



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **131177** (13) **C2**
(51) МПК (2026.01)

A61K 39/112 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00
A61K 47/02 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

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

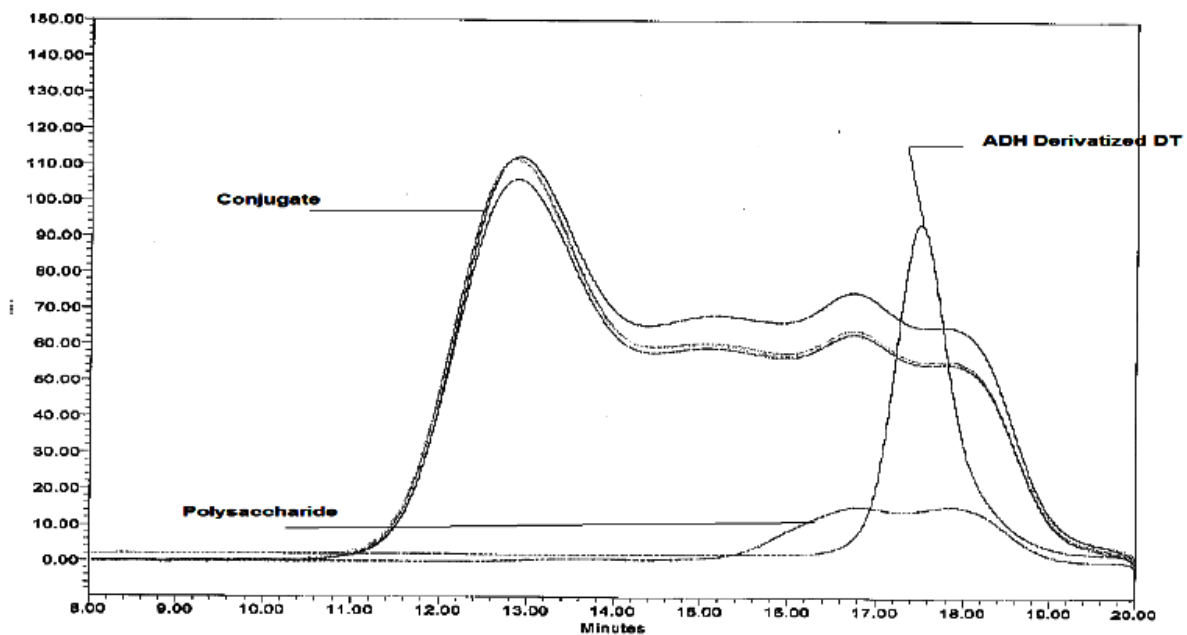
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2022 01081	(73) Володілець (володільці):	СІРЕМ ІНСТІТУТ ОФ ІНДІА ПРАЙВЕТ ЛІМІТЕД, 212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411 028, India (IN)
(22) Дата подання заявки:	02.09.2020	(74) Представник:	Могилевський Валентин Михайлович, реєстр. №13
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	03.09.2026	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015/029056 A1, 05.03.2015 MICOLI F. et al. Vi-CRM197 as a new conjugate vaccine against Salmonella Typhi. Vaccine. Amsterdam. NL. 17.01.2011. Vol. 29. No. 4. P. 712-720. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.022 WO 2008/081022 A1, 10.07.2008 US 2013/129776 A1, 23.05.2013 CN 102935226 A, 20.02.2013 WO 98/26799 A1, 25.06.1998 WO 2018/203268 A1, 08.11.2018 AN SO JUNG et al. Preparation and testing of a Haemophilus influenzae type b/Hepatitis B surface antigen conjugate vaccine. Vaccine. 07.02.2015. Vol. 33. No. 13. P. 1614-1619. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.01.061 ALI AAMIR et al. Synthesis and immunogenicity evaluation of Salmonella enterica serovar Paratyphi A O-specific polysaccharide conjugated to diphtheria toxoid. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 06.03.2014. Vol. 10. No. 6. P. 1494-1498. DOI: 10.4161/hv.28130 FRANCESCA MICOLI et al. O:2-CRM197 conjugates against Salmonella Paratyphi A. PLoS ONE. 07.11.2012. Vol. 7. No. 11. P. e47039. DOI: 10.1371/journal.pone.0047039 WO 2011/084705 A2, 14.07.2011
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	201921035435		
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	03.09.2019		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	IN		
(41) Публікація відомостей про заявку:	20.07.2022, Бюл.№ 29		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	02.09.2026, Бюл.№ 35		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/IN2020/050763, 02.09.2020		
(72) Винахідник(и):	Дере Раджів Мхаласакант (IN), Пісал Самбхаджі Шанкар (IN), Аннамаджу Даттатрейя Сарма (IN), Аваласкар Ніхіл Даттатрай (IN), Хундекарі Йогеш Тукарам (IN), Таклікар Аніл Піраджірао (IN), Гоел Суніл Кумар (IN), Камат Чандрашехар Дварканат (IN), Чаван Вішал Бхарат (IN)		

UA 131177 C2

(54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ПРОТИ КИШКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ І СПОСІБ ЇЇ ВИГОТОВЛЕННЯ**(57) Реферат:**

Винахід належить до імуногенних полівалентних полісахаридно-білкових кон'югованих вакцинних композицій, що містять полісахарид, вибраний з штамів *Salmonella* серовар *typhi*; *S. enteritidis* серовар *paratyphi* A; та до альтернативних вдосконалених способів ферментації полісахариду, очищення полісахариду, кон'югування полісахариду з білком та до стабільної композиції. Винахід додатково належить також до способів виклику імунної відповіді у суб'єктів проти *Salmonella typhi* та захворювань, не пов'язаних з тифом, та/або для зменшення або запобігання *Salmonella typhi* та захворювань, не пов'язаних з тифом, у суб'єктів, за допомогою композицій, розкритих у цій заявці. Вакцина викликає появу бактерицидних антитіл та корисна для профілактики гастроентериту, ентериту та тифу.



Хроматограма порівняння очищеного полісахариду, білку та прогрес процесу кон'югації (PS:PR:CP: 1:0,8:1,3)

Fig. 1

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Дане розкриття відноситься до галузі виробництва вакцин, зокрема, імуногенної композиції для профілактики інфекцій, викликаних *Salmonella* і нетифозними інфекціями *Salmonella*, а також до способів її виготовлення.

5 ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ДАНОГО ВИНАХОДУ

Наведена нижче довідкова інформація відноситься до даного розкриття, але не обов'язково являє собою попередній рівень техніки.

Інфекція *Salmonella* залишається серйозною проблемою охорони здоров'я у всьому світі, особливо в країнах, що розвиваються, від якої щорічно страждають мільйони людей. Інфекція *Salmonella* може викликати ентерит, який може ускладнитися бактеріємією (кишковою лихоманкою) та гастроентеритом як у здорових людей, так і у людей з послабленим імунітетом.

Рід *Salmonella* відноситься до сімейства Enterobacteriaceae і включає грамнегативні, такі, що не утворюють спор, факультативно-анаеробні бацили. *Salmonella enterica* серовар typhi (*S. typhi*) і *Salmonella enterica* серовар paratyphi (*S. paratyphi*) A і B викликають кишкову лихоманку, системне гарячкове захворювання, що зустрічається тільки у людей, яке відрізняється від більш поширеного самообмежувального гострого гастроентериту, що викликається іншими численними серотипами *Salmonella*. Кишкова лихоманка, викликана представниками роду *Salmonella*, включаючи typhi і paratyphi, продовжує являти собою значний тягар стосовно захворювань і смертності серед населення країн (Lancet 2005; 366:749-762) і становить значний ризик для мандрівників (Lancet Infect Dis. 20:623-628). Черевний тиф залишається ендемічним у країнах із низьким та середнім рівнем доходу (LMICs). Щорічно в країнах з низьким та середнім рівнем доходів, особливо в Південній Азії та Африці на південь від Сахари, реєструється від 12,5 до 20,6 мільйона випадків захворювання на тиф (Lancet Glob Heal. 2014; 2: e570-e580 & J Glob Health. 2012; 2: 10401). *Salmonella paratyphi* відповідає за зростаючу частку ентеритів у деяких частинах Азії, у тому числі в Непалі, Камбоджі та Китаї. Найбільший тягар *Salmonella paratyphi* припадає на Індійський субконтинент та Південно-Східну Азію. В одному з досліджень у Непалі, де тиф є високоендемічним захворюванням, було виявлено, що муніципальна вода забруднена як *S. typhi*, так і *Salmonella enterica* серовар paratyphi A (PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan; 10(1): 6 Negl Trop Dis., 2013;7(8):e2391).

Нетифозні серовари *Salmonella enterica* (NTS) є важливими причинами інвазивних захворювань, що спричиняються *Salmonella* у всьому світі. З більш ніж 2 500 сероварів NTS, серовари NTS typhimurium та enteritidis становлять майже 80 відсотків усіх ізолятів NTS у людини, зареєстрованих у всьому світі. Додатково, інвазивні нетифозні інфекції *Salmonella* (iNTS), викликані сероварами enteritidis (SE) та typhimurium (STm), є серйозною проблемою педіатричної охорони здоров'я в країнах Африки на південь від Сахари. Останнім часом NTS все частіше визнаються основною причиною інвазивних бактеріальних інфекцій у маленьких дітей та осіб з ослабленим імунітетом, а також людей по всьому світові. Ці два серовари також є основною причиною гастроентериту у здорових дітей та дорослих у промислово розвинених країнах. NTS також може викликати важку позакишкову інвазивну бактеріємію, яку називають iNTS. Зазвичай вона проявляється як гарячкове захворювання. Насправді iNTS часто протікає без шлунково-кишкових симптомів як у дорослих, так і у дітей.

З більш ніж 2 500 нетифоїдних сероварів *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серовар typhimurium (*S. typhimurium*) та *Salmonella enterica* серовар enteritidis (*S. enteritidis*) становлять майже 80 відсотків усіх ізолятів NTS у людини, зареєстрованих у всьому світі. Останнім часом NTS все частіше визнаються основною причиною інвазивних бактеріальних інфекцій у маленьких дітей та ВІЛ-інфікованих осіб у країнах Африки на південь від Сахари, а також у людей похилого віку та осіб з ослабленим імунітетом у всьому світі.

Глобальна захворюваність на гастроентерит NTS у 2010 році оцінювалася в 93 мільйони випадків, приблизно 80,3 мільйона з яких були передані харчовим шляхом, при 155 000 смертей. Економічний тягар NTS є значним у розвинених країнах. Тільки у США щорічні витрати на NTS становлять 3,3 мільярда доларів США, при цьому втрачається 17 000 років життя з поправкою на якість, що є найбільшим показником серед усіх патогенів харчового походження. Як згадувалося раніше, NTS може викликати важку позакишкову, інвазивну бактеріємію, яку називають iNTS. Інвазивні інфекції *Salmonella* найбільш поширені в країнах, що розвиваються, і стали найчастішою причиною бактеріємії в тропічній Африці, особливо серед маленьких дітей та осіб з ВІЛ. Зазвичай вона проявляється як гарячкове захворювання. Насправді iNTS часто протікає без шлунково-кишкових симптомів як у дорослих, так і у дітей. Симптоми iNTS схожі на симптоми малярії та включають лихоманку та пітливість (більш ніж 90 відсотків), а також спленомегалію (40 відсотків). Неясно, чому iNTS є такою проблемою в Африці, але це може бути пов'язане з: підвищеною інвазивністю окремих скарбів бактерій iNTS (таких як *S.*

typhimurium ST313), що зустрічаються в Африці, а не в інших місцях; зниженням імунітету хазяїна, пов'язаним з ВІЛ-інфекцією, малярією та недоїданням; та розширенням можливостей передачі інфекції від людини до людини, наприклад, бактеріємія NTS у ВІЛ-інфікованих дорослих африканців супроводжується високою смертністю (до 47 відсотків) та частотою рецидивів (43 відсотки).

Антибіотики використовуються для лікування тифозних та нетифозних інфекцій, викликаних *Salmonella*, та вибір антимікробних препаратів та тривалість лікування визначаються вартістю та доступністю антибіотиків, місцевим рівнем резистентності та реакцією пацієнта на лікування. Як у розвинених країнах, так і в країнах, що розвиваються, стає все більш очевидним, що

множинні антибіотикорезистентні штами стають важливими причинами інвазивної бактеріємії та ускладнень гастроентериту, що призводять до госпіталізації та смерті. Оскільки наявні засоби лікування стають менш ефективними, проблема інфекцій, спричинених тифоїдною та нетифоїдною *Salmonella*, ймовірно, продовжуватиме зростати, що робить розробку вакцини важливим пріоритетом у боротьбі із хворобою. Вона також є важливим засобом захисту для людей, що подорожують до районів, де інфекції, спричинені тифоїдною та нетифоїдною *Salmonella*, є ендемічними.

На даний час для використання ліцензовані три типи протитифозних вакцин: i) кон'югована протитифозна вакцина (TCV); ii) некон'югована полісахаридна вакцина Vi (ViPS) та iii) жива атенуйована вакцина Ty21a. Всесвітня організація охорони здоров'я (BOOЗ, WHO) рекомендувала більш широке застосування протитифозної вакцини, віддаючи перевагу кон'югованим протитифозним вакцинам (TCV) (WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2018; 93:153-72).

Вакцини від *S. paratyphi* на даний час відсутні. Аналогічно, існує потреба в імуногенній композиції/вакцині, здатній одночасно забезпечувати імунітет проти тифозних та нетифозних *Salmonella*.

Недоліком наявних в даний час вакцин є те, що всі вони спрямовані тільки проти *S. typhi*. *S. paratyphi* А викликає кишкову лихоманку з тим самим географічним поширенням, що і *S. typhi*, і ці захворювання клінічно не відрізняються. Отже, для Південної та Південно-Східної Азії вакцина, здатна захистити від обох сероварів, буде ціннішою, ніж вакцина, призначена тільки для одного з них. Додатково, в Африці на південь від Сахари те саме вірно для *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, що вказує на важливість вакцини, здатної додатково захищати від сероварів NTS, для даного регіону.

Неясно, чи зможуть захищати вакцинні кандидати, що розробляються, як від гастроентериту, так і від інвазивних проявів iNTS. У той час як розуміння тяжкості захворювань на тиф у країнах з низьким рівнем доходів зростає, глобальний медичний попит на кон'юговану вакцину, що захищає від тифозних і нетифозних інфекцій *Salmonella*, набув значущості. За оцінками, пік попиту на кон'юговану вакцину проти тифу, ймовірно, припаде на період з 2023 по 2026 рік, наблизившись до 300 мільйонів річних доз для 133 країн (Clin Infect Dis. 2019 Mar 15; 68 (Suppl 2): S154–S160).

Додатково, процеси культивування, переробки, кон'югації та розробки рецептур часто можуть бути лімітуючим етапом у якнайшвидшому виведенні біофармацевтичних препаратів на ринок та у задоволенні потреб населення. Культивування включає весь процес від виділення та культивування клітин на ранніх етапах, створення банку клітин, розведення культури в процесі бактеріальної ферментації та остаточного збору клітин. Масштаб культивування клітин збільшується від 100-500 мл до біореактора від 3 до 20 000 літрів. Додаткові етапи включають первинне вилучення полісахариду *Salmonella* та видалення клітин та домішок. Додатково, щоб полегшити економічно ефективну розробку кон'югованих вакцин на основі полісахаридів *Salmonella*, необхідно одержати структурно-інтактні полісахариди з вищим виходом та високою чистотою. Раніше повідомлялося про вихід менш ніж 40 % полісахаридів *Salmonella* spp. Збільшення виходу капсульного полісахариду (CPS) "на стадії збору ферментованих клітин" шляхом використання нових стратегій живлення та вдосконаленого ферментаційного середовища є одним із кращих підходів для досягнення зазначеної мети. Merritt та ін. (2000) показали, що при підкормці періодичної культури у 500-літровому біореакторі виробничого масштабу щільність клітин та вихід капсульного полісахариду збільшуються приблизно вчетверо порівняно з періодичною культурою.

Дослідження виробництва капсульного полісахариду іншими патогенними бактеріями, такими як *Haemophilus influenzae* типу B і *Neisseria meningitidis* показали, що виробництво залежить від умов ферментації (температура, pH, DO, осмоляльність) та компонентів середовища, і ці оптимальні умови відрізняються для кожної бактерії. Zhan та ін. (2002)

аналогічним чином показали, що контроль pH та перехід на періодичну ферментацію з живленням збільшили вихід клітин та виробництво капсульного полісахариду.

Експресія капсульного полісахариду сильно регулюється залежно від певних умов ферментації, таких як осмоляльність, і за високої осмоляльності відзначалося зниження синтезу полісахариду.

Полісахариди були одержані при різних концентраціях глюкози, касамінокислот та фосфат-іонів.

Baruque-Ramos та ін. 2005, показали, що вищий вихід капсульного полісахариду був одержаний при культивуванні *N. Meningitidis* (серогрупа C) в середовищі, де концентрація глюкози підтримувалася нижче 1,0 г/л, і що низька напруга кисню сприяла більш високому продукуванню полісахариду. Додатково було відмічено, що концентровані касамінові кислоти в живильному розчині обмежували кінцеву щільність клітин. Додатково, вирощування та вихід полісахаридів у певному середовищі також залежить від співвідношення вуглеводів та джерела азоту. В одному з процесів періодичної ферментації *S. typhi* аміак подавали як джерело азоту разом з живильним середовищем. Однак було відмічено, що на утворення полісахариду *Aureobasidium pullulans* впливає джерело аміачного азоту в середовищі, і його вихід знижувався за надлишку іонів амонію, навіть в умовах, які в іншому сприяли його синтезу (Appl Microbiol Biotechnol (1990)32:637-644).

Вирощування та синтез полісахаридів у певному середовищі були найбільшими, коли амінокислоти були замінені на аміак як джерело азоту.

Повідомлялося про використання касамінової кислоти як джерело азоту у певному середовищі. Однак касамінова кислота тваринного походження, швидше за все, з бичачого казеїну, була визнана алергеном та обмежена у використанні. Додатково, повідомлялося про використання середовища казеїновий перевар/триптон як джерело азоту в певному середовищі, проте воно може не підтримувати вирощування мікроорганізмів зі складними харчовими потребами.

Додавання гідролізатів, що не містять тваринних компонентів (Bacto TC Yeastolate, Phytone Peptone), у хімічно визначені середовища є одним із підходів до своєчасного збільшення щільності клітин, життєздатності культури та продуктивності. Гідролізати-це переварені білки, що складаються з амінокислот, невеликих пептидів, вуглеводів, вітамінів та мінералів, які забезпечують живильні добавки у середовищах. Гідролізати нетваринного походження із сої, пшениці та дріжджів широко використовуються в середовищах для клітинних культур та кормах для покращення виходу полісахаридів (див. US9284371). Однак, через складність складу, варіацій залежно від партії, небажаної властивості, що робить культуру в'язкою, дріжджовий екстракт та гідролізати можуть бути значним джерелом мінливості середовища. Утворення піни під час великомасштабної ферментації може i) знизити вихід капсульного полісахариду через втрату клітин та культурального середовища у пінній фазі, ii) може бути шкідливим для клітин, оскільки коли бульбашки лопаються, вони надають притискну силу; якщо піна виходить назовні, i iv) може призвести до надмірного тиску, якщо піна, що виходить, блокує вихідний фільтр.

Супернатант ферментаційних клітин піддається різним етапам очищення для виділення очищеного полісахариду та видалення домішок клітини-хазяїна, таких як білки, нуклеїнова кислота та ліпополісахарид. Способи фільтрації відіграють важливу роль у поточній обробці культивуванні або очищенні бактеріальних полісахаридів від домішок клітини-хазяїна. Поточна обробка включає інактивацію бактеріальної культури, відділення клітин від середовища, виділення продукту, концентрування, очищення. Поточна обробка є найскладнішою частиною процесу через свою складність.

Кожна бактерія має різні капсульні полісахариди, а різні серотипи однієї і тієї ж бактерії ще більш ніж відрізняються за хімічною структурою бактеріальних капсульних полісахаридів. Як приклад можна навести *S. typhi*, яка експресує полісахаридну капсулу Vi, що являє собою лінійний гомополімер $\alpha(1-4)$ -D-GalpA N-ацетильований C-2 і O-ацетильований C-3. N- і O-ацетили домінують на поверхні і необхідні як для антигенності, так і для імуногенності Vi, тоді як на відміну від них *S. paratyphi* A і B і NTS (за рідкісним винятком) не експресують капсульні полісахариди. Швидше, їх поверхневі полісахариди є полісахаридом O (OPS) ліпополісахариду. Вони мають загальну трисахаридну основу $\rightarrow 2$)- α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Galp-(1 $\rightarrow$) (яка серологічно є епітопом 12). Однак дидезокси-гексозний сахарид, пов'язаний α -(3 $\rightarrow$ 6) з маннозою трисахариду, що повторюється, призводить до імунодомінантного епітопу, який забезпечує ідентичність груп *Salmonella*. У випадку *S. typhimurium* галактоза трисахаридної основи епітопу 12 стає α -(1 $\rightarrow$ 6) глюкозильованою. (Див.: Lindberg AA, Le Minor L. Serology of *Salmonella* B: Bergan T, ed. Methods in Microbiology: Academic Press, 1984:1-141).

Така різноманітність структур бактеріальних полісахаридів робить очищення цих полісахаридів більш складним і проблематичним. Вакцина, що містить полісахарид, має відповідати певному стандарту якості.

5 Попередній метод очищення, який можна проводити у великих об'ємах, включає лізування та осадження домішок, таких як нуклеїнові кислоти та ліпіди, за допомогою розчинників, маніпуляції з рН та використання детергенту, такого як дезоксихолат натрію, Triton-X.

