин;
- 15 в) додавання компонента II, що містить анатоксин правця, до компонента I з етапу (б), при перемішуванні при кімнатній температурі;
- г) додавання інактивованого цільноклітинного антигену кашлюку до суміші, отриманої на етапі (в), при перемішуванні при кімнатній температурі;
- 20 е) додавання компонента III, що містить поверхневий антиген гепатиту В, до суміші, отриманої на етапі (г), при кімнатній температурі;
- ф) додавання Hib-антигену до суміші, отриманої на етапі (е), при 6-16 °C;
- г) додавання IPV-антигену до суміші, отриманої на етапі (ф), при 6-16 °C;
- 25 х) додавання 2-феноксіетанолу до суміші, отриманої на етапі (г), при 6-16 °C;
- і) регулювання рН від 6,0 до 7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію, і
- ж) додавання при перемішуванні звичайного фізіологічного розчину для доведення об'єму до мітки.
11. Спосіб за п. 10, в якому підготовка компонента I включає такі етапи:
- 30 а) перенесення фосфату алюмінію в посудину або контейнер для змішування;
- б) додавання дифтерійного анатоксину;
- в) регулювання рН до 4,5-5,5 за допомогою оцтової кислоти або гідроксиду натрію;
- г) стабілізація;
- 35 е) регулювання рН до 5,5-6,5 за допомогою гідроксиду натрію або карбонату натрію, і
- ф) стабілізація.
12. Спосіб за п. 10, в якому підготовка компонента II включає такі етапи:
- а) перенесення фосфату алюмінію в посудину або контейнер для змішування;
- б) додавання правцевого анатоксину;
- 35 в) регулювання рН до 4,5-5,5 за допомогою оцтової кислоти або гідроксиду натрію;
- г) стабілізація;
- 40 е) регулювання рН до 5,5-6,5 за допомогою гідроксиду натрію або карбонату натрію і
- ф) стабілізація.
13. Спосіб за п. 10, в якому підготовка компонента III включає такі етапи:
- а) перенесення фосфату алюмінію в посудину або контейнер для змішування;
- б) додавання поверхневого антигену гепатиту В;
- 45 в) регулювання рН до 4,5-5,5 за допомогою оцтової кислоти або гідроксиду натрію;
- г) стабілізація;
- е) регулювання рН від 5,8 до 6,8 за допомогою гідроксиду натрію або карбонату натрію, і
- ф) стабілізація.
14. Спосіб за п. 10, в якому підготовка інактивованого цільноклітинного антигену кашлюку
- 50 включає такі етапи:
- а) інактивація при температурі 56 °C протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 134;
- б) інактивація при температурі 56 °C протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 509;
- 55 в) інактивація при температурі 56 °C протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 25525 та 6229;
- г) інактивація при температурі 56 °C протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду штамів *Bordetella pertussis* 6229;
- 60 е) наступне змішування інактивованих штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, отриманих на етапах (а), (б), (в) і (г), у співвідношенні 1:1:0,25:0,25, відповідно;

f) адсорбування на ад'юванті на основі алюмінію, при цьому в процесі не використовують тимеросал, а інактивованій цільноклітинний кашлюковий антиген залишається негрудкуватим та гомогенним, що приводить до зниження реактогенності та покращення специфічної активності протягом більш тривалого часу.

5 15. Спосіб за п. 10, в якому підготовка Hib-антигену включає такі етапи:

a) ферментація *Haemophilus influenzae* типу b;

b) інактивація *Haemophilus influenzae* типу b, отриманого на етапі (a), при температурі 37 °C протягом 2 годин у присутності 0,1 % формальдегіду;

c) очищення полісахариду полірибозилрибітолфосфату (PRP) Hib, отриманого на етапі (b);

10 d) кон'югація очищеного продукту етапу (c) до анатоксину правця (ТТ) з використанням хімії кон'югації ціанілування бромистого ціаногену в присутності лінкера дигідрозиду адипінової кислоти (ADH);

e) очищення кон'югату з етапу (d);

15 f) фільтрація очищеного кон'югату з етапу (e) переважно через фільтр з розміром пор 0,22 мкм, причому процентний вміст вільного PRP становить не більше 5 % у загальній кількості очищеного кон'югату Hib.