10 Дезоксихолат натрію (DOC) є м'яким детергентом і одним з найчастіше використовуваних детергентів при очищенні полісахаридів. Дезоксихолат натрію з основною стероїдною структурою менш денатуруючий та обмежений за своєю солюбілізуючою силою, він руйнує ендотоксини, не впливаючи на хімічну структуру; отже, після видалення дезоксихолату натрію ендотоксини відновлюють свою біологічну активність. Додатково, процедури на основі DOC неефективні для видалення забруднень із полісахаридів, особливо полісахаридів, що містять сіалову кислоту. Це може бути пов'язано зі слабкою детергентною активністю DOC щодо асоціації ліпополісахарид-білок, що утворюється в процесі подальшої обробки, що призводить до високого рівня вмісту ендотоксинів та білка у кінцевому виділеному полісахариді. Додатково, дезоксихолат натрію, як продукт тваринного походження, навіть його залишкова присутність в кінцевому продукті може призвести до неприйняття продукту регулюючими органами та деякими релігійними громадами.

20 Недоліком використання Triton-X є те, що залишки детергенту зберігаються у фазі екстракції, і для видалення всіх залишків потрібне інтенсивне промивання.

Для деяких типів CPS також передбачено осадження цинку ацетатом/сульфатом амонію/цитратом натрію для видалення білкових забруднень. Однак для досягнення високого рівня чистоти необхідно проводити повторні осадження сульфатом амонію, що робить процес стомлюючим і трудомістким. Додатково, іноді він осаджує капсульні полісахариди, що призводить до втрати загальної кількості полісахаридів.

25 У деяких інших методах використовуються ферменти, які сприяють розпаду білків і нуклеїнових кислот, проте видалення ферментів і гідролізованого матеріалу є складним завданням і може призвести до втрати продукту, що розглядається. Додатково, регулюючі органи обмежили використання ферментів тваринного походження в продуктах для людей через ризик зараження пріонами. Використання ферментів крім високої вартості створює додаткові регуляторні проблеми в рамках cGMP, наприклад, походження ферментів (від тварин або рекомбінантних), відмінності в активності ферментів у різних постачальників і партій тощо.

Деякі інші способи використовують бензоназу, протеїназу K або наргазу для розкладання залишкових білків та/або матеріалів нуклеїнових кислот з подальшим хроматографічним очищенням, що призводить до високих витрат і процесу, який не може бути легко масштабований.

30 У деяких інших методах виділення ендотоксинів з бактеріальних полісахаридів використовувалися токсичні органічні розчинники, такі як фенол, бутанол, толуол і хлороформ. Цей метод є дорогим і потребує багато часу. Додатково, неприємно працювати з токсичними органічними розчинниками, які виробляють токсичні відходи.

Високий ступінь очищення, необхідний для одержання полісахаридів, специфічних для вакцин, призвів до розробки нових методів очищення, заснованих на фракційному осадженні, іонообмінній хроматографії, гель-фільтрації і афінній хроматографії. Такі хроматографічні способи, як гель-ексклюзійна хроматографія, іонообмінна хроматографія та хроматографія гідрофобної взаємодії були успішно використані для виділення бактеріальних полісахаридів з ефективним видаленням білкових і нуклеїнових кислотних забруднень. Незважаючи на успішне виділення бактеріальних полісахаридів відповідно до специфікацій ВООЗ, використання хроматографічних методів вимагає багатоступінчастої трудомісткої і тривалої підготовки зразків, пов'язане з проблемами масштабованості, різко погіршує вилучення капсульних полісахаридів і, таким чином, не є прийнятним дешевим варіантом для подальшої масштабної поточної обробки. Додатково, додавання нових етапів очищення для усунення цих забруднень збільшує складність процесу, знижує кінцевий вихід та збільшує економічні витрати.

Очищені полісахариди *Salmonella typhi*, одержані за допомогою раніше описаних процесів очищення, мають вміст ендотоксину в межах 25-50 ОЕ/мкг.

55 Отже, існує потреба в альтернативних методологіях очищення, спрямованих на максимальне вилучення полісахаридів *Salmonella* при видаленні домішок до прийнятного рівня.

Різні способи, такі як кислотний гідроліз, лужне розкладання, окислення перйодатом, озоноліз (Wang та ін. Carb. Res. 1999, 319, 1-4,141-147), ферментативний гідроліз, обробка ультразвуком (Pawlowski та ін. Vaccine, 8. 1873-1885), фрагментація електронним променем (Pawlowski та ін. Micro Lett, 1999, 174.2, 255-263) були описані для деполімеризації (визначення

розміру) бактеріальних та небактеріальних полісахаридів. Однак кислотний гідроліз та лужне розкладання потребують багато часу, а одержаний в результаті зразок із зменш ніжним розміром має високу полідисперсність. Додатково, окислення періодатом згубно впливає на лабільні антигенні епітопи деяких полісахаридів. Додатково, озоноліз можна використовувати тільки з полісахаридами, що містять β -D-альдозидні зв'язки, а ендогліканаз на сьогоднішній день виділено дуже мало. US 20090041802 розкриває ферментацію менінгококових полісахаридів Emulsiflex C-50 (традиційний гомогенізатор) (Avestin). Проте традиційні гомогенізатори працюють при піковому тиску протягом лише декількох моментів (приблизно 7 %) кожного циклу, що призводить до більших відхилень, менш стабільних продуктів і необхідності виконувати більше проходів або використовувати більш високий тиск, ніж потрібно.

Для деполімеризації полісахаридів використовувалася обробка ультразвуком (див., наприклад, WO 2010/055250). Однак метод ультразвукової деполімеризації не придатний для промислової деполімеризації великої маси полісахариду через його низьку ефективність.

У US20090234108 описується метод часткового деацетилювання полісахариду пневмококкового серотипу 1 шляхом хімічної обробки буфером карбонату натрію (pH 9,0). Цей процес займає багато часу і загрожує руйнуванням імуногенних молекул, що може вплинути на імуногенність кон'югатів.

З усіх причин, зазначених вище, у даній галузі техніки все ще бажаний простий і недорогий процес деполімеризації полісахаридів або похідних полісахаридів.

Виробництво полісахаридно-білкової кон'югованої вакцини специфічне для конкретного білка-носія та нативного полісахариду, що бере участь у процесі кон'югації.

У цій галузі відомі різні способи кон'югації. Кон'югати можуть бути одержані методами прямого відновлювального амінування, карбодіімідної кон'югаційної хімії, гідразидів, активних естерів, норборану, п-нітробензойної кислоти, N-гідроксисукциніміду, S-NHS, EDC, з використанням TSTU, кон'югаційної хімії 1-ціано-4-диметиламіно піридиній тетрафтороборату (CDAP).

Активованій полісахарид зв'язується безпосередньо або через спейсерну (лінкерну) групу з аміногрупою на білку-носії. Лінкери, що використовуються для кон'югації, як розкрито в рівні техніки, є N-сукцинімідил-3-(2-піридилдітіо) пропіонат (SPDP) (SZU TA IH.; 1987). Інші лінкери, B-пропіонамідо (WO 00/10599), нітрофеніл - етиламін (Gever та ін. (1979) Med Microbiol Immunol 165; 171-288), галоалкілгалогенід (патент США № 4,057,685) глікозидовий зв'язок (патент США № 4,673,574), гексан діамін і 6-амінокапронова кислота (патент США № 4,459,286). Marburg та ін., J. Am. Chem. Soc., 108, 5282 (1986), розкрили один засіб кон'югування полісахаридів та імуногенних білків через бігенерінові спейсери. Білок (PRO) дериватизували, щоб показати бічні нуклеофільні або електрофільні групи (PRO*), в той час як полісахарид-партнер (Ps) функціонували таким чином, щоб показати бічні групи протилежної реактивності (Ps*). При комбінуванні Ps* з PRO* утворювалися бігенеричні спейсери, що ковалентно з'єднують Ps з PRO (Ps-PRO). При кислотному гідролізі бігенеричний спейсер (лінкер) вивільняється у вигляді незвичайної амінокислоти, яка кількісно визначається за допомогою амінокислотного аналізу, що дозволяє довести наявність ковалентності.

Полісахаридний компонент полісахаридно-білкових кон'югатів вакцин піддається поступовій деполімеризації зі швидкістю, яка залежить від типу кон'югату, компонентів композиції та умов зберігання. Це призводить до збільшення кількості вільного полісахариду, що негативно вплине на стабільність продукту. Відомо, що кон'югати полісахарид-білок-носії вивільняють вільний полісахарид після кон'югації при подальшій обробці, ліофілізації або зберіганні як у рідких, так і у твердих композиціях. Тільки полісахарид *Salmonella*, ковалентно зв'язаний з білком-носієм (тобто кон'югований полісахарид), є імунологічно важливим для клінічного захисту, а надмірна кількість незв'язаного полісахариду потенційно може призвести до імунологічної гіпореактивності до полісахариду (див. WHO/TRS/9 стор. № 14, A.3.3.5). Зокрема, кон'югати *Salmonella typhi*, про які повідомляється в літературі, мають високий вміст вільного полісахариду до 34 % та високий вміст вільного білка понад 5 %, що вказує на нижчу ефективність кон'югації та нижчу стабільність кон'югатів, що є небажаним. Відповідно, існує потреба у вакцинах із вмістом вільного полісахариду менш ніж 10 %.

Справді, якби можна було розробити загальний процес, який можна було б використати для виробництва та створення композицій усіх вакцинних кандидатів, це значно скоротило б час та ресурси, необхідні для розробки процесу. Це може вплинути на кількість клінічних кандидатів, які можуть бути введені в клінічні випробування. Додатково, процеси, розроблені для клінічних випробувань на ранній стадії, включаючи процеси, розроблені з використанням платформи, можуть бути неоптимальними з точки зору економіки процесу, виходу, об'ємів пулу та пропускної спроможності та можуть бути непридатними для виробництва кількості, необхідної

для пізньої стадії або комерційних кампаній. Ще одним важливим моментом є швидкість розробки процесу з огляду на те, що розробка процесу має відбуватися до введення терапевтичного кандидата у клінічні випробування. Див. Abhinav A. Shukla та ін. *Journal of Chromatography B*, 848 (2007) 28-39.

5 Додатково, захворюваність *Salmonella* висока в країнах, де доступність електроенергії та холодильного обладнання часто недостатня, тому стабільність вакцини при перепадах температури набуває великої актуальності для цих регіонів.

Таким чином, існує потреба в ефективній платформі для виробництва ефективної вакцини проти штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*. яка
10 відповідає численним критеріям, включаючи хорошу імуногенність, безпеку та доступність, зокрема, платформа, яка забезпечує i) покращений вихід полісахариду у процесах ферментації та очищення; ii) покращені процеси очищення, що показують оптимальний відсоток вилучення та мінімальні рівні домішок; iii) покращене співвідношення полісахариду та білкового кон'югату у вакцині і iv) покращений склад, що демонструє низьку в'язкість, позбавлений агрегації, що
15 демонструє довгострокову стабільність у широкому діапазоні температур.

Для подолання вищезгаданих обмежень попереднього рівня техніки та вирішення давно відчуваної незадоволеної глобальної медичної потреби заявник пропонує покращені, альтернативні процеси ферментації, очищення, кон'югації, рецептуру(и) з одержанням
20 моновалентного кон'югату тифозної *Salmonella*, а також мультивалентної(их) вакцини, що містить принаймні один додатковий кон'югат з *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi A*, *B*, *C*), і нетифоїдних *Salmonella* кишкових сероварів *typhimurium* (*S. typhimurium*) та *enteritidis* (*S. enteritidis*).

ЗАВДАННЯ ДАНОГО ВИНАХОДУ

25 Завданням даного розкриття є усунення однієї або декількох проблем попереднього рівня техніки або щонайменше забезпечення корисної альтернативи.

Завданням даного розкриття є розробка ефективної вакцинної композиції для профілактики та лікування інфекцій, спричинених штамами *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* у людей.

30 Іншим завданням даного розкриття є забезпечення вдосконалених способів виробництва полісахаридно-білкової кон'югованої вакцини, що містить полісахарид, одержаний зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, які можуть бути використані в промислових масштабах.

35 Ще одним завданням даного розкриття є моновалентна полісахаридно-білкова кон'югована вакцина, що містить полісахарид, одержаний з будь-якого штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*.

Ще одним завданням даного розкриття є бівалентна полісахаридно-білкова кон'югована вакцина, що містить полісахарид, одержаний з будь-якого з штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* у будь-якій їх комбінації.

40 Ще одним завданням даного розкриття є забезпечення полівалентної полісахаридно-білкової кон'югованої вакцини, що містить полісахарид, одержаний зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* у будь-якій їх комбінації.

Ще одним завданням даного розкриття є забезпечення вдосконаленого способу виробництва полісахариду із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*.

45 Ще одним завданням даного розкриття є забезпечення вдосконаленого способу очищення полісахариду, одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*.

50 Ще одне завдання даного розкриття полягає у забезпеченні вдосконалених способів кон'югації полісахариду (з або без зменшення розміру), одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з білком-носієм.

Ще одним завданням даного розкриття є спосіб кон'югації полісахариду (з або без зменшення розміру), одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, з білком-носієм з або без лінкерної (спейсерної) молекули.

55 Ще одним завданням даного розкриття є забезпечення імуногенних вакцинних композицій, що містять полісахаридно-білкові кон'югати у відповідних флаконах для однократного та багаторазового введення немовлятам та дорослим у відповідних концентраціях, ефективних для забезпечення захисту або лікування інфекцій проти штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* або для запобігання, полегшення або затримки початку або прогресування їх клінічних проявів.

Інші завдання та переваги даного розкриття стануть очевиднішими з наведеного нижче опису, який не призначений для обмеження об'єму даного розкриття.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Дане розкриття забезпечує:

- 5 а) імуногенну композицію, що містить один або більше полісахарид-білковий кон'югат, де полісахарид одержаний із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*;
- б) способи стаціонарного культивування з підкормкою та способи переробки полісахариду, одержаного із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*;
- 10 в) етапи поточної обробки з одержанням полісахариду, одержаного із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*;
- д) способи кон'югації полісахариду (з або без зменшення розміру), одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, з білком-носієм у присутності або відсутності лінкерної молекули; і
- 15 е) способи викликання імунної відповіді у суб'єкта шляхом введення суб'єкту терапевтично ефективною кількістю імуногенної композиції для забезпечення захисту або лікування інфекцій проти штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* або для запобігання, полегшення або затримки початку або прогресування їх клінічних проявів.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ДАНОГО ВИНАХОДУ

20 Хоча дане розкриття може містити різні втілення даного винаходу, деякі втілення даного винаходу показані в наведеному нижче докладному обговоренні, при розумінні того, що дане розкриття може розглядатися як приклад принципів розкриття та не призначене для обмеження об'єму розкриття тим, що проілюстровано та розкрито у цьому описі.

25 Втілення даного винаходу представлені таким чином, щоб всебічно та повно передати об'єм даного розкриття фахівцям у цій галузі. Численні детальні описи, що відносяться до конкретних компонентів та процесів, викладені для забезпечення повного розуміння втілень даного розкриття. Фахівцям у цій галузі буде очевидно, що детальні описи, представлені у втіленнях даного винаходу, не повинні тлумачитися як такі, що обмежують об'єм даного розкриття. У деяких втіленнях даного винаходу відомі композиції, відомі процеси та відомі способи не

30 описані докладно. Термінологія, що використовується в цьому розкритті, призначена тільки для пояснення конкретного втілення даного винаходу, і така термінологія не повинна розглядатися як така, що обмежує об'єм даного розкриття. Як використовується в цьому розкритті, форми однини можуть бути призначені для включення форм множини, якщо з контексту явно не випливає інше.

35 Терміни "містить", "що містить", "в тому числі" та "що має" є необмежуваними перехідними фразами і тому вказують на наявність зазначених ознак, цілих чисел, етапів, операцій, елементів, модулів, вузлів та/або компонентів, але не забороняють присутність або додавання однієї або кількох інших ознак, цілих чисел, етапів, операцій, елементів, компонентів та їх груп. Конкретний порядок етапів, розкритих у способі даного розкриття, не слід тлумачити як такий, що обов'язково вимагає їх виконання таким чином, як описано або проілюстровано. Також слід

40 розуміти, що можуть бути використані додаткові чи альтернативні етапи. Терміни перший, другий, третій тощо, не повинні тлумачитися як такі, що обмежують об'єм даного розкриття, оскільки вищезазначені терміни можуть використовуватися тільки для відмінності одного елемента, компонента, ділянки, шару або секції від іншого компонента, області, ділянки або секції. Такі терміни, як перший, другий, третій тощо, при використанні в цій заявці не мають на увазі конкретної послідовності або порядку, якщо це явно не передбачається справжнім розкриттям. Дане розкриття надає імуногенну композицію та спосіб її одержання.

45 Термін "вакцина" за бажанням може бути замінений терміном "імуногенна композиція" і навпаки.

50 "Одиниці D-антигена" (що також мають назву "міжнародні одиниці" або IU): D-антигенна форма поліовірусу індукуює захисні нейтралізуючі антитіла. Одиниці D-антигена, зазначені в цій заявці (наприклад, у вакцинах за даним винаходом), являють собою вимірювану загальну кількість одиниць D-антигена кожного типу неадсорбованого об'ємного антигену IPV до складання кінцевої вакцини, які додаються в кожну людську дозу складеної вакцини (зазвичай 0, 5 мл кінцевого об'єму). Надійні способи вимірювання одиниць D-антигену добре відомі в цій галузі та опубліковані, наприклад, Європейською фармакопеею. Наприклад, одиниці D-антигену можуть бути виміряні за допомогою тесту ELISA, як описано нижче у Прикладі 1 ("Кількісне визначення D-антигену методом ELISA"). Європейська фармакопея надає тестовий зразок (Європейська фармакопея Біологічний еталонний препарат - доступний Ph. Eur. Secretariat, наприклад, код Р

216 0000) для стандартизації таких методів між виробниками (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-2). Таким чином, значення одиниці D-антигена добре відоме в даній галузі.

Термін "доза" у цій заявці зазвичай означає одне введення вакцини за даним винаходом, яке, як правило, є однією ін'єкцією. Типова доза для людини становить 0,5 мл. Звичайно, в рамках графіка введення вакцини можуть вводитися різні дози.

Термін "IPV" або імуногенна композиція, що містить ці компоненти, в цій заявці означає інактивовані вірус поліомієліту типу 1 (наприклад, Mahoney, як переважно використовується), типу 2 (наприклад, MEF-1) або типу 3 (наприклад, Saukett), або серотип Sabin 1, 2, 3 комбінації двох чи всіх трьох цих типів. Прикладом повної (або стандартної) дози (40-8-32 D антигенних одиниць IPV на основі Salk типів 1, 2 і 3 відповідно) імуногенної композиції IPV для цілей даного за даним винаходом може бути Poliovac® (Serum Institute of India Pvt. Ltd.).

Термін "сахарид" у даній специфікації може означати полісахарид або олігосахарид і включає обидва з них. Антиген капсульного сахариду може бути полісахаридом повної довжини або може бути розширений до бактеріальних "розмірних сахаридів" і "олігосахаридів" (які, природно, мають низьку кількість одиниць, що повторюються, або які є полісахаридами, зменшеними в розмірі для легкості контролю, але все ще здатними викликати захисну імунну відповідь у хазяїна).

Згідно з першим втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може містити один або кілька кон'югатів полісахарид-білок, де полісахарид одержаний зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*.

Згідно з другим втіленням даного розкриття спосіб одержання полісахариду, одержаного з штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* за допомогою процесу стаціонарного культивування може включати будь-яку підмножину або усі з наступних етапів:

1. Інокуляція, культивування та збирання бактерій у композиціях ферментаційного середовища
2. Інактивація
3. Розподіл
4. Освітлення, та
5. Стерилізація фільтруванням.

Згідно з першим аспектом другого втілення даного винаходу, композиції ферментаційного середовища можуть включати джерело вуглецю, сіль магнію, джерело фосфату, дріжджовий екстракт і гідролізат сої. Джерело вуглецю може бути обрано з групи, що складається з глюкози, маніту, сахарози, лактози, фруктози та трегалози, краще глюкози. Сіль магнію може бути обрана з магнію хлориду, сульфату магнію, краще гептагідрату сульфату магнію. Джерело калію може бути вибраний з гептагідрату ди-натрію гідрогенфосфату, моногідрату натрію дігідрогенофосфату, фосфату калію і дикалій фосфату. Краще, коли джерело калію є комбінацією гептагідрату динатрію гідрогенфосфату і дигідрогенфосфата натрію. Краще, коли соєвий гідролізат є гісоєвим.

Однак, відповідно, ферментаційне середовище може додатково містити протипінний агент, вибраний з групи, що складається з Antifoam 204, Antifoam C, SE-15, Y-30, Antifoam EX-Cell, S184 (чиста кремнієва олива), SLM54474 (поліпропіленгліколь: PPG), VP1133 (суміш кремнієвої оливи та PPG), BREOX (поліалкіленгліколь), J673 STRUKTOL (алкоксильовані естери жирних кислот на рослинній основі) та SE9 (водна емульсія з 10 % компонентом кремнієвої оливи) від Wacker-Chemie Co. Протипінний агент у поєднанні з соєвим гідролізатом та дріжджовим екстрактом може сприяти покращенню виходу полісахаридів. Ще краще, коли як протипінний агент використовується Antifoam C або J673 STRUKTOL.

Відповідно до втілень даного винаходу даного розкриття, дріжджовий екстракт може являти собою автолізат дріжджів, підданий дії ультрафіолетового опромінювання, дріжджовий екстракт або синтетичний дріжджовий екстракт. Дріжджовий екстракт може бути вибраний із BD BBL™, BD BACTO™, Difco™ тощо. У кращому втіленні дріжджовий екстракт може бути ультрафільтрованим дріжджовим екстрактом, наприклад, дріжджовим екстрактом Difco™, UF. Соєвий гідролізат може бути обраний із соєвого борошна, соєвого пептону та соєвої крупчатки, але не обмежуючись наведеним. В одному втіленні даного винаходу гідролізат сої може бути Difco™ Select Phytone™ UF. В іншому втіленні даного винаходу гідролізат сої може бути гісоєю.

Поєднання протипінного засобу, соєвого пептону та дріжджового екстракту призводить до підвищення виходів порівняно з іншими середовищами.

Відповідно до другого аспекту другого втілення даного винаходу, даного винаходу, процес може слідувати стратегії "двох пострілів" шляхом включення вмісту корму у фіксованій пропорції у певні фіксовані проміжки часу, коли ферментація вже йде, та/або забезпечення безперервної

подачі корму протягом всього режиму ферментації з харчуванням від партії, що включає декілька стадій із пропорційним збільшенням розміру партії на кожній стадії.

Відповідно до третього аспекту другого втілення даного винаходу, параметри ферментації можуть включати:

- 5 Температура: $36,0 \pm 2$ °C
- Перемішування: 150-600 об./хв.
- pH: $7,0 \pm 0,5$
- Розчинений кисень: від 30 % до 90 %
- Повітря (нл/хс): від 2 до 10
- 10 Витрата газу: 60-600 нл/хв
- Осмоляльність: 400-600 мОсм/кг

Згідно з четвертим аспектом другого втілення даного винаходу, інактивація бактеріальної культури може бути проведена з використанням формаліну.

- 15 Ще краще інактивація бактеріальної культури може бути здійснена за допомогою формальдегіду в діапазоні від 0,1 до 2 % об./об., краще 0,5 % об./; інкубують при температурі від 34 до 38 градусів С, краще 36 градусів С; протягом 5-12 годин, краще від 8 до 12 годин.

- 20 Згідно з п'ятим аспектом другого втілення даного винаходу, розподіл може бути проведено центрифугуванням. Ще краще, коли розподіл проведений центрифугуванням з параметрами, встановленими при температурі 2-8 градусів С; оборотах за хвилину - 7000-8000; часу центрифугування 40-60 хв.

Відповідно до шостого аспекту другого втілення даного винаходу, освітлення може здійснюватися за допомогою глибинної фільтрації.

- 25 Згідно з сьомим аспектом другого втілення даного винаходу, освітлені зібрані клітини можуть бути стерилізовані за допомогою фільтрації з використанням стерильних фільтрів 0,2 мкм.

Відповідно до восьмого аспекту другого втілення даного винаходу, вихід сирого Vi-полісахариду (ViPs) *Salmonella enterica* серовар typhi на стадії ферментації може становити не менш ніж 40 %, а середній вихід Vi-полісахариду може знаходитися в діапазоні від 100 мг/л до 5000 мг/л; краще 100-700 мг/л.

- 30 Згідно з третім втіленням даного розкриття, кількість клітин, одержана у результаті ферментації, може бути піддана будь-якій підмножині або в будь-якому порядку або усім наступним етапам очищення з одержанням Vi-полісахариду (ViPs) бажаної якості:

- 35 а) освітлення зібраних клітин бактеріального капсульного полісахариду шляхом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше одну мембрану з розміром пор приблизно 0,2 мікрметра;

б) концентрування методом ультрафільтрації з тангенціальним потоком (TFF) та обмін буфера методом діалізації (DF) з використанням мембрани, що має 10-300 кДа або кД відсікання молекулярної маси (MWCO);

- 40 с) обробка аніонним або катіонним детергентом, етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA) (від 4 до 10 мМ) та ацетатом натрію (від 5 % до 10 %) для денатурації білків, нуклеїнових кислот та ліпополісахариду;

д) осаджування спиртом (від 40 до 70 %);

е) центрифугування та фільтрація методом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлювальний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм;

- 45 ф) обробка лужною сіллю для видалення надлишку детергенту з наступним центрифугуванням і фільтрацією методом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлювальний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм;

г) концентрування методом тангенціальної проточної фільтрації (TFF) та обмін буфера за допомогою кД відсікання молекулярної маси (MWCO);

h) обробка аніонним або катіонним детергентом;

- 50 і) центрифугування та фільтрація методом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлювальний фільтр з розміром пор від приблизно 0,45 мікрметра до приблизно 0,2 мікрметра;

ж) видалення домішок білків та нуклеїнових кислот шляхом промивання гранул спиртом (50 % - 70 %) у присутності хлориду натрію (0,1М - 2М);

- 55 к) селективне осадження полісахариду шляхом використання спирту (<75 % або >95 %);

l) розчинення полісахариду в WFI і регулювання його концентрації шляхом тангенціальної проточної фільтрації (TFF) та буферного обміну за допомогою діалізації (DF) з використанням мембрани, що має 10-300 кДа або кД відсікання молекулярної маси (MWCO); і

- 60 м) стерильна фільтрація через щонайменше один стерильний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мікрметра в стерильних умовах.

Згідно з першим аспектом третього втілення даного винаходу, процес очищення може бути позбавлений будь-якого етапу хроматографії.

Згідно з другим аспектом третього втілення даного винаходу, процес очищення може призвести до значного вилучення приблизно від 40 % до 65 % з бажаними рівнями О-ацетилу (більш ніж 2,0 ммоль/г полісахариду), вихід очищеного полісахариду V_i може знаходитися в діапазоні від 1000 до 4000 мг/л, середня молекулярна маса може знаходитися в діапазоні від 40 до 400 кДа, містить менш ніж 1 % білків/пептидів, менш ніж 2 % нуклеїнових кислот, менш ніж 100 ОЕ ендотоксинів на мкг полісахариду (PS), молекулярний розподіл за розмірами (більш ніж 50 % PS елюювали до досягнення коефіцієнта розподілу (KD) 0,25).

Краще, коли середня молекулярна маса очищеного полісахариду V_i знаходиться в діапазоні від 40 до 400 кДа.

Згідно з третім аспектом третього втілення даного винаходу, аніонний детергент може бути вибраний з групи, що містить алкілсульфати, натрію додецил сульфат (SDS), натрій дезоксихолат, натрій додецилсульфонат, натрій s-алкілсульфат, натрій поліоксіетилен етер сульфати жирних кислот, натрій олеїл сульфат, натрій N-олеїл полі (амінокислота), алкілбензолсульфонати натрію, альфа-олефінусульфонат натрію, алкілсульфонати натрію, естери альфа-сульфомонокарбонових кислот, естери сульфоалкілів жирних кислот, сукцинатсульфонат, алкілнафталінсульфонати, натрій алкіл сульфони, натрій лігнінсульфонати та натрій алкіл гліцерил етер сульфони.

Краще, коли зазначений аніонний детергент є алкілсульфатом, краще додецилсульфатом натрію в кінцевій концентрації в діапазоні від 0,1 до 20 %, краще в діапазоні 1-20 %, може бути додано до ретентату і перемішано при 25 °C-30 °C протягом 2 годин.

Згідно з четвертим аспектом третього втілення даного винаходу, осаджування спиртом може бути проведено з використанням метанолу, етанолу, n-пропілового спирту, ізопропілового спирту, ацетону або t-бутилового спирту; або їх комбінації.

Однак краще, коли зазначений спирт являє собою етанол.

Згідно з п'ятим аспектом третього втілення даного винаходу, лужна сіль може бути обрана з групи, що складається з натрієвої, калієвої, кальцієвої та магнієвої солі. Краще, коли лужна сіль є калієвою сіллю, вибраною з групи, що складається з хлориду калію, ацетату калію, сульфату калію, карбонату калію, бікарбонату калію, фосфату калію, гідрогенфосфату калію, дигідрогенофосфату калію, нітрату калію або інших солей калію, або комбінацій двох чи більше з них.

Ще краще, коли зазначена сіль калію є хлоридом калію при кінцевій концентрації в діапазоні від 0,1M до 2M, який змішується з супернатантом, і після його розчинення суміш інкубується при 2-8 °C протягом >3 годин.

Відповідно до шостого аспекту третього втілення даного винаходу, катіонний детергент може бути вибрано з групи, що складається з цетилтриметиламонієвої солі, тетрабутиламонієвої солі, миристилтриметиламонієвої солі та гексадиметрин броміду; або їх комбінації.

Ще краще, щоб зазначений катіонний детергент являв собою цетилтриметиламоній бромід (СТАВ) при кінцевій концентрації в діапазоні від 0,1 % до 12 %; краще при 2 % - 3 %, додається ретентат і перемішується при 25 °C-30 °C протягом 1-2 годин.

Згідно з сьомим аспектом третього втілення даного винаходу, кінцева очищена маса полісахариду може зберігатися при температурі меншій ніж або що дорівнює -20 °C.

Згідно з четвертим втіленням даного розкриття, клітини, зібрані після ферментації, можуть бути піддані будь-якій підмножині або в будь-якому порядку або на всіх наступних етапах очищення з одержанням бажаної якості О-специфічного полісахариду з ліпополісахариду (LPS) *Salmonella Paratyphi A*:

а) центрифугування та розділення

б) концентрування шляхом ультрафільтрації в тангенціальному потоці (TFF) та обмін буфера шляхом діалізації (DF) з використанням мембрани з відсіканням молекулярної маси (MWCO) 10-300 кДа;

с) кислотний гідроліз LPS

д) центрифугування та розділення

е) нейтралізація

ф) освітлення LPS шляхом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше одну мембрану з розміром пор від 0,45 до 0,2 мікрметрів;

г) обробка аніонним або катіонним детергентом,

h) центрифугування та розділення

i) прямоточна фільтрація (DFF) через щонайменше одну мембрану, що має розмір пор від 0,45 до 0,2 мікрметрів;

j) концентрування шляхом ультрафільтрації в тангенціальному потоці (TFF) та обмін буфера шляхом діфільтрації (DF) з використанням мембрани з відсіканням молекулярної маси (MWCO) 10-300 кДа;

k) осаджування спиртом (від 40 до 70 %);

l) центрифугування та фільтрація методом прямоточної фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлювальний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм;

m) обробка лужною сіллю для видалення надлишку детергенту з наступним центрифугуванням і фільтрацією методом прямоточної фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлюючий фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм;

n) концентрування шляхом тангенціальної проточної фільтрації (TFF) та обмін буфера шляхом молекулярної маси (MWCO) 10-300 кДа;

o) видалення домішок білків та нуклеїнових кислот шляхом промивання гранул спиртом (50 % - 70 %) у присутності хлориду натрію (0,1M - 2M);

p) розчинення полісахариду в WFI і регулювання його концентрації шляхом тангенціальної проточної фільтрації (TFF) та буферного обміну шляхом діфільтрації (DF) з використанням мембрани, що має відсікання молекулярної маси (MWCO) 10-300 кДа; і

q) стерильна фільтрація через щонайменше один стерильний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мікрметра в стерильних умовах.

Згідно з першим аспектом четвертого втілення даного винаходу, кислотний гідроліз LPS може бути проведений краще з використанням оцтової кислоти (кінцева концентрація 0,5-5 %) pH~2,0-3,0; температура 30-90 градусів Цельсія та період приблизно 100-200 хвилин.

Відповідно до другого аспекту четвертого втілення даного винаходу, нейтралізація кислотного гідролізу може бути проведена краще з використанням рідкого аміаку для досягнення кінцевого pH 7,0.

Згідно з третім аспектом четвертого втілення даного винаходу, аніонний детергент може бути вибраний з групи, що складається з алкілсульфатів, натрій дезоксихолату, додецилсульфонату натрію, s-алкілсульфатів натрію, натрій поліоксіетиленетерсульфатів жирних спиртів, олеїлсульфату натрію, N-олеїлполі (амінокислоти) натрію, натрій алкілбензолсульфонатів, натрій альфа-олеїнсульфонату, натрію алкіл сульфонатів, естерів альфа-сульфомонокарбонової кислоти, естерів сульфоалкіл жирних кислот, сукцинат сульфонату, алкілнафталін сульфонатів, алкансульфонатів натрію, лігнінсульфонату натрію та сульфонатів алкілгліцерилевого етеру натрію.

Краще, коли зазначений аніонний детергент є дезоксихолатом натрію в кінцевій концентрації в діапазоні від 0,1 до 20 %, ще краще в діапазоні 1-2 %, може бути додано до ретентату і перемішано при 25 °C-30 °C протягом 10-120 хвилин.

Згідно з четвертим аспектом четвертого втілення даного винаходу, осаджування спиртом може бути проведено з використанням метанолу, етанолу, n-пропілового спирту, ізопропілового спирту, ацетону або t-бутилового спирту; або їх комбінації.

Однак краще, коли зазначений спирт являє собою етанол.

Згідно з п'ятим аспектом четвертого втілення даного винаходу, лужна сіль може бути обрана з групи, що складається з натрієвої, калієвої, кальцієвої та магнієвої солі. Краще, коли лужна сіль є калієвою сіллю, вибраною з групи, що складається з хлориду калію, ацетату калію, сульфату калію, карбонату калію, бікарбонату калію, фосфату калію, гідрогенфосфату калію, дигідрогенофосфату калію, нітрату калію або інших солей калію, або комбінації двох чи більше з них.

Ще краще, коли зазначена калійна сіль є хлоридом калію при кінцевій концентрації в діапазоні від 0,1M до 2M, який змішується з супернатантом, і після його розчинення суміш інкубується при 2-8 °C протягом >3 годин.

Відповідно до шостого аспекту четвертого втілення даного винаходу, катіонний детергент може бути вибраний з групи, що складається з цетилтриметиламонієвої солі, тетрабутиламонієвої солі, миристилтриметиламонієвої солі та гексадиметрин броміду; або їх комбінації.

Відповідно до сьомого аспекту четвертого втілення даного винаходу, процес очищення може бути позбавлений будь-якого етапу хроматографії.

Згідно з дев'ятим аспектом четвертого втілення даного винаходу, процес призводить до значного зниження вмісту ендотоксину (< 100 OE ендотоксину на мкг PS), білка (< 1 %) і нуклеїнових кислот (< 2 %), більш високому вилученню капсульного полісахариду, краще в діапазоні від 40 до 65 %, з бажаними рівнями O-ацетилю (> 2,0 ммоль/г полісахариду), розподілу

молекулярного розміру ($> 50\%$ PS елюється до досягнення коефіцієнта розподілу (KD) 0,25) і середня молекулярна маса очищеного О-специфічного полісахариду може знаходитися в діапазоні від 40 до 200 кДа.

5 Згідно з десятим аспектом четвертого втілення даного винаходу, кінцева очищена маса полісахариду може зберігатися при температурі меншій ніж або що дорівнює $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Згідно з п'ятим втіленням даного розкриття, очищений полісахарид *Salmonella enterica* сероварів штамів *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* може бути ковалентно зв'язаний з білком-носієм (CP) за допомогою реакції кон'югації карбодііміду, відновного амінування або ціанілювання.

10 Згідно з першим аспектом п'ятого втілення даного винаходу, очищений полісахарид *Salmonella enterica* сероварів штамів *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, полісахарид може бути ковалентно зв'язаний з білком-носієм (CP), вибраним з групи, що складається з токсину правця, правцевого анатоксину (TT), дифтерійного анатоксину (DT), CRM197, токсину *Pseudomonas aeruginosa*, анатоксину *Clostridium perfringens*, токсину *E. coli* LT, *E. coli* ST, термолабільного токсину *Escherichia coli* - субодиниця B, комплексу зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*, rEPA, протеїну D з *H. influenzae*, флагелліну FliC, гемоціану з *PsOE. aeruginosa*, комплексу зовнішньої мембрани *s* (OMPC), поринів, білків, що зв'язують трансферин, пневмолізіну, пневмококового поверхневого адгезину A (*PsaA*), пневмококового BH-1, протективного антигену (PA) *Bacillus anthracis* та детоксифікованого фактору набряку (EF) та летального фактору (LF) *Bacillus anthracis*, овальбуміну, гемоціаніну фісурели (KLH), сироваткового альбуміну людини, бичачого сироваткового альбуміну (BSA), очищеного білка, похідного туберкуліну (PPD), синтетичних пептидів, білків теплового шоку, кашлюкових білків, цитокінів, лімфокінів, гормонів, факторів росту, штучних білків, що містять клітини з різних антигенів, отриманих від патогенів, таких як N 19, білків поглинання заліза, токсину A або B з *C. difficile* та білків *S. agalactiae* з лінкером або без нього, а також їх фрагментів, похідних, модифікацій.

20

25

Однак краще, коли білок-носіє, який використовується для кон'югації з полісахаридом *Salmonella typhi* Vi, є правцевим анатоксином. Полісахариди, отримані з *S. paratyphi* A, *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, переважно можуть бути індивідуально кон'юговані з білком-носієм, вибраним із правцевого анатоксину, дифтерійного анатоксину або CRM197. Відповідно до даного розкриття передбачені імуногенні композиції, що включають наступні кон'югати полісахарид-білок-носіє: *S. typhi*, кон'югований з правцевим анатоксином, *S. paratyphi* A, кон'югований з TT або DT або CRM197; *S. typhimurium*, кон'югований з TT або DT або CRM197 і *S. enteritidis*, кон'югований з TT або DT або CRM197; *S. typhi*, кон'югований зі правцевим анатоксином, *S. paratyphi* A, кон'югований зі правцевим анатоксином; *S. typhimurium*, кон'югований з CRM197 і *S. enteritidis*, кон'югований з CRM197; і *S. typhi*, кон'югований зі правцевим анатоксином, *S. paratyphi* A, кон'югований з DT; *S. typhimurium*, кон'югований з CRM197 і *S. enteritidis* кон'югований зі правцевим анатоксином і *S. typhi* кон'югований зі правцевим анатоксином, *S. paratyphi* A кон'югований з CRM197; *S. typhimurium* кон'югований з CRM197 та *S. enteritidis* кон'югований зі правцевим анатоксином.

30

35

40

Відповідно до даного розкриття CRM197 отримують з рекомбінантного штаму CS463-003 (MB101) *Pseudomonas fluorescens* від Pfenex USA.

Відповідно до даного розкриття, TT отримують з *Clostridium Tetani* (Гарвардський № 49205), одержаного з Центрального науково-дослідного інституту (CRI), Національного контрольного управління, Касаулі, Хімачал-Прадеш, Індія. Центральний дослідницький інститут (CRI) придбав даний штам у NVI, Нідерланди.

45

Відповідно до даного розкриття, DT виробляється з культур штаму *Corynebacterium diphtheriae* Park-Williams Number 8, штам одержаний з Центрального науково-дослідного інституту (CRI), Касаулі, Хімачал-Прадеш, Індія.

50 Відповідно до другого аспекту п'ятого втілення даного винаходу, перед кон'югацією очищений полісахарид *Salmonella enterica* сероварів штамів *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* може бути підданий деполімеризації/класифікації хімічними засобами, вибраними з групи FeCl_3 , H_2O_2 , метаперіодату натрію та ацетату натрію, або механічними засобами, вибраними з групи руйнування клітин під високим тиском та гомогенізатора.

55 Однак краще, коли очищений полісахарид *Salmonella enterica* серовар штамів *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* підданий деполімеризації/класифікації шляхом руйнування клітин під високим тиском.

60 Ще краще, коли очищений полісахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* (ViPs) підданий деполімеризації/класифікації ацетатом натрію (від 5 % до 10 %), при цьому середня молекулярна маса ViPs може знаходитися в діапазоні від 40 до 400 кДа.

Ще краще, коли очищений полісахарид *Salmonella enterica* серовар *typhi* (ViPs) підданий деполімеризації/класифікації ацетатом натрію (від 5 % до 10 %), при цьому середня молекулярна маса ViPs може знаходитися в діапазоні 100-250 кДа.

Заявником було знайдено, що ефективність кон'югації/вихід кон'югату, імуногенність кон'югатів, одержаних з використанням частково зменшених у розмірах полісахаридів, була вищою порівняно з кон'югатами, одержаних з повнорозмірних полісахаридів. Також зменшення розмірів полісахаридів знижує в'язкість розчину та збільшує кількість реактивних кінцевих груп, обидва фактори сприяють збільшенню частоти утворення ковалентних зв'язків.

В якості альтернативи очищений полісахарид *Salmonella enterica* сероварів *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. typhimurium* і *S. enteritidis* може не піддаватися деполімеризації/класифікації.

Відповідно до третього аспекту п'ятого втілення даного винаходу, перед кон'югацією білок-носії (CP) може бути дериватизований для включення, аміно та/або карбоксильних груп за допомогою гетеро- або гомо-біфункціонального лінкеру, вибраного з групи, що складається з гідразину, карбогідразиду, хлориду гідразину, дигідразиду, ϵ -аміногексанової кислоти, хлоргексанол диметилацеталу, D-глюкуронолактону, цистаміну і п-нітрофенілетиламіну, гександіаміну, етилендіаміну, 1,6-діамінооксигексану або β -пропінамідо, нітрофеніл етиламіну, галоалкіл галіду, 6-аміно капроєвої кислоти та їх комбінацій за допомогою карбодіїмиду, відновлювального амінування або ціанілювання.

Краще, коли гетеро- або гомо-біфункціональний лінкер є дигідразидом, ще краще дигідразидом адипінової кислоти.

Гідразидні групи можуть бути введені в білки через карбоксильні групи залишків аспаргінової та глютамінової кислот на білку за допомогою карбодіїмиду, відновного амінування, ціанілювання, реакції, наприклад, реакції з гідрaziном, карбогідразидом, дигідразид сукцинілом, дигідразидом адипінової кислоти, гідразин хлоридом (наприклад, гідразин дигідрохлоридом) або будь-якими іншими дигідразидами у присутності карбодіїмиду, такого як 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіїмід (EDC). EDC використовується як каталізатор для активації та модифікації білкового реактиву гідрaziном або дигідразидом.

Ще краще реакцію білка-носія (CP) з дигідразидом адипінової кислоти (ADH) у присутності карбодіїмиду, такого як 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіїмід (EDC) проводити при pH від 5 до 7; ще краще 6.

Відповідно, реакція білка-носія (CP) з дигідразидом адипінової кислоти (ADH) у присутності карбодіїмиду, такого як 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіїмід (EDC), може бути зупинена шляхом підвищення pH приблизно від 6 до приблизно 7-8.

Альтернативно, після дериватизації білка-носія з ADH метод може додатково містити етап обміну буфера за допомогою діафільтрації (DF) з використанням мембрани або 10 кДа, або 30 кДа, або 50 кДа з відсіканням молекулярної маси (MWCO) і стерильної фільтрації з використанням фільтра 0.2 мкм; при цьому дериватизований білок-носії ADH або замінюють буфером щонайменше в 10 об'ємах, або пропускають через відповідну колонку для гел-фільтрації і видаляють по суті всі непрореагували сполуки, залишковий ADH і залишковий EDC, отримуючи очищений дериватизований білок-носії ADH.

Альтернативно, перед кон'югацією білок-носії може бути дериватизований не аміно та/або карбоксильними групами за допомогою гетеро- або гомо-біфункціонального лінкеру.

Згідно з третім аспектом п'ятого втілення даного винаходу, перед кон'югацією очищений полісахарид *Salmonella enterica* сероварів *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, полісахарид може бути дериватизований для включення аміно- та/або карбоксильних груп за допомогою гетеро- або гомо-біфункціонального лінкеру, вибраного з групи, що складається з гідразину, карбогідразиду, гідразинхлориду, дигідразиду, їх суміші, ϵ -аміногексанової кислоти, хлоргексанол диметилацеталу, D-глюкуронолактону, цистаміну і п-нітрофенілетиламіну, гександіаміну, етилендіаміну, 1,6-діамінооксигексану або β -пропінамідо, нітрофенілетиламіну, галоалкіл галіду, 6-амінокапроєвої кислоти та їх комбінацій за допомогою карбодіїмиду, реакції відновного амінування або ціанілювання.

Краще, коли гетеро- або гомо-біфункціональний лінкер є дигідразидом, ще краще дигідразидом адипінової кислоти.

Гідразидні групи можуть бути введені в полісахарид *Salmonella enterica* сероварів *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* за допомогою карбодіїмиду, відновного амінування, реакції ціанілювання, наприклад, реакції полісахариду з гідрaziном, карбогідразидом, сукцинілдигідразидом, дигідразидом адипінової кислоти, хлоридом гідразину (наприклад, гідразин дигідрохлоридом) або будь-якими іншими дигідразидами у присутності бромціану (CNBr) можуть утворювати похідні гідразиду Vi полісахариду.

Краще, коли *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A OSP дериватизована лінкером дигідразиду адипінової кислоти (ADH) за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагент ціанилювання вибраний з групи 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT) (CPIP), 1-ціано-імідазолу (1-CI), 1-ціанобензотріазолу (1-CBT), 1-ціано-4-(диметиламіно)-піридиній тетрафтороборату ("CDAP"), п-нітрофенілціанату та N-ціанотриетиламоній тетрафтороборату ("СТЕА") або 2-ціанопіридазин-3(2H) он (2-CPO).

Ще краще, коли OSP *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A піддають дериватизації лінкером дигідразиду адипінової кислоти (ADH) за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагентом ціанилювання є 1-ціано-4-пірролідінопіридиній тетрафтороборат (CP1) 1:10 за масою OSP: ADH і співвідношення OSP: CPPT може знаходитися в діапазоні від 0,5 і 1,5, реакцію проводять при pH в діапазоні 7-10, тривалість реакції 1-2 години, температура в діапазоні від 2 °C до 30 °C.

Згідно з ще одним аспектом п'ятого втілення даного винаходу, перед кон'югацією полісахарид не може бути дериватизований для включення, аміно та/або карбоксильних груп через гетеро- або гомо-біфункціональний лінкер.

Кращий аспект п'ятого втілення даного винаходу, в якому полісахарид *Salmonella enterica* серовар typhi (ViPs) може бути ковалентно зв'язаний з білком-носієм за допомогою карбодіімідної кон'югаційної хімії, де в якості каталізатора може бути використаний будь-який водорозчинний карбодіімід, більш переважно 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (EDC).

Краще, коли полісахарид Vi ковалентно зв'язаний з ADH дериватизованим білком-носієм за допомогою хімії кон'югації карбодіімиду, де як каталізатор може бути використаний будь-який водорозчинний карбодіімід, краще 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (EDC).

Ще краще, коли полісахарид Vi ковалентно зв'язаний з дериватизованим ADH правцевим анатоксином за допомогою карбодіімідної кон'югаційної хімії, де як каталізатор може бути використаний будь-який водорозчинний карбодіімід, краще 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімід.

В якості альтернативи дериватизований ADH полісахарид Vi може бути ковалентно зв'язаний з дериватизованим ADH правцевим токсидом за допомогою карбодіімідної кон'югаційної хімії, де в якості каталізатора може бути використаний будь-який водорозчинний карбодіімід, краще 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (EDC).

В якості альтернативи дериватизований ADH полісахарид Vi може бути ковалентно зв'язаний з правцевим анатоксином за допомогою карбодіімідної кон'югаційної хімії, де як каталізатор може бути використаний будь-який водорозчинний карбодіімід, краще 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (EDC).

Краще, коли очищені ViPs ковалентно зв'язують з білком-носієм (CP) за допомогою реакції карбодіімідної кон'югації в присутності 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімиду (EDAC), змішаного у співвідношенні від 1:0,5 до 1:2 маси ViPs: EDAC та співвідношення полісахариду Vi та білка-носія може знаходитися в діапазоні від 0,5 до 1,5, реакція проводиться при pH в діапазоні 5-7, температурі в діапазоні від 2 °C до 30 °C.

Ще один аспект п'ятого втілення даного винаходу, полісахарид Vi (ViPs) може бути ковалентно зв'язаний з ADH дериватизованим правцевим токсином (TT) у присутності 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімиду (EDC), де співвідношення за масою ViPs:TT:EDC може становити 1:1:2 і концентрація полісахариду Vi та правцевого токсину може бути між 0.1 мг/мл - 10,0 мг/мл, а співвідношення полісахариду Vi та правцевого анатоксину може знаходитися в діапазоні від 0,5 до 1,5.

Ще один аспект п'ятого втілення даного винаходу, реакція полісахариду Vi (ViPs) з дериватизованим правцевим анатоксином (TT) у присутності 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімиду (EDC) може бути проведена при pH в діапазоні від 5 до 7; краще 6; температурі в діапазоні від 2 до 30 °C; краще від 10 до 25 °C і ефективності конверсії кон'югації $\geq 70\%$, краще $\geq 90\%$ і молекулярному розмірі кон'югату краще від 1000 до 1600 кДа.

Додатково реакція дериватизованого правцевого анатоксину (TT) і полісахариду Vi (ViPs) у присутності карбодіімиду, такого як 1-етил-3(3-диметиламінопропіл) карбодіімід (EDC), може бути зупинена шляхом підвищення pH приблизно від 6 до приблизно 7-8.

Згідно з одним аспектом п'ятого втілення даного винаходу, полісахарид *S. paratyphi* A полісахарид (OSP) може бути кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагент ціанилювання обраний з групи, що складається з 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтор 1-ціано-імідазолу (1-CI), 1-ціанобензотріазолу (1-CBT), 1-ціано-4-(диметиламіно)-піридиній тетрафтороборату ("CDAP"), п-нітрофенілціанату та N-ціанотриетиламоній тетрафтороборату ("СТЕА") або 2-ціанопіридазин-3(2H) он (2-CPO).

Краще, коли *S. paratyphi* A OSP кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагентом ціанилювання є 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборат (CPPT) або (CPIP).

5 Ще краще, коли очищений OSP *S. paratyphi* A ковалентно зв'язаний з білком-носієм (CP) за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагентом ціанилювання є 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборат (CPPT), змішаний у співвідношенні від 1: до 1:2 за масою OSP: CPPT та співвідношення OSP та білка-носія може знаходитися в діапазоні від 0,5 до 1,5, реакцію проводять при pH у діапазоні 5-7, температурі в діапазоні від 2 °C до 30 °C.

10 Краще, коли білок-носіє, що використовується для кон'югації з полісахаридом OSP *S. paratyphi* A являє собою правцевий анатоксин.

Білок-носіє, що використовується для кон'югації з полісахаридом OSP *S. paratyphi* A може бути дифтерійним анатоксином.

Білок-носіє, що використовується для кон'югації з полісахаридом OSP *S. paratyphi* A може бути CRM 197.

15 Ще один аспект п'ятого втілення даного винаходу, полісахарид *S. typhimurium* полісахарид може бути кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагент ціанилювання обраний з групи, що складається з 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT), імідазолу (1-CI), 1-ціанобензотріазолу (1-CBT), 1-ціано-4-(диметиламіно)-піридиній тетрафтороборату ("CDAP"), п-нітрофенілціанату та N-ціанотриетиламмоній тетрафтороборату ("СТЕА") або 2-ціанопіридазин-3(2H) он (2-CPO).

20 Краще, коли полісахарид *S. typhimurium* кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагентом ціанилювання є 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборат (CPPT).

Білок-носіє, який використовується для кон'югації з полісахаридом *S. typhimurium*, також може бути правцевим анатоксином.

Білок-носіє, що використовується для кон'югації з полісахаридом *S. typhimurium*, може бути також дифтерійним анатоксином.

Білок-носіє, який використовується для кон'югації з полісахаридом *S. typhimurium*, також може бути CRM 197.

30 Згідно з ще одним аспектом п'ятого втілення даного винаходу, полісахарид *S. enteritidis* полісахарид може бути кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагент ціанилювання обраний з групи, що складається з 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT), імідазолу (1-CI), 1-ціанобензотріазолу (1-CBT), 1-ціано-4-(диметиламіно)-піридиній тетрафтороборату ("CDAP"), п-нітрофенілціанату та N-ціанотриетиламмоній тетрафтороборату ("СТЕА") або 2-ціанопіридазин-3(2H) он (2-CPO).

35 Краще, коли полісахарид *S. enteritidis* кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанилювання, де реагентом ціанилювання є 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборат (CPPT).

40 Краще, коли білок-носіє, який використовується для кон'югації з полісахаридом *S. enteritidis*, є правцевим анатоксином.

Білок-носіє, що використовується для кон'югації з полісахаридом *S. enteritidis*, може бути також дифтерійним анатоксином.

Білок-носіє, який використовується для кон'югації з полісахаридом *S. enteritidis*, може бути також CRM 197.

45 Заявник знайшов способи стабілізації кінцевого полісахаридно-білкового кон'югату шляхом використання альтернативних методів кон'югації, співвідношення полісахариду та білка, співвідношення полісахариду та сполучних агентів, використання відповідних лінкерів, відповідного розміру полісахариду. Це може призвести до поліпшення співвідношення полісахарид - білковий кон'югат у вакцині, що в свою чергу може зменшити кількість вільного сахариду і вільного білка в кон'югаті, зменшити інгібування білка-носія, покращити стерильну фільтрованість кон'югату, краще контролювати кон'югацію і більша кількість перехресних зв'язків всередині групи опосередковано забезпечують хорошу імунну відповідь.

50 Заявник виявив, що на сполучення полісахаридів та білків впливають різні фактори, що залежать від молекулярної маси ViPs, типу обраного білка-носія, співвідношення кількості полісахариду та білка-носія, активації функціональних груп, використання спейсерів та хімії кон'югації.

60 Згідно з ще одним аспектом п'ятого втілення даного винаходу, після реакції кон'югації метод може включати етап концентрування за допомогою ультрафільтрації з тангенціальним потоком (TFF) та заміни буфера за допомогою діалізації (DF) з використанням мембрани з молекулярною масою 100 кДа або 300 кДа (MWCO); при цьому основну масу кон'югату

концентрують щонайменше в 3 рази і видаляють по суті всі непрореаговані сполуки, некон'югований полісахарид, некон'югований білок і залишковий EDC, отримуючи очищену полісахаридну кон'юговану вакцину Vi.

Додатково, метод може включати гель-фільтраційну хроматографію, при якій основну масу кон'югату концентрують щонайменше в 3 рази і видаляють практично всі прореагували сполуки, некон'юговані полісахариди, некон'юговані білки і залишковий EDC, отримуючи очищену *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, при цьому вихід кон'югату становить $\geq 50\%$.

Подальший метод очищення може включати комбінацію ультрафільтрації і гель-фільтраційної хроматографії.

Згідно з шостим втіленням даного винаходу, імуногенна композиція може бути моновалентною вакциною, що містить полісахарид *S. typhi* Vi, кон'югований з білком-носієм, або полісахарид *S. paratyphi A*, кон'югований з білком-носієм, або *S. typhimurium*, кон'югований з білком-носієм, або *S. enteritidis*, кон'югований з білком-носієм.

Згідно з сьомим втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може включати щонайменше одну бівалентну комбінацію:

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носії (CP);
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* сахарид-білок-носії (CP);

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носії (CP);
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-білок-носії (CP);

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носії;
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* сахарид-білок-носії;

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* сахарид-білок-носії;
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-білок-носії;

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* сахарид-білок-носії;
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* сахарид-білок-носії;

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-білок-носії;
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* сахарид-білок-носії;

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT в дозі від 1,25 до 50 мкг;

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* OSP-CP в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-CP у дозі від 1,25 до 50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить сахарид-CP кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Згідно з восьмим втіленням даного розкриття, в якому імуногенна композиція може включати щонайменше одну тривалентну комбінацію:

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носії (CP);
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* сахарид-білок-носії;

- c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-білок-носії;

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носії;
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-білок-носії;

або

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* сахарид-білок-носії;
- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* сахарид-білок-носії;

або

- c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-білок-носії;

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT в дозі від 1,25 до 50 мкг;

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* OSP-CP у дозі від 1,25 до 50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-CP у дозі від 1,25 до 50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить сахарид-СР кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де СР являє собою ТТ або DT або CRM197.

Згідно з дев'ятим втіленням даного розкриття, тетравалентна імуногенна композиція може містити: i) полісахарид *S. typhi* Vi, кон'югований з білком-носієм (СР); ii) полісахарид *S. paratyphi* А, кон'югований з білком-носієм; iii) полісахарид *S. enteritidis*, кон'югований з білком-носієм, та iv) полісахарид *S. typhimurium*, кон'югований з білком-носієм.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-ТТ у дозі від 1,25 до 50 мкг;

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi* А OSP-СР у дозі від 1,25 до 50 мкг; де СР являє собою ТТ або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* сахарид-СР у дозі від 1,25 до 50 мкг; де СР являє собою ТТ або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить сахарид-СР кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де СР являє собою ТТ або DT або CRM197.

Згідно з десятичним втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може додатково містити один або більш ніж антигенів, вибраних із групи, що складається, але не обмежуючись наведеним, з *Salmonella paratyphi* В, *Salmonella paratyphi* С, антигенів *Salmonella*, таких як везикули зовнішньої мембрани, білки зовнішньої мембрани (наприклад, OmpC, OmpD, OmpF), сидерофори (ентеробактин), білки системи секреції III типу (наприклад, SipB, SipD, SseB, SseC та PrgI), флагеллін, нетифозні *Salmonella* spp. *Shigella*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter species*, *Yersinia species*, види *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* (серотипи а, с, d, e, f та некапсульовані штами), непатит (штами А, С, D, E, F і G), та грип, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* type 5, *Staphylococcus aureus* type 8, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae* (1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6G, 6H, 7A, 7B, 7C, 7F, 8, 9A, 9L, 9F, 9N, 9V, 10F, 10B, 10C, 10A, 11 A, 11F, 11B, 11C, 11D, 11E, 12A, 12B, 12F, 13, 14, 15A, 15C, 15B, 15F, 16A, 16F, 17A, 17F, 18C, 18F, 18A, 18B, 19A, 19B, 19C, 19F, 20, 20A, 20B, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24A, 24B, 24F, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33A, 33C, 33D, 33E, 33F, 33B, 34, 45, 38, 35A, 35B, 35C, 35F, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A, 48), Group А *Streptococcus*, Group В *Streptococcus* (group Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, and IX.), *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus pneumonia*, *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella pestis*, *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium* spp., *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Treponema* spp., *Borrelia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* spp., *Hemophilus ducreyi*, *Corynebacterium diphtheria*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Shigella* spp., *Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp and *N. meningitidis* полісахарид (А, В, С, D, W135, X, Y, Z та 29E) ацелюлярний кашлюковий антиген, модифікована аденілатциклаза, малярійний антиген (RTS, S), сибірка, денге, малярія, кір, паротит, краснуха, БЦЖ, вірус папіломи людини, японський енцефаліт, денге, зика, ебола, чикунгунья, поліовірус, ротавірус, віспа, жовта лихоманка, флавівірус, оперізуючий лишай та антигени вірусу вітряної віспи.

Згідно з одинадцятим втіленням даного розкриття, що відрізняється тим, що композиція містить щонайменше одну комбінацію:

а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носіє;

б) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* А сахарид-білок-носіє;

с) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* С сахарид-білок-носіє;

д) кон'югований антиген Y-сахарид *Neisseria meningitidis* сахарид-білок-носіє;

е) кон'югований антиген W-135 *Neisseria meningitidis* сахарид-білок-носіє;

ф) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* X сахарид-білок-носіє;

або

а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* сахарид-білок-носіє;

б) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi* А сахарид-білок-носіє;

с) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* А сахарид-білок-носіє;

д) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* С сахарид-білок-носіє;

е) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* Y-сахарид-білок-носіє;

ф) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* W-135 сахарид-білок-носіє;

г) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* X сахарид-білок-носіє;

або

- [illegible]

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT в дозі від 1,25 до 50 мкг;

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A OSP-CP в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

5 Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид-CP у дозі від 1,25 до 50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis сахарид-CP в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

10 Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* A сахарид - TT в дозі 5 мкг

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* C сахарид - CRM197 у дозі 5 мкг

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* Y сахарид - CRM197 в дозі 5 мкг

15 Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* W сахарид - CRM197 у дозі 5 мкг

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген X сахарид - TT *Neisseria meningitidis* в дозі 5 мкг

20 Згідно з дванадцятим втіленням даного розкриття, в якому імуногенна композиція містить щонайменше одну комбінацію:

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид-білок-носії;
- b) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний зі штаму Salk або Sabin
- c) дифтерійний анатоксин, (D) антиген
- d) правцевий анатоксин, (T) антиген

25 e) цілюноклітинний кашлюковий (wP) антиген або ацелюлярний кашлюковий (aP) антиген;
f) поверхневий антиген вірусу гепатиту B (HBsAg) та
g) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
або

30 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
b) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin
c) антиген ротавірусу;
d) дифтерійний анатоксин, (D) антиген

35 e) правцевий анатоксин, (T) антиген
f) цілюноклітинний кашлюковий (wP) антиген або ацелюлярний кашлюковий (aP) антиген;
g) поверхневий антиген вірусу гепатиту B (HBsAg) та
h) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
або

40 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
c) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin
d) дифтерійний анатоксин, (D) антиген

45 e) правцевий анатоксин, (T) антиген
f) цілюноклітинний кашлюковий (wP) антиген або ацелюлярний кашлюковий (aP) антиген;
g) поверхневий антиген вірусу гепатиту B (HBsAg) та
h) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
або

50 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
c) антиген ротавірусу;

d) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin
e) дифтерійний анатоксин, (D) антиген
f) правцевий анатоксин, (T) антиген

55 g) цілюноклітинний кашлюковий антиген, (wP) або ацелюлярний кашлюковий антиген, (aP);
h) поверхневий антиген вірусу гепатиту B (HBsAg) та
i) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
або

60 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
d) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin

- е) дифтерійний анатоксин, (D) антиген
 ф) правцевий анатоксин, (Т) антиген
 г) цільноклітинний кашлюковий антиген, (wP) або ацелюлярний кашлюковий антиген, (aP);
 5 h) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та
 i) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
 або
 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 10 c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
 d) антиген ротавірусу;
 e) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin
 f) дифтерійний анатоксин, (D) антиген
 g) правцевий анатоксин, (Т) антиген
 h) цільноклітинний кашлюковий (wP) антиген або ацелюлярний кашлюковий (aP) антиген;
 15 i) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та
 j) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
 або
 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 20 c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
 d) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis сахарид білок-носії;
 e) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin
 f) дифтерійний анатоксин, (D) антиген;
 g) правцевий анатоксин, (Т) антиген;
 25 h) цільноклітинний кашлюковий (wP) антиген або ацелюлярний кашлюковий (aP) антиген;
 i) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та
 j) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib);
 або
 a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 30 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
 d) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis сахарид білок-носії;
 e) антиген ротавірусу;
 f) антиген інактивованого вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Salk або Sabin;
 35 g) дифтерійний анатоксин, (D) антиген;
 h) правцевий анатоксин, (Т) антиген;
 i) цільноклітинний кашлюковий (wP) антиген або ацелюлярний кашлюковий антиген (aP);
 j) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та
 k) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib).
 40 Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT в дозі від 1,25 до 50 мкг.
 Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A OSP-CP в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.
 Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид-CP у дозі від 1,25 до 50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.
 45 Краще, коли 0,5 мл композиції містить сахарид-CP кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.
 Ще краще композиція містить дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл
 50 Однак переважно композиція містить анатоксин правця, (Т) в кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл.
 Краще, коли композиція містить цільноклітинний кашлюковий антиген (wP) в кількості від 1 до 50 МО на 0,5 мл або ацелюлярний кашлюковий (aP) антиген, що включає один або декілька з модифікованої аденілатциклази, кашлюкового анатоксину (PT) 1-50 мкг FHA) 1-50 мкг, пертактину (P69 або PRN) 1-20 мкг або фімбріальних білків (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;
 55 Краще, коли композиція містить поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) в кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;
 Краще, коли композиція містить антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

Краще, коли композиція містить інактивованний ротавірусний антиген, вибраний з CDC-9, CDC-66 або будь-яких інших інактивованих штамів ротавірусу, присутній у кількості від 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

- 5 Краще, коли композиція містить інактивованний антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; при цьому IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 D-антигенних одиниць (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 D-антигенних одиниць (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 D-антигенних одиниць (DU) на 0,5мл;

Згідно з тринадцятим втіленням даного розкриття, в якому імуногенна композиція містить щонайменше одну комбінацію:

- 10 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 с) антиген ротавірусу;
 с) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентерогеморагічний);
 d) антиген *Shigella* spp;
 e) антиген *Campylobacter jejuni*;
 15 f) антиген *Vibrio cholerae*;
 або
 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 с) антиген ротавірусу;
 20 d) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентерогеморагічний);
 e) антиген *Shigella* spp;
 f) антиген *Campylobacter jejuni*;
 g) антиген *Vibrio cholerae*;
 або
 25 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 с) антиген ротавірусу;
 d) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентерогеморагічний);
 e) антиген *Shigella* spp;
 30 f) антиген *Campylobacter jejuni*
 або
 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 с) антиген ротавірусу;
 35 d) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентерогеморагічний);
 e) антиген *Shigella* spp;
 або
 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 40 с) антиген ротавірусу;
 d) антиген *Shigella* spp;
 або
 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis сахарид білок-носії;
 45 с) антиген ротавірусу;
 d) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентерогеморагічний);
 t) антиген *Shigella* spp;
 f) антиген *Campylobacter jejuni*;
 g) антиген *Vibrio cholerae*;
 50 або
 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;
 b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
 с) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
 d) антиген ротавірусу;
 55 e) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентерогеморагічний);
 f) антиген *Shigella* spp;
 g) антиген *Campylobacter jejuni*;
 h) антиген *Vibrio cholerae*;
 або
 60 а) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi сахарид білок-носії;

- b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A сахарид білок-носії;
- c) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид білок-носії;
- d) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis сахарид білок-носії;
- e) антиген ротавірусу;
- f) діареогенний антиген *Escherichia coli* spp. (ентеротоксигенний та ентєрогеморагічний);
- g) антиген *Shigella* spp;
- h) антиген *Campylobacter jejuni*;
- i) антиген *Vibrio cholerae*.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT в дозі від 1,25 до 50 мкг.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар Paratyphi A OSP-CP в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhimurium сахарид-CP у дозі від 1,25 до 50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли 0,5 мл композиції містить сахарид-CP кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар enteritidis в діапазоні доз 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197.

Краще, коли композиція містить інактивований ротавірусний антиген, вибраний з CDC-9, CDC-66 або будь-яких інших інактивованих штамів ротавірусу, присутній у кількості від 1 до 50 мкг на 0,5 мл.

Згідно з одним аспектом втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити буферний агент, вибраний з групи, що складається з карбонату, фосфату, ацетату, HEPES, сукцинату, гістидину, TRIS, борату, цитрату, лактату, глюконату та тартрату, а також більш складні органічні буферні агенти, включаючи фосфатний буферний агент, який містить фосфат натрію та/або фосфат калію у співвідношенні, підбраному для досягнення бажаного рН. В іншому прикладі буферний агент містить трис (гідроксиметил) амінометан, або "Трис", підбраний для досягнення бажаного рН. Ще в одному прикладі буферний агент може бути мінімально необхідним середовищем з солями Хенкса. Інші буфери, такі як HEPES, піперазин-N, N'-біс (PIPES) та 2-етансульфонова кислота (MES), також передбачені цим розкриттям. Буфер допомагає стабілізувати імуногенну композицію даного розкриття. Кількість буфера може знаходитися в діапазоні від 0,1 мМ до 100 мМ, переважно вибраного з 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 22 мМ, 23 мМ, 24 мМ, 25 мМ, 26 мМ, 27 мМ, 28 мМ, 29 мМ та 30 мМ. Кількість буфера може знаходитися в діапазоні 0,1 мг - 2,0 мг.

Цитратний буфер може бути одержаний шляхом розчинення моногідрату лимонної кислоти (CAM) у діапазоні від 1,05 до 2,63 мг та дегідрату цитрату тринатрію (TCD) у діапазоні 1,47-3,68 мг.

Переважно, імуногенна композиція може додатково містити TRIS або цитратний буфер, або гістидиновий буфер, або сукцинатний буфер в діапазоні 0,1 мг - 2,0 мг.

Переважно, імуногенна композиція може додатково містити буфер TRIS в діапазоні 0,61 мг - 1,52 мг.

Переважно, імуногенна композиція може додатково містити цитратний буфер в діапазоні від 10 до 25 мМ.

Переважно, імуногенна композиція може додатково містити гістидиновий буфер в діапазоні від 0,78 до 1,94 мг.

Переважно, імуногенна композиція може додатково містити сукцинатний буфер у кількості від 0,59 до 1,48 мг.

Згідно з ще одним аспектом втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити фармацевтично прийнятні ексципієнти, вибрані з групи, що складається з цукрів, поверхнево-активних речовин, полімерів, солей, амінокислот або модифікаторів рН.

Приклади поверхнево-активних речовин можуть включати іонні та неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбат 20, полісорбат 40, полісорбат 60, полісорбат 65, полісорбат 80, полісорбат 85, нонілфенокси поліетанол, т-октилфенокси поліетоксиетанол, октоксінол 40, ноноксінол-9, тріетаноламін, тріетаноламін поліпептид олеат, поліоксіетилен-660 гідроксистеарат, поліоксіетилен-35 рицинолеат, соєвий лецитин та полоксамер.

Переважно, імуногенна композиція може містити полісорбат 20 як фармацевтично прийнятний ексципієнт.

Приклади полімерів можуть включати декстран, карбоксиметилцелюлозу, гіалуронову кислоту, циклодекстрин тощо.

Приклади солей можуть включати NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , MgCl_2 тощо. Переважно, сіль може бути NaCl. Зазвичай кількість солі може знаходитися в діапазоні від 100 мМ до 200 мМ.

Переважно, імуногенна композиція може містити хлорид натрію в діапазоні 1-10 мг.

Приклади амінокислот як ексципієнт вибирають з групи L-гістидину, лізину, ізолейцину, метіоніну, гліцину, аспаргінової кислоти. Трицин, аргінін, лейцин, глутамін, аланін, пептид, гідролізований білок або білок, такий як сироватковий альбумін.

5 Переважно, імуногенна композиція може містити гістидин.

Приклади цукрів в якості ексципієнта вибрані з групи сахарози, маніту, трегалози, маннози, раффінози, лактитолу, лактобіонової кислоти, глюкози, мальтулози, ізо-мальтулози, мальтози, сорбіту лактози, декстрози, фруктози, гліцеролу або їх комбінацій.

Переважно імуногенна композиція може додатково містити сахарозу.

10 Приклади полімерів як ексципієнт вибрані з групи декстрану, карбоксиметилцелюлози, гіалуронової кислоти, циклодекстрину.

Ще краще, якщо однодозова композиція не містить консерванту.

Однак переважно багатодозова імуногенна композиція може додатково містити консервант, вибраний з групи, що складається з 2-феноксіетанолу, бензетонію хлориду (фемеролу),
15 фенолу, м-крезолу, тіомерсалу, формальдегіду, естерів парабенів (наприклад, метил-, етил-, бутилпарабену), бензалконію хлориду, бензилового спирту, хлорбутанолу, п-хлор-м-крезолу, бензилового спирту або їх комбінації. Вакцинна композиція може містити матеріал однієї імунізації або матеріал для декількох імунізацій (тобто "багатодозовий" набір). У багатодозові композиції переважно включають консервант. Як альтернатива (або на додачу) до включення консерванта в багатодозові композиції, композиції можуть утримуватися в контейнері, що має асептичний адаптер для видалення матеріалу. Переважно, консервантом може бути 2-феноксіетанол у діапазоні від 0,1 мг до 50 мг; більш переважно 1-10 мг.

20 Ще в одному аспекті втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити допоміжні речовини, такі як зволожувачі або емульгуючі агенти, розбавляють рН буферні агенти, добавки, що желюють або підвищують в'язкість, консерванти, ароматизатори, барвники тощо, залежно від маршруту введення та бажаного препарату.

У кращому втіленні даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити воду для ін'єкцій як розріджувач.

30 Згідно з ще одним аспектом втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити ад'ювант, вибраний із групи, що складається з солі алюмінію, гідроксиду алюмінію, фосфату алюмінію, гідроксифосфату алюмінію та сульфату алюмінію калію.

В іншому аспекті втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити імуностимулюючий компонент, вибраний з групи, що складається з емульсії масла і води, MF-59, ліпосоми, ліпополісахариду, сапоніну, ліпиду А, похідних ліпиду А, монофосфорил-ліпиду А, 3-деацильованого монофосфорил ліпиду А, AS01, AS03, олігонуклеотиду, олігонуклеотиду, що включає принаймні один неметилований CpG та/або ліпосому, ад'юванту Фройнда, повного ад'юванту Фройнда, неповного ад'юванту Фройнда, полімерів, кополімерів, таких як поліоксіетилен-поліоксипропілен кополімери, включаючи блок кополімери, полімер р 1005, ад'ювант CRL-8300, мураміл дипептид, агоністи TLR-4, флагелін, флагеліни, отримані з грамнегативних бактерій, агоністи TLR-5, фрагменти флагелінів, здатні зв'язуватися з рецепторами TLR-5, альфа-С-галактозилкерамід, хітозан, інтерлейкін-2, Q.S.-21, ISCOMS, скваленові суміші (SAF-1), Quil A, субодиночку холерного токсину В, поліфосфазен та похідні, препарати клітинної стінки та мікобактерій, похідні міколевої кислоти, неіонні блок-сополімерні поверхнево-активні речовини, OMV, fHbp, комбінації сапонінів зі стеринами та ліпідами.

45 Ще в одному аспекті втілення даного винаходу, імуногенна композиція може бути повністю рідкою. Відповідні форми рідкого препарату можуть включати розчини, суспензії, емульсії, сиропи, ізотонічні водні розчини, в'язкі композиції та еліксири, забуферені до вибраного рН.

Тим не менш, переважно імуногенна композиція може бути повністю рідкою, може бути стабільною при 2-8 °C, 25 °C і 40 °C протягом шести місяців, а вільний полісахарид через 6
50 місяців не більш ніж 7,5 % для полісахариду 180-220 кДа та вільний полісахарид через 6 місяців не більш ніж 10,5 % для полісахариду 388/80/45 кДа.

Імуногенна композиція даного розкриття може бути у формі трансдермальних препаратів, включаючи лосьйони, гелі, спреї, мазі та інші відповідні засоби. Якщо бажане назальне або респіраторне (слизове) введення (наприклад, аерозольна інгаляція або інсуфляція),
55 композиції можуть бути у формі та дозуватися за допомогою спреї-дозатора, насосного дозатора або аерозольного дозатора. Аерозолі зазвичай знаходяться під тиском за допомогою вуглеводню. Насосні дозатори можуть переважно видавати дозовану дозу або дозу з певним розміром частинок. Коли імуногенні композиції знаходяться у формі розчинів, суспензій та гелів, у деяких втіленнях даного винаходу вони містять основну кількість води (переважно очищеної
60 води) на додачу до активного інгредієнта (інгредієнтів). В альтернативному аспекті втілення

даного винаходу, імуногенна композиція може бути ліофілізованою або сублімованою композицією.

Терміни "сублімаційне сушіння" або "ліофілізувати" або "ліофілізація", що використовуються у цій заявці, мають на увазі ліофілізацію і відносяться до процесу, при якому суспензія/розчин заморожується, після чого вода видаляється шляхом сублімації при низькому тиску. Як використовується в цій заявці, термін "сублімація" відноситься до зміни фізичних властивостей композиції, при якому композиція переходить безпосередньо з твердого стану у газоподібний стан, не перетворюючись на рідину.

Відповідно, ліофілізована імуногенна композиція може бути стабільною при температурі 2-8 °C від 12 до 36 місяців; при 25 °C від 2 до 6 місяців; при 37 °C від 1 тижня до 4 тижнів, при 42 °C протягом 2-7 днів і при 55 °C протягом 2-7 днів.

Згідно з одним аспектом втілення даного винаходу, спосіб відновлення ліофілізованої імуногенної композиції може включати стадію відновлення ліофілізованої імуногенної композиції водним розчином, необов'язково фізіологічним розчином або водою для ін'єкцій (WFI), при цьому кінцевий рН імуногенної композиції після вилучення знаходиться в діапазоні від рН 6. 0; більш переважно в діапазоні від рН 7,0 до рН 8,0; ще краще в діапазоні від рН 7,2 до рН 7,9; і найбільш переважно в діапазоні від рН 7,5 до рН 7,9.

Згідно з дев'ятим втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може бути розроблена для використання в способі зменшення початку або запобігання стану здоров'я, що включає інфекцію *Salmonella* сероварів *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, що включає введення імунологічно ефективної кількості імуногенної композиції людині парентерально або підшкірно або внутрішньошкірно, внутрішньом'язово або внутрішньочеревно або внутрішньовенно, або ін'єкційно, або з постійним вивільненням з імплантатів, або маршрутом введення очних крапель, або назально або ректально, або буккально, або вагінально, перорально, або внутрішньошлунково або слизово або перлінквально, альвеолярно або в ясна, шляхом вдихання через ніс або через слизову оболонку дихальних шляхів або будь-якими іншими шляхами імунізації.

Відповідно до переважного аспекту втілення даного винаходу, імуногенна композиція може бути введена людині внутрішньом'язово або підшкірно.

Відповідно до переважного аспекту втілення даного винаходу, імунологічно ефективна кількість імуногенної композиції, що містить полісахарид - білковий кон'югат для вакцинації проти бактеріальної інфекції *Salmonella* серовар штамів *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* може становити приблизно 1 мкг/0.5 мл полісахаридного кон'югату штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* або *S. enteritidis* або менш ніж приблизно 100 мкг/0,5 мл полісахаридного кон'югату штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* або *S. enteritidis* або більше. У деяких інших аспектах воно може становити приблизно від 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50 мкг до приблизно 55, 60, 65 70, 75, 80, 85, 90 або 95 мкг на 0,5 мл разової дози. У деяких втіленнях даного винаходу, імунологічно ефективна кількість для вакцинації проти бактеріальної інфекції *Salmonella* сероварів штамів *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* становить від 1 мкг/0,5 мл до 50 мкг/0.5 мл; більш переважно *Salmonella enterica* серовар *typhi* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; присутній у дозі від приблизно 5 мкг/ 0.5 мл до приблизно 30 мкг/ 0,5 мл; Краще, коли *Salmonella enterica* серовар *typhi* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; *Salmonella enterica* серовар *Paratyphi A* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; *Salmonella enterica* серовар *typhimurium* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; *Salmonella enterica* серовар *enteritidis* антигенний кон'югат сахарид - білок носій; присутній у дозі приблизно 25 мкг/ 0,5 мл.

Згідно з десятим втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може вводитися внутрішньом'язово або підшкірно в дозі, ефективної для вироблення нейтралізуючого антитіла та захисту. Вакцини вводять способом, сумісним з дозувальною формулою, та в такій кількості, яка буде профілактично та/або терапевтично ефективною проти інфекції *Typhoidal* та *NTS*. Імуногенна композиція даного розкриття може вводитися як первинний профілактичний засіб літнім людям, підліткам, дорослим або дітям, що піддаються ризику інфекції, або може використовуватися як вторинний засіб для лікування інфікованих пацієнтів. Наприклад, імуногенна композиція, розкрита в цій заявці, може застосовуватися у людей похилого віку, підлітків, дорослих або дітей віком менш ніж 2 років або більш ніж 2 років при ризику зараження штамми *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* і *S. enteritidis* інфекції, або

можуть бути використані як вторинні агенти для лікування інфікованих *Salmonella* сероварів *S. typhi*; *S. paratyphi A*; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* пацієнтів.

Як альтернатива вакцини проти NTS можуть вводитися немовлятам віком від двох до чотирьох місяців, до того як настане пік захворюваності у віці приблизно 12 місяців. Додатково, впровадження вакцини, ймовірно, також охоплюватиме групи населення, інфіковані ВІЛ, оскільки вони схильні до підвищеного ризику зараження NTS. У розвинених країнах вакцинація проти NTS може бути спрямована на людей похилого віку, серед яких спостерігається дуже високий рівень смертності (до 50 відсотків). Було запропоновано, що у дітей програмна реалізація на місцях буде інтегрована безпосередньо до існуючих графіків Розширеної програми імунізації, можливо, у віці 6, 10 та 14 тижнів.

Більш переважно, імуногенна композиція може вводитися внутрішньом'язово або підшкірно в дозуванні об'ємом приблизно 0,5 мл або 1 мл.

Згідно з одинадцятим втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може бути представлена у вигляді однодозових флаконів або багатодозових флаконів (2 дози або 5 доз або 10 доз) або багатодозового набору або у вигляді попередньо заповнених шприців, де зазначена імуногенна композиція може вводитися за схемою одноразової дози переважно за схемою багаторазової дози, при якій за первинним курсом вакцинації слід 1-3 окремі дози, що вводяться в наступні часові інтервали через 1-3 роки, якщо необхідно. Режим дозування також принаймні частково визначатиметься потребою в бустерній дозі, необхідною для забезпечення захисного імунітету.

Краще, коли імуногенна композиція розроблена для введення людському суб'єкту старшого віку, підліткам, дорослим або дітям віком менш ніж 2 років або більш ніж 2 років відповідно до однодозової або дводозової або тридозової схеми, що складається з першої дози та/або другої дози, що вводиться у період від 3 місяців до 2 років після введення першої дози та/або третьої дози, що вводиться у період від 3 місяців до 2 років після введення другої дози.

Згідно з одинадцятим втіленням даного розкриття, імуногенна композиція може вводитися одночасно з іншими препаратами або будь-якою іншою вакциною.

Тим не менш, згідно з одним аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, в якому набір вакцин для однієї дози може включати:

перший контейнер, що містить ліофілізовану (висушену сублімацією) імуногенну композицію:

- a) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis A* сахарид - ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- b) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis C* сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- c) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis Y* сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- d) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis W-135* сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- e) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis X* сахарид - ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- f) сахароза 1-12 мг на 0,5 мл;
- g) цитрат натрію (дигідрат) 0,1-2 мг на 0,5 мл;
- h) Трис-буфер 0,05-0,5 мг на 0,5 мл;
- i)

другий контейнер, що містить рідку композицію для відновлення ліофілізованої (висушеною сублімацією) імуногенної композиції, що містить:

- a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT 1,25-50 мкг на 0,5 мл;
- b) Хлорид натрію 1-10 мг на 0,5 мл;
- c) Воду для ін'єкцій (WFI) q.s.;

за відсутності антигенної інтерференції ViPs-TT з антигенами *Neisseria meningitidis*, для профілактики тифу, викликаного *Salmonella typhi* та антигенами *Neisseria meningitidis*, при цьому зазначена вакцинна композиція достатня для вироблення необхідної Т-залежної імунної відповіді проти *S. Typhi*, включаючи дітей у віці менш ніж 2 роки, підлітків, дорослих і людей похилого віку, за допомогою всього однієї ін'єкції для складання повного графіка вакцинації.

Ще згідно з другим аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, де набір вакцин для однієї дози може включати:

перший контейнер, що містить ліофілізовану (висушену сублімацією) імуногенну композицію:

- a) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis A* сахарид - ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- b) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis C* сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- c) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis Y* сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- d) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis W-135* сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- e) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis X* сахарид - ТТ 5 мкг на 0,5 мл;
- f) сахароза 1-12 мг на 0,5 мл;

g) цитрат натрію (дигідрат) 0,1-2 мг на 0,5 мл;

h) трис-буфер 0,05-0,5 мг на 0,5 мл;

i

другий контейнер, що містить рідку композицію для відновлення ліофілізованої (висушеною сублімацією) імуногенної композиції, що містить:

a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT 1,25-50 на).5 мл;

b) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар paratyphi A OSP-CP 1,25-50 мкг на 0.5 мл; де CP являє собою TT або DT або CRM197;

c) хлорид натрію 1-10 мг на 0.5 мл;

d) воду для ін'єкцій (WFI) q.s.;

за відсутності антигенної інтерференції ViPs-TT; антигену OSP з антигенами *Neisseria meningitidis*, для профілактики тифу та паратифів, викликаних *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* та антигенами *Neisseria meningitidis*, де зазначена вакцинна композиція достатня для того, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi* та *paratyphi* в тому числі в дітей віком до 2 років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою лише однієї ін'єкції для складання повного графіка вакцинації.

Ще згідно з третім аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, де набір вакцин для однієї дози може включати:

перший контейнер, що містить повністю рідку шестивалентну імуногенну композицію:

a) інактивованний антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;

b) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

c) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

d) цілоклітинний кашлюковий, (wP) антиген у кількості від 1 до 50 МО на 0.5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що включає одну або кілька модифікованих аденілатциклаз, обраних з: Pertussis toxoid (PT) 1-50 мкг, Filamentous hemagglutinin (1-50 мкг, Pertactin (P69 або PRN) 1-20 мкг або Fimbrial proteins (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

e) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

i

другий контейнер, що містить повністю рідку імуногенну композицію, що включає:

a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT 1,25-50 мкг на 0.5 мл;

b) хлорид натрію 1-10 мг на 5 мл; та/або

c) Трис-буфер або цитратний буфер або гістидиновий буфер або сукцинатний буфер 0,1 мг - 1,6 мг на 0.5 мл; та/або

d) полісорбат, вибраний з полісорбату 20, полісорбату 40, полісорбату 60, полісорбату 65, полісорбату 80, полісорбату 85, нонілфеноксиполіетоксетанолу, октоксинуолу 40, ноноксинуол-9, 3,, соєвий лецитин та полоксамер у кількості 25-500 мкг на 0.5 мл; та/або

e) 2-феноксіетанол 1-10 мг на 0.5 мл; та/або

f) воду для ін'єкцій (WFI) q.s.

де відсутня антигенна інтерференція ViPs-TT з імуногенною шестивалентною композицією, для профілактики тифу, викликаного *Salmonella typhi* та шестивалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi*, у тому числі у дітей років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою тільки однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

Ще згідно з четвертим аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, в якому набір вакцин для однієї дози може включати:

перший контейнер, що містить повністю рідку шестивалентну імуногенну композицію:

a) інактивованний антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;

b) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

c) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

d) цілоклітинний кашлюковий, (wP) антиген у кількості від 1 до 50 МО на 0,5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що включає одну або кілька модифікованих аденілатциклаз, обраних з: Pertussis toxoid (PT) 1-50 мкг, Filamentous hemagglutinin (1-50 мкг, Pertactin (P69 або PRN) 1-20 мкг або Fimbrial proteins (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

e) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

i

другий контейнер, що містить повністю рідку імуногенну композицію, що включає:

a) кон'югований антиген *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT 1,25-50 мкг на 0.5 мл;

5 b) *Salmonella enterica* серовар *paratyphi* A OSP-CP кон'югований антиген 1,25-50 мкг на 0.5 мг; де CP являє собою TT або DT або CRM197;

c) хлорид натрію 1-10 мг; та/або

d) трис-буфер або цитратний буфер або гістидиновий буфер або сукцинатний буфер 0,1 мг - 1,6 мг на 0.5 мл; та/або

10 g) полісорбат, вибраний з полісорбату 20, полісорбату 40, полісорбату 60, полісорбату 65, полісорбату 80, полісорбату 85, нонілфеноксиполіетоксетанолу, октилфеноксиполіетоксетанолу, окстоксинулу 40, ноноксинулу - 9, триетаноламіну, триетаноламін поліпептид олеату, поліоксіетилен- 660 гідроксистеарата, поліоксіетилен- 35 рициноолеату, соєвого лецитину та полоксамеру; у кількості 25-500 μг на 0.5 мл; та/або

h) 2-феноксипропанолу 1-10 мг на 0.5 мл; та/або

15 e) воду для ін'єкцій (WFI) q.s.

за відсутності антигенної інтерференції ViPs-TT; OSP антигену з шестивалентними антигенами, для профілактики тифу та паратифів, викликаних *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* та шестивалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня для того, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi* та *paratyphi* у дітей молодше 2
20 років, підлітків, дорослих та літніх людей за допомогою лише однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

Ще згідно з п'ятим аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, в якому набір вакцин для однієї дози може включати:

перший контейнер, що містить повністю рідку семивалентну імуногенну композицію:

25 a) інактивований антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;

b) інактивований ротавірусний антиген, вибраний з CDC-9, CDC-66 або будь-яких інших інактивованих штамів ротавірусу, присутній у кількості від 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

30 c) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

d) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

e) цілноклітинний кашлюковий, (wP) антиген у кількості від 1 до 50 МО на 0.5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що включає одну або кілька модифікованих аденілатциклаз, обраних з: Pertussis toxoid (PT) 1-50 мкг (FILAMENTOUS hemagglutinin) 1-50 мкг, Pertactin (P69 або PRN) 1-20 мкг або Fimbrial proteins (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

35 f) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

i

40 другий контейнер містить рідку композицію для розчинення ліофілізованої (сублімованої) імуногенної композиції, що включає:

a) *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT кон'югований антиген 1.25-50 мкг на 0.5 мл;

b) Хлорид натрію 1-10 мг на 0.5 мл;

c) Вода для ін'єкцій (WFI) q.s.;

45 де відсутня антигенна інтерференція ViPs-TT з імуногенною семивалентною композицією, для профілактики тифу, викликаного *Salmonella typhi* та семивалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi*, у тому числі у дітей років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою тільки однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

Ще згідно з шостим аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, де набір для
50 односторової вакцини може включати:

a) перший контейнер, що містить повністю рідку гептавалентну імуногенну композицію:

a) інактивований polio virus (IPV) антиген, обраний з Sabin або Salk Strain; де IPV Type 1 у дозі 1-50 D-антигенних одиниць (DU), IPV Type 2 у дозі 1-50 D-антигенних одиниць (DU) або IPV Type 3 у дозі 1-50 D-антигенних одиниць (DU), на 0.5 мл;

55 b) інактивований ротавірусний антиген, обраний з CDC-9, CDC-66 або будь-якого іншого інактивованого ротавірусного штаму, присутнього у кількості у межах від 1 до 50 мкг на 0.5 мл;

c) дифтерійний токсод, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0.5 мл;

d) тетанус токсод, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0.5 мл;

60 e) цілноклітинний кашлюк, (wP) антиген у кількості від 1 до 50 IOU на 0.5 мл або ацелюлярний кашлюк, (aP) антиген, що містить одну чи більше аненілат циклазу, обрані з

Pertussis toxoid (PT) 1-50мкг, Filamentous hemagglutinin (FHA) 1-50мкг, Pertactin (P69 або PRN) 1-20мкг або Fimbrial proteins (FIM 1, 2 and 3) 2-25мкг; на 0.5 мл;

f) поверхневий антиген вірусу гепатиту B, (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0.5 мл;

g) а *Haemophilus influenzae* антиген типу b, (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0.5 мл;

5

та

другий контейнер містить повністю рідку імуногенну композицію, що включає:

a) *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT кон'югатний антиген 1.25-50 мкг на 0.5 мл;

b) *Salmonella enterica* серовар *paratyphi* A OSP-CP кон'югатний антиген 1.25-50 мкг на 0.5 мл; де CP-це або TT або DT або CRM197;

10

c) натрій хлорид 1-10 мг на 0.5 мл; та/або

d) Tris буфер або цитратний буфер або гістидиновий буфер або сукцинатний буфер 0.1 мг - 1.6 мг на 0.5 мл; та/або

g) полісорбат, вибраний з: полісорбат 20, полісорбат 40, полісорбат 60, полісорбат 65, полісорбат 80, полісорбат 85, нонілфеноксиполіетоксетанол, октилфеноксиполіетоксетанол, октостеариол 40, ноноксинол- 9, триетаноламін, триетаноламін поліпептид олеат, поліоксіетилен- 660 гідроксистеарат, поліоксіетилен- 35 ріцинолеат, соєвий лецитин та полоксамер у кількості 25-500 мкг на 0.5 мл; та/або

15

h) 2-Феноксietанол 1-10 мг на 0.5 мл; та/або

е) вода для ін'єкцій (WFI) q.s.

20

за відсутності антигенної інтерференції ViPs-TT; OSP антигену з гептавалентними антигенами, для профілактики тифу і паратифів, викликаних *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* і гептавалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня для вироблення необхідної Т-залежної імунної відповіді проти *S. typhi* і *paratyphi*, включаючи у дітей у віці до 2 років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою всього однієї ін'єкції для складання повного графіка вакцинації.

25

Штами *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, що використовуються для розробки імуногенної композиції даного розкриття, можуть включати: штам *Salmonella enterica* серовар *typhi* TY2 з геном "tviB", специфічним для полісахариду Vi (ідентифікований компанією Geneoombio Technologies Private Limited, Пуна і виділений із зразка з підтвердженням черевним тифом у меморіальній лікарні Viloo Poonawalla, Пуна); *S. typhi*: ATCC 19430; C6524 (NICED, Калькутта, Індія); *S. paratyphi* A: ATCC 9150, одержаний від Chromachemie Laboratory Private Limited, Бангалор, CMCC50073, CMCC50973; *S. enteritidis*: ATCC 4931; ATCC 13076; *S. enteritidis* R11; *S. enteritidis* D24359; *S. enteritidis* 618; *S. enteritidis* 502; *S. enteritidis* IV3453219; *S. typhimurium*: *S. typhimurium* 2192; ATCC 14208; *S. typhimurium* 2189; *S. typhimurium* D23580; ATCC 19585; ATCC 700408; (LT2/SL134 (ST19)); *S. typhimurium* 177(ST19) CDC 6516-60; ATCC 700720. Додатково, будь-який аттенуйований штам серовара *Salmonella* (*S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. enteritidis* і *S. typhimurium*) може бути використаний з одержанням імуногенної композиції даного розкриття.

30

Salmonella enterica серовар *typhi* депонована в NCMR-NCCS; Пуна, міжнародний депозитарний орган, який надав їй реєстраційний номер MCC 0193; позначення штаму-PDL-1.

40

Інші розкриті в цій заявці втілення даного винаходу, також охоплюють набір вакцин, який містить перший контейнер, що містить ліофілізовану (висушену сублімацією) імуногенну композицію, і другий контейнер, що містить водний розчин, необов'язково сольовий або WFI (вода для ін'єкцій) для відновлення ліофілізованої (висушеною сублімацією) імуногенної вакцини.

45

Наведений вище опис конкретних втілень даного винаходу повністю розкриває загальний характер втілень, які інші можуть, застосовуючи сучасні знання, легко модифікувати та/або адаптувати для різних застосувань таких конкретних втілень, не відступаючи від загальної концепції, і, отже, такі адаптації та модифікації призначені для розуміння в межах значення та діапазону еквівалентів розкритих втілень даного винаходу. Слід розуміти, що фразеологія або термінологія, що використовується у цій заявці, призначена для опису, а не обмеження. Тому, хоча втілення даного винаходу описані в термінах кращих втілень, фахівці в даній галузі зрозуміють, що втілення даного винаходу можуть бути реалізовані зі змінами в рамках суті та обсягу втілень даного винаходу, описаних у цій заявці.

50

У всьому даному описі слово "містити" або його варіанти, такі як "містить" або "що містить", розуміється як включення зазначеного елемента, цілого числа або етапу, або групи елементів, цілих чисел або етапів, але не виключення будь-якого іншого елемента, цілого числа чи етапу, чи групи елементів, цілих чисел чи етапів.

55

Використання виразу "один або більше" або "принаймні один" передбачає використання одного або більше елементів або інгредієнтів або кількостей, як це може бути використане у втіленні даного винаходу для досягнення одного або більше бажаних об'єктів або результатів.

Будь-яке обговорення документів, законів, матеріалів, пристроїв, статей тощо, включених до даного опису, наводиться виключно з метою забезпечення контексту для розкриття. Це не повинно сприйматися як визнання того, що будь-яке або всі ці питання становлять частину рівня техніки або були загальновідомі в галузі, що стосується розкриття, як це існувало десь до дати пріоритету даної заявки.

Числові значення, наведені для різних фізичних параметрів, розмірів і величин, є лише приблизними, і передбачається, що значення, що перевищують числові значення, надані фізичним параметрам, розмірам і величинам, входять до обсягу даного винаходу, якщо у даній заявці не вказано інше.

Хоча в цій заявці значну увагу приділяють конкретним ознакам кращого втілення даного винаходу, слід розуміти, що можна додати множину додаткових ознак і внести множину змін у кращі втілення даного винаходу, не відступаючи від принципів розкриття. Ці та інші зміни у кращому втіленні даного винаходу будуть очевидні фахівцям у даній галузі техніки з наведеного у цій заявці розкриття, при цьому слід чітко розуміти, що наведений вище опис повинен інтерпретуватися тільки як ілюстрація розкриття, а не як обмеження.

ТЕХНІЧНІ ПЕРЕВАГИ:

1. Дане розкриття забезпечує моновалентну та полівалентну полісахаридно-білкову кон'юговану вакцину, що містить полісахарид, одержаний із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* у будь-якій їх комбінації, ефективну для забезпечення захисту або лікування інфекцій проти штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* або для запобігання, полегшення або затримки початку або прогресування їх клінічних проявів.

2. Покращений процес накопичення клітинної маси, виділення та очищення та кон'югації

3. Ферментаційне середовище для накопичення клітинної маси позбавлене казеїнового перевару/триптон, касамінових кислот.

4. Використання i) комбінації протипінного засобу, соєвого пептону та дріжджового екстракту; ii) конкретно DO 36-39 % та iii) осмоляльність 400-600 мОсмоль/кг, що призводить до покращення виходу полісахаридів на стадії збору на >50 %

5. Покращений метод очищення з низьким вмістом ендотоксину <10 ОЕ/мкг, низьким вмістом білка <1 % і низьким вмістом нуклеїнових кислот <2 %, де процес очищення i) позбавлений дезоксихолату натрію (DOC), що є продуктом тваринного походження, навіть його залишкова присутність у кінцевому продукті може призвести до неприйняття продукту регулюючими органами та деякими релігійними громадами; ii) позбавлений Тритону; X iii) позбавлений сульфату амонію; iv) позбавлений будь-яких адсорбентів (гідроксилапатиту, фосфату кальцію або апатиту)

6. Покращена ефективність кон'югації (> 60 %), покращений вихід кон'югату (≥50 %) та стабільність кон'югату, де i) співвідношення Ps:Pr: EDAC становить 1:1:2 ii) стабільність, що вказує, що вільний полісахарид становить < 5 % (краще < 3 %) і вільний білок становить < 5 % (краще < 4 %)

7. Покращена імуногенність кон'югату пояснюється тим, що i) *Vi* полісахарид - білковий кон'югат має особливий розмір від 1200 кДа до 1600 кДа. та ii) полісахарид, що використовується для кон'югації, має середню молекулярну масу від 150 до 300 кДа (краще від 150 до 250 кДа).

8. Імуногенна композиція стабільна при температурі 2-8 °C, 25 °C і 40 °C протягом шести місяців, вільний полісахарид через 6 місяців не більш ніж 7,5 % для полісахариду 180-220 кДа і вільний полісахарид через 6 місяців не більш ніж 10, 5 % для полісахариду 388/80/45 кДа.

9. Групи мишей, яким вводили бівалентну (тифозну та паратифозну) вакцину SIPL, такі як: а) SIPL *Vi* PS-TT+SIPL O-SP A DT; PS-TT+SIPL O-SP A CRM *Vi* TT продемонстрували більш ніж 4-кратне збільшення індукції IgG (порівняно з мишами, яким вводили некон'югований *Vi* PS або некон'югований SIPL O-SP A), що вказує на імуногенний потенціал бівалентної вакцини SIPL, містить комбінацію *Vi* TT і SIPL O-SP A (DT/TT/CRM).

10. Мінімальна кількість компонентів, що входять до складу вакцини.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади наведено для демонстрації кращих втілень даного винаходу. Фахівці в даній галузі техніки повинні зрозуміти, що композиції та способи, розкриті в наступних прикладах, є способами, виявленими винахідником, які добре функціонують у практиці даного винаходу, і, таким чином, можуть розглядатися як кращі режими його застосування. Однак,

фахівці в даній галузі повинні, у світлі даного розкриття, розуміти, що у конкретні розкриті втілення даного винаходу можуть бути внесені численні зміни і з одержанням аналогічного або подібного результату, не відходячи від суті та обсягу даного винаходу.

Приклад 1:

5 А) ШТАМИ:

Штами *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, що використовуються для розробки імуногенної композиції даного розкриття, можуть включати: штам *Salmonella enterica* серовар *typhi* TY2 з геном "tviB", специфічним для полісахариду Vi (ідентифікований компанією Geneombio Technologies Private Limited, Пуна і виділений із зразка з підтвердженням черевним тифом у Viloo Poonawalla Memorial Hospital, Пуна); *Salmonella enterica* серовар *typhi*, депонований у NCMR-NCCS, Пуна, міжнародний депозитарний орган, під номером доступу MCC 0193; позначення штаму - PDL-1, *S. typhi*: ATCC 19430; C6524 (NICED, Калькутта, Індія); *S. paratyphi* A: ATCC 9150 отримано від Chromachemie Laboratory Private Limited, Бангалор, CMCC50073, CMCC50973; *S. enteritidis*: ATCC 4931; ATCC 13076; *S. enteritidis* R11; *S. enteritidis* D24359; *S. enteritidis* 618; *S. enteritidis* 502; *S. enteritidis* IV3453219; *S. typhimurium*: *S. typhimurium* 2192; ATCC 14208; *S. typhimurium* 2189; *S. typhimurium* D23580; ATCC 19585; ATCC 700408; (LT2/SL134 (ST19)); *S. typhimurium* 177(ST19) CDC 6516-60; ATCC 700720. Додатково, будь-який аттенуований штам серовара *Salmonella* (*S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. enteritidis* і *S. typhimurium*) може бути використаний з одержанням імуногенної композиції даного розкриття.

WO2018037365, WO2019016654 і WO2020075184 включені з посиланням на одержання анатоксина дифтерії (DT), анатоксина правця (TT), інактивованого цілоклітинного кашлюку (wP), ацеллюлярного кашлюку, (aP), поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), антигену *Haemophilus influenzae* типу b та інактивованого поліовірусу (стандартна доза та зменшена доза поліовірусу).

WO2018037365 включено з посиланням на одержання інактивованого поліовірусу та інактивованого ротавірусу.

WO2013114268 включено з посиланням на одержання менінгококових полісахаридних антигенів серотипів A, C, W, X та Y.

30 В) Спосіб одержання полісахариду, одержаного із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, за допомогою процесу стаціонарного культивування с підкормкою включає наступні етапи: (ФЕРМЕНТАЦІЯ НАКОПИЧЕННЯ КЛІТИННОЇ МАСИ)

1) Інокуляція та збирання клітин на стадії S1:

35 0,5 мл культури з пробірки банку клітин розбавляють до 5 мл середовищем, наносять петльову культуру на SCDA-планшет та інкубують при $36 \pm 0,5$ °C протягом 28-32 год.

2) Інокуляція та збирання клітин на стадії S2:

10 лунок ізольованих колоній пластини стадії S1 інокують в конічну колбу, що містить 40 мл середовища. Інкубуйте колбу при $36 \pm 0,5$ °C та 150 ± 10 об./хв., доки оптична щільність (OD) культури не досягне діапазону від 2,5 до 3,5.

40 3) Інокуляція та збирання клітин на стадії S3:

Коли оптична щільність (OD) культури стадії S2 досягне діапазону від 2,5 до 3,5, збільшіть об'єм 40 мл культури до 800 мл і розподіліть 160 мл вмісту п'ять колб об'ємом 1 л. Інкубуйте колби при $36 \pm 0,5$ °C і 150 ± 10 об./хв., доки OD культури не досягне діапазону від 2,5 до 3,5.

4) Інокуляція та збирання клітин на стадії S4 (ферментер 20 л):

45 Коли OD культури стадії S3 досягне діапазону від 2,5 до 3,5, об'єднайте культуру з усіх п'яти колб у посівний сулій і інокулюйте в 20-літровий ферментер. Продовжуйте ферментацію, використовуючи такі параметри,

Параметри процесу ферментації:

Таблиця 1

Параметри процесу ферментації

Параметр	Номінал та діапазон
DO (%)	37 (від 30 до 90)
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Повітря (нл/хс)	2.0-10
Кисень (нл/хс)	від 0,0 до 15
pH	$7,0 \pm 0,4$
ТЕМП (°C)	$36,0 \pm 2,0$

50

Почніть подачу поживного середовища з 3-ї години та збільшуйте пропорційно OD. Продовжуйте ферментацію протягом 13-15 годин.

5) S4 Стадія формалінової інактивації:

Після завершення стадії S4 додайте формальдегідний розчин в ферментер до кінцевої концентрації 0,5-1,0 % і інкубуйте культуру при $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ протягом 8-10 годин.

6) Розділ клітин за допомогою центрифугування:

Після завершення етапу інактивації очистіть бульйон центрифугуванням та зберіть супернатант.

Проведіть центрифугування за допомогою наступних параметрів.

Таблиця 2

Параметри центрифугування

Параметр	Встановлене значення
Задане значення температури	2-8 °C
Об./хв	7000-8000
Час центрифугування	40-60 хв

7) Освітлення за допомогою глибинної фільтрації:

Після закінчення центрифугування надосадову рідину фільтрують за допомогою глибинного фільтра.

8) 0,2мкм фільтрування:

Після глибинної фільтрації фільтрат піддається фільтрації 0,2 мкм.

B1. Оптимізація середовища для вирощування *Salmonella typhi* S. paratyphi A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*.

Для оптимізації середовища і параметрів партії було проведено такі експерименти;

Експеримент №: 01 - Для експерименту було обрано середовище Франца, так як воно широко використовується для вирощування грамнегативних організмів та оцінювалося для вирощування *Salmonella Typhi*. Середовище Франца використовувалося для розвитку посівного матеріалу та ферментації. Як джерело вуглецю в живильному середовищі використовувалася глюкоза.

Таблиця 3

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту № 01

Матеріал	Кількість (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5

Таблиця 4

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 01

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625

Насіння було вирощене в одноразових колбах (125 мл та 500 мл) та інокульовано у 2-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася у режимі стаціонарного культивування з підкормкою (feed-batch). Корм додавали у ферментер для підтримки росту організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36°C , pH 7,00, 25 % розчиненого кисню (DO) та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 5

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 01

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	9,68
10	9,7
11	9,57
12	9,3
13	9,2
14	9,5

Висновок: Було встановлено, що середовище Франца підтримує вирощування мікроорганізму *Salmonella typhi* обмежено. Потрібна подальша оптимізація середовища.

Експеримент №: 02 - Дріжджовий екстракт був доданий у ферментаційне та живильне середовище для підтримки вирощування клітин.

Таблиця 6

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту № 02

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14

Таблиця 7

Компоненти поживного середовища для експерименту № 02

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50

Процедура:

Насіння було вирощене в одноразових колбах (125 мл та 500 мл) та інокульовано у 2-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. У ферментер додавали корм для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 °C, рН 7,00, 25 % розчиненого кисню (DO) та перемішуванні від 150 до 500 об./хв. (в каскадному режимі підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 8

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 02

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	9,68
10	9,7
11	10,1
12	10,6
13	11,2
14	11,8

Висновки: Було виявлено, що додавання екстракту дріжджів підтримує ріст організму *Salmonella typhi* обмежено. Потрібна подальша оптимізація середовища.

Експеримент №: 03 - Соєвий пептон був доданий у ферментаційне та живильне середовище для підтримки росту клітин.

Таблиця 9

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту №03

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соєвий пептон	9

Таблиця 10

Компоненти поживного середовища для експерименту № 03

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соєвий пептон	50

Процедура:

Насіння було вирощене в одноразових колбах (125 мл та 500 мл) та інокульовано у 2-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 °C, pH 7,00, 25 % розчиненого кисню (DO) та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 11

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 03

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	9,68
10	9,8
11	10,5
12	11,8
13	12,6
14	13,2

Висновки: Виявлено, що додавання соєвого пептону підтримує ріст організму *Salmonella typhi*. Потрібна оптимізація параметрів партії для виробництва.

Експеримент №: 04-Протипінний засіб Ctope був замінений протипінним засобом Struktol для покращення росту клітин.

Таблиця 12

Компоненти середовища ферментації для експерименту №: 04

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соєвий пептон	9

Таблиця 13

Компоненти поживного середовища для експерименту № 04

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соєвий пептон	50

Процедура:

Насіння було вирощене в одноразових колбах (125 мл та 500 мл) та інокульовано у 2-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 °C, pH 7,00, 25 % розчиненого кисню (DO) та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 14

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 04

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,0
1	0,12
2	0,295
3	0,49
4	1,43
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	10,6
9	11,4
10	12,9
11	13,2
12	13,8
13	14,4
14	15,2

Висновки: Було встановлено, що заміна протипепного засобу на Протипінний засіб Структол покращує ріст організму *Salmonella typhi*.

- 5 Експеримент №: 05 - Була вивчена модель вирощування *Salmonella typhi* за наступних параметрів ферментації в партії об'ємом 20 літрів. Для партій *Salmonella typhi* було визначено відповідні параметри. Розчинений кисень і осмоляльність контролювалися у межах експериментальних заданих значеннях.

Таблиця 15

Експериментальні значення для експерименту №: 05

Параметри	Експериментальні задані значення
pH	7,0
Температура (°C)	36
Розчинений кисень (%)	30
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Осмоляльність (мОсмоль/кг)	300

Таблиця 16

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту № 05

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соевий пептон	9

10

Таблиця 17

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 05

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94

Таблиця 17

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 05

Матеріал	Кількість. (г/л)
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соєвий пептон	50

- Процедура: Посівний матеріал був розміщений в одноразових колбах (250 мл та 1 л) та інокульований у 20-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*.
 5 Партію одержували при температурі 36 °С, рН 7,00 та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі для підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 18

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 05

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,20
1	0,45
2	0,96
3	1,87
4	3,2
5	4,33
6	8,73
7	9,24
8	9,7
9	11,2
10	14,1
11	16,2
12	17,3
13	17,9
14	18,5

10

Висновок: Зі спостережень був зроблений висновок, що для вирощування організму *Salmonella typhi* необхідна оптимізація параметрів, зазначених у таблиці експериментальних установок даного експерименту.

- Експеримент №: 06 - Була вивчена модель вирощування *Salmonella typhi* за наступних параметрів ферментації в партії об'ємом 20 літрів. Для партій *Salmonella typhi* було визначено відповідні параметри. Розчинений кисень і осмоляльність контролювалися у межах експериментальних заданих значень.

15

Таблиця 19

Експериментальні уставки для експерименту № 06

Параметри	Експериментальні задані значення
рН	7,0
Температура (°C)	36
Розчинений кисень (%)	40
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Осмоляльність (мОсмоль/кг)	400

20

Таблиця 20

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту № 06

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соєвий пептон	9

Таблиця 21

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 06

Матеріал	Кількість, (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соєвий пептон	50

Процедура: Посівний матеріал був поширений в одноразових колбах (250 мл та 1 л) та інокульований у 20-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавали в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 ° C, рН 7,00 та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі для підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 22

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 06

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,20
1	0,45
2	0,96
3	1,87
4	3,2
5	4,33
6	8,73
7	11,8
8	15,2
9	17,8
10	19,5
11	20,5
12	21,1
13	21,9
14	22,8

Висновок: Зі спостережень був зроблений висновок, що для вирощування організму *Salmonella typhi* необхідна оптимізація параметрів, зазначених у таблиці експериментальних установок даного експерименту.

Експеримент №: 07 - Була вивчена модель вирощування *Salmonella typhi* за наступних параметрів ферментації в партії об'ємом 20 літрів. Для партій *Salmonella typhi* було визначено

відповідні параметри. Розчинений кисень і осмоляльність контролювалися у межах експериментальних заданих значень.

Таблиця 23

Експериментальні установки для експерименту № 07

Параметри	Експериментальні задані значення
pH	7,0
Температура (°C)	36
Розчинений кисень (%)	37
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Осмоляльність (мОсмоль/кг)	700

Таблиця 24

Компоненти середовища ферментації для експерименту №: 07

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соевий пептон	9

5

Таблиця 25

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 07

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соевий пептон	50

10

Процедура: Посівний матеріал був поширений в одноразових колбах (250 мл та 1 л) та інокульований у 20-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 °C, pH 7,00 та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі для підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 26

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 07

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,21
1	0,49
2	0,29
3	1,43
4	2,81
5	4,73
6	7,1
7	9,2

Таблиця 26

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 07

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
8	12,4
9	16,1
10	19,2
11	23,4
12	26,3
13	28,2
14	28,4

Висновок: Зі спостережень був зроблений висновок, що для вирощування організму *Salmonella typhi* необхідна оптимізація параметрів, зазначених у таблиці експериментальних установок даного експерименту.

- 5 Експеримент №: 08 - Була вивчена модель вирощування *Salmonella typhi* за наступних параметрів ферментації в партії об'ємом 20 літрів. Для партій *Salmonella typhi* було визначено відповідні параметри. Розчинений кисень і осмоляльність контролювалися у межах експериментальних заданих значень.

Таблиця 27

Експериментальні уставки для експерименту № 08

Параметри	Експериментальні задані значення
pH	7,0
Температура (°C)	36
Розчинений кисень (%)	40
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Осмоляльність (мОсмоль/кг)	700

10

Таблиця 28

Компоненти середовища ферментації для експерименту №: 08

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соевий пептон	9

Таблиця 29

Компоненти поживного середовища для експерименту № 08

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соевий пептон	50

Процедура: Посівний матеріал був розміщений в одноразових колбах (250 мл та 1 л) та інокульований у 20-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*.

15

Партію одержували при температурі 36 ° C, рН 7,00 та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі для підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

5

Таблиця 30

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 08

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,20
1	0,66
2	1,62
3	3,2
4	5,3
5	8,1
6	11,2
7	16,3
8	19,2
9	23,8
10	27,4
11	28,8
12	30,1
13	31,2
14	32,4

Висновок: Зі спостережень був зроблений висновок, що для вирощування організму *Salmonella typhi* необхідна оптимізація параметрів, зазначених у таблиці експериментальних установок даного експерименту.

10

Експеримент №: 09 - Була вивчена модель вирощування *Salmonella typhi* за наступних параметрів ферментації в партії об'ємом 20 літрів. Для партій *Salmonella typhi* було визначено відповідні параметри. Розчинений кисень та осмоляльність контролювалися в межах експериментальних заданих значень.

Таблиця 31

Експериментальні установки для експерименту № 09

Параметри	Експериментальні задані значення
рН	7,0
Температура (° C)	36
Розчинений кисень (%)	40
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Осмоляльність (мОсмоль/кг)	500

15

Таблиця 32

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту № 09

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соєвий пептон	9

Таблиця 33

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 09

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соєвий пептон	50

Процедура: Посівний матеріал був розміщений в одноразових колбах (250 мл та 1 л) та інокульований у 20-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 °C, pH 7,00 та перемішуванні зі швидкістю 150-500 об./хв. (в каскадному режимі підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 34

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 09

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,22
1	0,65
2	2,14
3	4,2
4	6,5
5	11,3
6	14,2
7	18,6
8	26,5
9	29,4
10	32,3
11	36,2
12	37,2
13	38,1
14	38,5

Висновок: Зі спостережень був зроблений висновок, що для вирощування організму *Salmonella typhi* необхідна оптимізація параметрів, зазначених у таблиці експериментальних установок даного експерименту.

Експеримент №: 10-Була вивчена модель вирощування *Salmonella typhi* за наступних параметрів ферментації в партії об'ємом 20 літрів. Для партій *Salmonella typhi* було визначено відповідні параметри. Розчинений кисень і осмоляльність контролювалися у межах експериментальних заданих значень.

Таблиця 35

Експериментальні установки для експерименту № 10

Параметри	Експериментальні задані значення
pH	7,0
Температура (°C)	36
Розчинений кисень (%)	37
Перемішування (об./хв.)	150 до 500
Осмоляльність (мОсмоль/кг)	500

Таблиця 36

Компоненти ферментаційного середовища для експерименту № 10

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	4
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	4,1
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	18,8
Сульфат магнію гептагідрат	2,5
Дріжджовий екстракт	14
Соевий пептон	9

Таблиця 37

Компоненти поживного середовища для експерименту №: 10

Матеріал	Кількість. (г/л)
D - моногідрат глюкози	100
Натрію дигідрогенофосфат моногідрат	1,025
Натрію гідрогенофосфат гептагідрат	0,94
Сульфат магнію гептагідрат	0,625
Дріжджовий екстракт	50
Соевий пептон	50

- 5 Процедура: Посівний матеріал був розміщений в одноразових колбах (250 мл та 1 л) та інокульований у 20-літровий ферментер. Після інокуляції ферментація проводилася як feed-batch. Корм додавався в ферментер для підтримки вирощування організму *Salmonella Typhi*. Партію одержували при температурі 36 °C, pH 7,00 та перемішуванні 150-500 об./хв. (в каскадному режимі для підтримки DO). Протипінний засіб періодично додавали для контролю
- 10 піноутворення під час ферментації.

Спостереження:

Таблиця 38

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 10

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
0	0,21
1	0,87
2	2,75
3	5,3
4	8,30
5	14,12
6	18,5
7	24,6
8	30
9	33,3

Таблиця 38

Значення OD₅₉₀ в експерименті № 10

Вік культури (годин)	OD ₅₉₀
10	38,6
11	42,4
12	43,1
13	43,7
14	44

Висновок:

Таблиця 39

USP-Кількість зібраних клітин (у відсотках або інших одиницях вимірювання), одержаний для кожного з експериментів з 1 по 10

№	Опис	Кількість зібраних клітин (мг/л)
1	Експеримент-1	142 мг/л
2	Експеримент-2	180 мг/л
3	Експеримент-3	210 мг/л
4	Експеримент-4	452 мг/л
5	Експеримент-5	463 мг/л
6	Експеримент-6	480 мг/л
7	Експеримент-7	492 мг/л
8	Експеримент-8	510 мг/л
9	Експеримент-9	537 мг/л
10	Експеримент-10	600 мг/л

- 5 Режим культивування fed-batch з одержанням великої кількості полісахариду, одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, де feed-batch процес включає використання комбінації протипінного агента J673 STRUKTOL, соєвого пептону Difco™ Select Phytone™ UF в діапазоні від 40 до 70 г/л і дріжджового екстракту Difco™ Yeast Extract, діапазоні від 40 до 70 г/л під час культивування призводить до вдосконаленого виходу (100-700 мг/л), а параметри ферментації включають pH, що підтримується в діапазоні від 6,7-7,1, температура підтримується в діапазоні 34,0-38,0 °C, рівень розчиненого кисню підтримується в діапазоні 36-39 %, швидкість перемішування (об./хв.) підтримується в діапазоні 150-500 та осмоляльність становить 400-600 мОсмоль/кг.

Приклад 2

- 15 С) Спосіб очищення полісахариду, одержаного із штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis* (ПОДАЛЬШЕ ОЧИЩЕННЯ).

С1) кількість клітин, одержаних в результаті ферментації ViPs, піддається наступним етапам подальшого очищення з одержанням Vi-полісахариду (ViPs) бажаної якості:

- 20 а) освітлення клітин бактеріального капсульного полісахариду за допомогою прямої фільтрації (DFF) через щонайменше одну мембрану з розміром пор приблизно 0,2 мкм;
 б) концентрація за допомогою тангенціальної проточної ультрафільтрації (TFF) та заміна буфера (20 мМ Трис буфер pH-7,5, що містить 5 мМ EDTA) за допомогою діалізації (DF) з використанням мембрани з відсіканням молекулярної маси 100 кДа (MWCO);
 25 с) обробка SDS (20 % від вихідного об'єму), етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA) (від 4 до 10 мМ) та ацетатом натрію (від 5 % до 10 %) для денатурації білків, нуклеїнових кислот та ліпополісахариду;
 д) осадження етанолом (від 40 % до 70 %);
 е) центрифугування та фільтрація методом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлювальний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм;
 30 ф) обробка 2М хлоридом калію (KCl) для видалення надлишку детергенту з подальшим центрифугуванням і фільтрацією методом прямої фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлюючий фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм;

g) концентрування за допомогою тангенціальної проточної фільтрації (TFF) та обмін буфера за допомогою діалізації (DF) з використанням мембрани з відсіканням молекулярної маси 30 кДа (MWCO);

5 h) селективне осадження PS за допомогою СТАВ (введення вихідного розчину 12 % СТАВ);
i) центрифугування та фільтрація методом прямої проточної фільтрації (DFF) через щонайменше один освітлювальний фільтр з розміром пор від приблизно 0,45 мікрметра до приблизно 0,2 мікрметра;

j) видалення домішок білків та нуклеїнових кислот шляхом промивання гранул 60 % етанолом (від 50 % до 70 %) у присутності 1M NaCl (від 0,1M до 2M);

10 k) селективне осадження полісахаридів шляхом використання 60 % етанолу (< 75 % OR>95 %);

l) розчинення полісахариду в WFI або 1M NaCl і концентрація за допомогою тангенціальної проточної фільтрації (TFF) і заміни буфера шляхом діалізації (DF) з використанням мембрани, що має відсікання молекулярної маси 30 кДа (MWCO); i

15 m) стерильна фільтрація через щонайменше один стерильний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм в стерильних умовах та зберігання при $\leq -20^{\circ}\text{C}$

C2) O-специфічний полісахарид (OSP) *Salmonella paratyphi* ферментаційних клітин ліпополісахариду (LPS) піддавали наступним етапам подальшого очищення з одержанням бажаної якості O-специфічного полісахариду з ліпополісахариду (LPS) *Salmonella paratyphi* A

20 a) центрифугування при 7 000 об./хв. протягом 30 хв при 4°C , збір клітинних гранул (~1 кг) і супернатанту, гранули клітини суспендували в 15 л 1M NaCl і перемішували протягом 1 год. при кімнатній температурі.

b) концентрування методом тангенціальної проточної ультрафільтрації (TFF) та обмін буфера шляхом діалізації (DF) з використанням касети Prostat 0,45 мкм та мембрани з відсіканням молекулярної маси 30 кДа (MWCO);

c) кислотний гідроліз ЛПС за допомогою 1 % оцтової кислоти (pH~2,8-3,0) за температури 90°C протягом 180 хв.

d) суміш охолоджували до кімнатної температури (RT) і видаляли домішки осадженням центрифугуванням при 7 000 об./хв. протягом 45 хв при 25°C .

30 e) нейтралізація збирали супернатант у скляний флакон та нейтралізували до pH-7,0 за допомогою розчину амоніаку

f) освітлення шляхом прямої проточної фільтрації (DFF) через щонайменше одну мембрану з розміром пор від 0,45 до 0,2 мікрметрів;

35 g) Додавали вихідний розчин дезоксихолату натрію для одержання кінцевої концентрації 1 % та інкубували протягом 30 хвилин при перемішуванні при температурі 30°C , доводили pH до 2,0 за допомогою оцтової кислоти та інкубували протягом 15 хвилин при перемішуванні при 30°C ;

h) центрифугування при 7 000 об./хв. протягом 45 хв при 25°C ;

40 i) прямоточна фільтрація (DFF) через щонайменше одну мембрану, що має розмір пор від 0,45 до 0,2 мікрметрів;

j) концентрування методом ультрафільтрації з тангенціальним потоком (TFF) та обмін буфера за допомогою діалізації (DF) з використанням мембрани з відсіканням молекулярної маси (MWCO) 10 кДа;

45 k) стерильна фільтрація через щонайменше один стерильний фільтр з розміром пор приблизно 0,2 мкм в стерильних умовах з одержанням очищеного O-специфічного полісахариду (OSP).

Таблиця 40

Аналітичні способи, що використовуються для тестування на різних етапах

№	Тест	Метод випробування	Одиниці	Посилання	Критерії прийнятності
1	Вміст Vi полісахаридів	HPAEC-PAD	мг/мл	WHO TRS 987	Фактичне значення
2	Ідентичність	ЯМР-спектроскопія	NA	NA	Підтвердження ідентичності/сумісність з NIBSC Vi полісахаридним стандартом

Аналітичні способи, що використовуються для тестування на різних етапах

№	Тест	Метод випробування	Одиниці	Посилання	Критерії прийнятності
3	Білкові домішки	Метод Лоурі	мг/г	IP/BP/Ph OEr 0250/WHO Для внутрішнього використання	Має містити менш ніж 10,0 мг білка на грам PS
4	Домішки нуклеїнових кислот	УФ-спектроскопія (абсорбція при 260 нм)	мг/г	IP/BP/Ph OEr 0250/WHO Для внутрішнього використання	Має містити менш ніж 20 мг нуклеїнової кислоти на грам PS
5	Вміст ацетилю О (ліофілізований)	Метод Хестріна	ммоль/г	IP/BP/Ph OEr 0250/WHO Для внутрішнього використання	Має бути $\geq 2,0$ ммоль/г полісахариду
6	Вміст вологи	Термогравіметрія	Відсоток (%)	IP/BP/EP/WHO Для внутрішнього використання	Фактичне значення
7	Розподіл молекулярних розмірів	SEC-BEPX	Відсоток (%)	IP/BP/EP/WHO Для внутрішнього використання	Принаймні 50 % полісахариду має бути елюйовано до досягнення KD 0,3
8	Вміст ендотоксинів	Кінетичний турбідометричний аналіз з використанням Limulus ameobolysate (LAL)	ОЕ/мкг	IP/BP/Ph OEr 0250/WHO Для внутрішнього використання	Менш ніж 100 ОЕ ендотоксину на мкг PS
9	pH	Потенціометричний	Значення	-	Фактичне значення
10	Біонавантаження	-	КУО/мл	IP/BP/WHO Для внутрішнього використання	100 КУО/10 мл PS
11	Загальний вміст PS	HPAEC-PAD	мг/мл	WHO TRS 987	Фактичне значення
12	Середня молекулярна маса (AMW)	SE-BEPX	кДа	WHO TRS 987	Фактичне значення
13	Ідентичність	ЯМР	NA	Для внутрішнього використання	Порівняно з опублікованими даними/NIBSC STD
14	Бактеріальна та мікотична стерильність	Придатна	NA	WHO TRS 987	Повинні відповідати
15	Міцність Vi	HPAEC-PAD	мкг/мл	WHO TRS 987	25 мкг/0,5 мл
16	Вільний полісахарид	HPAEC-PAD-DOC	Відсоток (%)	WHO TRS 987Для внутрішнього використання	< 40 %
17	О-ацетилювання	Хестрін	ммоль/г	WHO TRS 987Для внутрішнього використання	> 2,0 ммоль/г Vi

Таблиця 40

Аналітичні способи, що використовуються для тестування на різних етапах

№	Тест	Метод випробування	Одиниці	Посилання	Критерії прийнятності
18	Розподіл за розмірами молекул (MSD)	SE-BEPX	Відсоток (%)	WHO TRS 987Для внутрішнього використання	Для інформації (але більш ніж, ніж Vi) K _D для прийняття рішення
19	Вміст ендотоксинів або пірогенів	Кінетичний турбідометричний аналіз з використанням Limulus amoebolysate (LAL) та тваринний тест	ОЕ/мкг	WHO TRS 987	<100 ОЕ/доза Узгоджено NRA
20	Вміст ад'юванту та ступінь адсорбції	Придатний	мг/мл	WHO TRS 987	Фактичне значення
21	Вміст консервантів	Інструмент/Відповідний метод	мг/мл	WHO TRS 987Для внутрішнього використання	Має відповідати
22	Загальна безпека (нешкідливість)	Тваринний тест	NA	WHO TRS 987Для внутрішнього використання	Узгоджено NRA
23	pH	Потенціометричний	Значення	Для внутрішнього використання	6,0-8,0
24	Осмоляльність	Осмометр	мОсмоль/кг	WHO TRS 987Для внутрішнього використання	Узгоджено NRA

Результати та інтерпретація:

Таблиця 41

Очищений полісахарид Vi, протестований IPQC (поточний контроль якості)

ТЕСТ	СПЕЦИФІКАЦІЯ	Партія 1	Партія 2	Партія 3
Концентрація полісахаридів	Фактичне значення (мг/мл)	3,762	3,52	3,306
Перевірка ідентичності методом ЯМР	Має відповідати	Відповідає	Відповідає	Відповідає
Вміст О-ацетилу	Не менш ніж 2,0 ммоль/г полісахариду	2,395	2,943	3,336
Білкові домішки	Не більш ніж 1 % за масою PS	0,797	0,568	0,907
Домішки нуклеїнових кислот	Не більш ніж 2 % за масою PS	0,984	1,136	1,180
Вміст ендотоксинів	Не більш ніж 150 ОЕ ендотоксину на мкг PS	16,39	52,37	45,33
Розподіл за розмірами молекул (MSD)	Не менш ніж 50 % PS елююється до досягнення коефіцієнта розподілу (K _D) 0,25.	93,38	94,35	94,47
Вільний формальдегід (Залишок)	Не більш ніж 0,02 % мас./об.	0,00	0,00	0,00
Залишковий етанол	Не більш ніж 5 000 ppm.	Не виявлено	Не виявлено	Не виявлено
Біонавантаження	NMT 100 КУО/10мл PS	0 КУО/10мл PS	0 КУО/10мл PS	0 КУО/10мл PS

Удосконалений метод очищення Vi PS має явні переваги як з погляду легкості експлуатації, так і інші переваги, такі як:

- Покращене очищення полісахаридів (з точки зору вилучення, О-ацетилу, ендотоксину, білка, вмісту нуклеїнових кислот, полідисперсності, в'язкості) при використанні ацетату натрію (6 %) порівняно з ацетатом натрію (2 %)

При використанні ацетату натрію (6 %) - значення для

DSP % вилучення-50 %

Ps В'язкість - дані відсутні

Ps Полідисперсність - дані відсутні

О-ацетил - 2,9 ммоль/гм PS

При використанні ацетату натрію (2 %) - значення для

DSP % вилучення-40 %

Ps В'язкість - дані відсутні

Ps Полідисперсність - дані відсутні

О-ацетил - 2,6 ммоль/гм PS

Ацетат натрію реагує з нуклеїновими кислотами. Він розкладається на Na^+ та $(\text{CH}_3\text{COO})^-$. Позитивно заряджений іон натрію нейтралізує негативно заряджений PO_3 -нуклеїнових кислот, що сприяє осадженню нуклеїнових кислот. Тому вища концентрація, тобто 6 % ацетату натрію, ефективно осаджує домішки клітин-хазяїв, таких як нуклеїнові кислоти.

- Покращене очищення полісахаридів (з точки зору вилучення, вмісту О-ацетилу, ендотоксину, білка, нуклеїнових кислот, полідисперсності, в'язкості) СТАВ (3 %) порівняно зі СТАВ (0,5, 1 %). СТАВ являє собою катіонна четвертинна поверхнево-активна речовина на основі амінів. Вона взаємодіє з аніонними полісахаридами (іонна взаємодія) і знижує їх розчинність, тому осаджує полісахариди з розчину. Таким чином, більш висока концентрація СТАВ (2 %) завжди осаджує більшу кількість полісахариду, що дає більш високий вихід, а видалення білкових домішок є додатковою перевагою.

- Покращене очищення полісахаридів (з точки зору вилучення, вмісту О-ацетилу, ендотоксину, білка, нуклеїнових кислот, полідисперсності, в'язкості) для поточного процесу без DOC та процесу на основі DOC.

Перевага удосконаленого способу без процесу DOC

1. Нормативне питання: DOC є компонентом тваринного походження та не відповідає вимогам HALAL. Він виробляється і поставляється одним постачальником по всьому світу, у той час як SDS - синтетичний детергент, сертифікований за стандартом HALAL і має декілька постачальників по всьому світу.

2. Функціональне питання: DOC руйнує ендотоксини, не впливаючи на хімічний склад, і після видалення детергенту може відновити свою біологічну активність, тоді як SDS завдяки своїй амфіпатичній природі та вищому числу агрегації денатурує і добре солубілізує білки, а також необоротно руйнує мономерні блоки.

- Розроблено новий покращений метод очищення Vi PS без використання дезоксихолату натрію (DOC), який є компонентом тваринного походження або фенолу. Покращений метод заснований на зворотному очищенні полісахаридів, при якій домішки клітини-хазяїна, такі як білки, нуклеїнові кислоти та ліпо-полісахариди, видаляються на початкових етапах за допомогою ацетату натрію (6 %), додецилсульфату натрію (2 %) та етанолу (4), концентрування та діалізації з використанням мембран з відсіченням 30 кДа на різних етапах, потім полісахарид осаджується катіонним детергентом СТАВ і виконуються етапи освітлюючого очищення для досягнення більш високого виходу очищеного полісахариду Vi, що відповідає специфікаціям WHO (BOO3).

- Процес очищення призводить до значного вилучення від 40 до 65 % з бажаними рівнями О-ацетилу (більш ніж 2,0 ммоль/г полісахариду), вихід очищеного полісахариду Vi знаходиться в діапазоні від 400 до 4000 мг/л, середня молекулярна маса знаходиться в діапазоні від 40 до 400 кДа, містить менш ніж 1 % білків/пептидів, менш ніж 2 % нуклеїнових кислот, менш ніж 100 ОЕ ендотоксинів на мкг полісахариду (PS), молекулярний розподіл за розмірами (більш ніж 50 % PS елюється до досягнення коефіцієнта розподілу (KD) 0,25).

- Процес очищення О-специфічного полісахариду (OSP) призводить до значного зниження вмісту ендотоксину ($< 100\text{ОЕ}$ ендотоксину на мкг PS), білка ($< 1\%$) і нуклеїнових кислот ($< 2\%$), вищому вилученню капсульного полісахариду, краще в діапазоні % до 65 %, з бажаними рівнями О-ацетилу ($> 2,0$ ммоль/г полісахариду), молекулярний розподіл за розмірами ($> 50\%$ PS елюється до досягнення коефіцієнта розподілу (KD) 0,25) та середня молекулярна маса очищеного О-специфічного полісахариду (OSP) знаходилася в діапазоні від 40 до 200 кДа.

Приклад 3:

D) Спосіб кон'югації полісахариду, одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhi*; *S. paratyphi* A; *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, з білком-носієм.

Білок-носії, що використовується для кон'югації з полісахаридом *Salmonella typhi* Vi, є правцевим анатоксином. Полісахариди, отримані з *S. paratyphi* A, *S. typhimurium* та *S. enteritidis*, індивідуально кон'юговані з білком-носієм, вибраним з правцевого анатоксина (TT), дифтерійного анатоксина (DT) або CRM197.

Відповідно до даного розкриття CRM197 одержують з рекомбінантного штаму CS463-003 (MB101) *Pseudomonas fluorescens* від Pfenex USA.

Відповідно до даного розкриття, TT одержують з *Clostridium Tetani* (Гарвардський № 49205), одержаного з Центрального науково-дослідного інституту (CRI), Національного контрольного управління, Касаулі, Хімачал-Прадеш, Індія. Центральний дослідницький інститут (CRI) придбав даний штам у NVI, Нідерланди.

Відповідно до даного розкриття, DT виробляється з культур штаму *Corynebacterium diphtheriae* Park-Williams, штам номер 8, одержаний з Центрального дослідницького інституту (CRI), Національного контрольного управління, Касаулі, Хімачал-Прадеш, Індія. Центральний дослідницький інститут (CRI) придбав даний штам у Wellcome Research Laboratories.

D1) Одержання моновалентного кон'югату *Salmonella typhi* з використанням хімії карбодііміду:

Етап 1: Концентрування та дериватизація TT

Процедура:

а) GFC очищений TT (вміст мономерів більш ніж 90 %) концентрували за допомогою мембрани 10 кДа для досягнення концентрації білка NLT 12 мг/мл (аналіз Лоурі).

б) Коефіцієнт дериватизації використовували, як зазначено нижче, відповідно розраховували необхідні кількості.

Pr:ADH:EDC як 1:6,0:1

Дериватизаційна шкала: 13 гм

с) Концентрований TT (у 0,9 % NaCl), 1M MES pH 6,0, розчин ADH (розчинений у 0,1M MES pH 6,0) і розчин EDC (розчинений у 0,1M MES pH 6,0) додавали послідовно і доводили до необхідного об'єму додаванням 0,1M буфера MES pH 6,0. Кінцева концентрація Pr реакції становила ~4,5 мг/мл.

д) Реакційну суміш перемішували та витримували приблизно 1 години при pH 5,90. Потім реакцію дериватизації гасили, регулюючи pH вище 7,5 за допомогою 0,1 M фосфатного буфера, що містить EDTA, pH 8,0.

е) Нейтралізовану реакційну суміш фільтрували за допомогою мембрани з відсіченням 10кДа проти 10мМ фосфатного буфера при 22 об'ємі, потім 0,1M MES буфером pH 6,0 в об'ємі не менш ніж 12 об'ємі для видалення сполук, що не прореагували, та інших залишків.

ф) Дериватизований зразок аналізували на загальну концентрацію Pr методом аналізу Лоурі та ступінь дериватизації методом колориметричного аналізу (TNBS).

Результати:

Концентрація дериватизованого Pr. за методом Лоурі: 15 мг/мл

Ступінь дериватизації (DOA): 19

Відсоток вилучення: ~75 %

Етап 2: Кон'югація Vi Ps до дериватизації TT

Процедура:

Кон'югація Vi PS-дериватизованого TT, виконана з використанням хімії карбодііміду.

Для кон'югації використовувалися наступні параметри PS та Pr.

а. Для реакції кон'югації використовувалося співвідношення Ps:Pr:EDC:1:0.9:1.75 (+ 0,5 для Pr та EDC) Масштаб кон'югації 10гм.

б. Необхідний об'єм партії PS додавали в попередньо простерилізований скляний флакон.

с. 1M MES буфер pH 6,0 (буферний розчин) був доданий у вимірний об'єм PS для досягнення концентрації 0,1M MES.

д. Суміш перемішували при ~100 об./хв. для однорідного змішування.

е. Потім відмірений об'єм дериватизованого TT додавали у флакон, що містив Ps.

ф. Після додавання TT у вищезазначену реакційну суміш додавали свіжоодержаний EDC (розчинений в 0,1M MES буфері pH 6,0).

г. pH спостерігали та реєстрували (pH 6,0+0,5)

h. Зразок аналізували через різні проміжки часу за допомогою SE-BEPX. Контролювали відсоток перетворення кон'югату та витрата білка.

i. Реакцію гасили через 1,45 годин шляхом підвищення рН до 7,5 за допомогою 0,1М фосфатного буфера, що містить EDTA, коли витратилося <90 % білка.

j. Нейтралізовану реакційну суміш зберігали при температурі 2-8 °C до подальшого використання.

5 Етап 3: Очищення нейтралізованого кон'югату Vi-TT

Очищення нейтралізованого кон'югату проводили двома методами для видалення Ps, що непрореагував, Pr, що непрореагував, інших залишків з використанням наступних параметрів;

1. Метод ультрафільтрації:

Наступні параметри, що використовуються для діалізації;

10 Масштаб діалізації: 8,5 гм

Ps конц. під час D/F: ~2мг/мл

Мембранне відсічення: 300 кДа

Марка мембрани: Pall

Площа мембрани: 2,5 м²

15 Використовуваний буфер А: 10 мМ PBS не менш ніж 25 об'ємів

Використовуваний буфер В: 0,9 % NaCl 30 об'ємів.

Кінцевий об'єм: 6,5 лт

Очищений кон'югат фільтрували за допомогою фільтра 0,2 мкм.

2. Гель-фільтраційна хроматографія:

20 Нейтралізований кон'югат приблизно 1,5 г був сконцентрований на 0,1 м² 300 кДа відсікаючої мембрани ~ 2-4 мг/мл. Очищення кон'югату проводилося для видалення незв'язаного PS, незв'язаного TT та залишкового EDC за допомогою гель-фільтраційної хроматографії.

Два окремі цикли GFC були виконані з однаковими параметрами очищення.

25 Наступні хроматографічні умови були використані для очищення.

Таблиця 42

Хроматографічні умови, що використовуються для очищення кон'югатів

№	Параметри	Деталі
1	Використовувана хроматографія	Гель-хроматографія
2	Використовувана колонка	Серія BPG
3	Іонообмінна смола, що використовується	Toyopearl 'HW'65F
4	Елюючий буфер	0,17M NaCl
5	Робоча лінійна швидкість потоку	30 см/год.
6	Робоча об'ємна швидкість потоку	40 мл/хв
7	Завантаження зразків	3,5 % від загального об'єму ліжка
8	Відбір фракцій	1 хв

1 Усього було зібрано 27 фракцій (по 100 мл), які були проаналізовані за допомогою SE-
VERX та об'єднані разом на основі хроматографічного профілю.

30 2 Фракції аналізували на вміст Ps методом HPAD, вміст Pr методом Лоури, % вільного Ps методом DOC-HPAD.

3 За результатами аналізу фракції були об'єднані (з 1 по 23) та відфільтровані з використанням фільтра 0,22 мкм.

35 4 Зразок був проаналізований на вміст Ps, вміст Pr та аналіз вільного Ps, а також на ендотоксин, вміст О-ацетилю, стерильність, значення рН та аналіз на ендотоксин.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ:

Таблиця 43

Оцінка IPQC кон'югату Vi-TT, очищеного за допомогою ультрафільтрації та GFC

Тест	Кон'югат Vi-TT, очищений методом ультрафільтрації	Кон'югат Vi-TT очищений GFC
Вміст Ps	1,43 мг/мл	1,36 мг/мл
Вміст Pr	1,04 мг/мл	1,20 мг/мл
Співвідношення PS/Pr	1,37	1,13
Вилучення %	60	52

Оцінка IPQC кон'югату Vi-TT, очищеного за допомогою ультрафільтрації та GFC

Тест	Кон'югат Vi-TT, очищений методом ультрафільтрації	Кон'югат Vi-TT очищений GFC
pH	6,67	5,63
Ендотоксин	0,35OE/мкг 505,89OE/мл	0,46 OE/мкг 619,61OE/мл

Порівняльні дані процесу кон'югації - Покращена ефективність кон'югації, покращений вихід кон'югату та стабільність (вільний Ps, вільний Pr) SIPL тифоїдного кон'югату, де Ps:Pr: EDAC співвідношення становить 1:1:2 порівняно з іншими Ps:Pr: EDAC

5 Покращена ефективність кон'югації: Відсоток конверсії кон'югації становить понад 90 %.

Покращений вихід кон'югатів: Очищення проводилося різними способами, тобто. методом ультрафільтрації та методом гель-хроматографії зі змінною шкалою очищення кон'югату, та вилучення становило від 40 до 87 %.

10 Використовували співвідношення 1:1:2 порівняно із: 1,5:1,2, 1:0,9:2, 1:0,9:1,75, 1:0,8:1,8:, 1:0,7:1,8, 1:0,9:0,6, 1:0,9:1, та 1:0,7:1,5 для Vi-TT кон'югації та було виявлено, що низький вміст балка з 1,5 EDC може дати оптимальну конверсію кон'югації (%).

Виявлено, що Vi Ps зі змінними розмірами можуть бути кон'юговані з TT, активованими ADH.

15 Використання різних співвідношень Ps:Pr:EDC:1:0,7:1,8, 1:0,8:1,8, 1:0,9:2 та 1:1:2 при нижчих pH за різних методів очищення призводить до співвідношення PS/Pr більш ніж 0,5, нижчим значенням вільних Ps з добрим вилученням кон'югатів.

D2) Одержання моновалентних кон'югатів Salmonella paratyphi:

Два типи хімічної кон'югації (ціанілювання та карбодіімідна хімія) були застосовані для кон'югації Paratyphi OSP з білком-носієм дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT):

20 1) Кон'югація OSP Paratyphi з білком-носієм дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT) на основі хімії ціанілювання

А) Дериватизація дифтерійного анатоксину (DT), (додавання лінкеру ADH) за допомогою карбодіімідної хімії та кон'югація з концентрованим OSP за допомогою хімії ціанілювання

25 В) Дериватизація CRM197, правцевого анатоксину (TT) (додавання лінкеру ADH) за допомогою хімії карбодіімиду та кон'югація з концентрованим OSP за допомогою хімії ціанілювання

С) Дериватизація правцевого анатоксину (TT) (додавання лінкеру ADH) за допомогою карбодіімідної хімії та кон'югація з концентрованим OSP за допомогою хімії ціанілювання

30 1А) Одержання кон'югатів S. Paratyphi з використанням дифтерійного анатоксину як білка-носія.

1) Дериватизація білків:

Високомономерний дифтерійний анатоксин (DT) концентрували до (10-20 мг/мл) на мембрані 10 кДа та аналізували на вміст білка

Таблиця 44

Вміст білка, виміряний методом BCA (біцинхонінова кислота)

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл
Концентрований DT	12,27

35

До концентрованого DT додавали свіжоодержаний 1M MES буфер, дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинено 75-100 мг/мл у 100mM MES буфері pH:5,8) у співвідношенні 1:10 за масою та EDAC (1-етил-3-(3- диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинено 30-40 мг/мл у 100mM MES буфері pH:5,8) у співвідношенні 1:1 за масою. Реакцію продовжували при pH 5,8 протягом 1 години, потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 50 mM боратному буфері pH 9,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст білка та ступінь дериватизації.

40

Таблиця 45

Ступінь дериватизації за результатами аналізу TNBS

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл	DOD
ADH Дериватизований DT	40	16,40

- 2) Кон'югація полісахариду S. Paratyphi A (OSP) та DT дериватизованого ADH:
 Були проведені два експерименти шляхом зміни співвідношення 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT) (CPIP).
 Експеримент № 1-OSP концентрували на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-15 мг/мл).

Таблиця 46

Вміст полісахаридів було проаналізовано методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Загальна кількість PS мг/мл
Концентрований OSP	13,48

- 10 До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодржаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,3 за масою. рН негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою PS: PR: CPIP як 1:0,8:1,3
- 15 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.
- Див. Фіг. 1: Порівняння полісахариду, білка та кон'югату (PS: PR: CPIP 1:0,8:1,3).
- 20 3) Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Туорепал HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl обсягу колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений в колонку і фракції зібрані з інтервалом 1 хв. Фракції 2-9 були об'єднані відповідно до профілю ВЕРХ. Остаточні об'єднані фракції фільтрували та відправляли на аналіз.

25

Таблиця 47

Оцінка очищеного кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,3)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
OSP-DT ADH кон'югат 1	0,215	0,210	1,02

Див. Фіг. 2: Хроматограма очищеного GFC кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,3)
 Експеримент №: 2 -

- 30 До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодржаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,1 по масі. рН негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,1.

- 35 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

Див. Фіг. 3: Порівняння полісахариду, білка та кон'югату (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,1).

- 40 Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Туорепал HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl 1 % оцінки цілісності упакованої колонки Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при 30 см/год., кон'югат був завантажений в колонку, і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Фракції 2-8

були об'єднані відповідно до профілю ВЕРХ. Остаточні об'єднані фракції були відфільтровані та відправлені на аналіз

Таблиця 48

Оцінка очищеного кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,1)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
OSP-DT ADH кон'югат 2	0,113	0.100	1,13

- 5 Див. Фіг. 4: Хроматограма очищеного GFC кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,1)
Висновки: Кон'югація Paratyphi A PS з використанням ADH дериватизованого DT була визнана успішною, а співвідношення PS/PR-задовільним.
1В. Одержання кон'югатів S.Paratyphi з використанням CRM197 як білка-носія
1) Дериватизація білка: Для дериватизації був взятий мутант перехресної реакції (CRM197),
10 отриманий з виробничого відділу (SIPL).

Таблиця 49

Вміст білка, виміряний методом BCA (біцинхонінова кислота).

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл
Концентрований CRM197	32

- 15 До концентрованого CRM197 додавали свіжоодрержаний 1М MES буфер, дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 100мМ MES буфері pH:6,5) у співвідношенні 1:3,5 за масою та EDAC (1-етил-3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері pH:6,5) у співвідношенні 1:0,25 за масою. Додавали 5 % Tween 80. Кінцевий об'єм реакції доводили до 100 мМ буферу MES для досягнення кінцевої концентрації 3-4 мг/мл. Реакцію продовжували при pH 6,5 протягом 3 годин, потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 50 мМ боратному буфері і 0,005 % Tween 80
20 pH 9,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст білка та ступінь дериватизації.

Стислий опис аналізу або посилання: Вміст білка вимірювався методом BCA (біцинхонінова кислота).

Таблиця 50

Ступінь дериватизації за результатами аналізу TNBS

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл	DOD
ADH дериватизований CRM197	32	6,74

- 25 2) Кон'югація полісахариду S.Paratyphi A (OSP) та ADH-дериватизованого CRM197:
OSP, одержаний від DSP, концентрували на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-15 мг/мл).

Таблиця 51

Вміст полісахаридів, проаналізований методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Загальна кількість PS мг/мл
Концентрований OSP	11,7

- 30 До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодрержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,3 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:1 за масою PS:PR:CPIP як 1:1:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

Див. Фіг. 5 та 6: Порівняння полісахариду, білка та кон'югату (PS:PR:CPIP як 1:1:1,3)

- 5 3) Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Tюperal HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCL колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCL при швидкості 30 см/годину, кон'югат був завантажений на колонку і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Фракції 2-7 були об'єднані відповідно до профілю ВЕРХ. Остаточо об'єднані фракції фільтрували та відправляли на аналіз.

Таблиця 52

Оцінка очищеного кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP 1:1:1,3)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат OSP-CRM ADH	0,150	0,220	0,681

Див. Фіг. 7: Хроматограма очищеного GFC кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP як 1:1:1,3)

- 15 Висновки: Кон'югація PS Paratyphi A з використанням ADH дериватизованого CRM197 була визнана успішною, а співвідношення PS/PR-задовільним.

1С) Одержання кон'югатів S.Paratyphi з використанням правцевого анатоксина як білка-носія:

- 20 1) Дериватизація білка: Високомономерний правцевий таксоїд (ТТ), отриманий з виробничого відділу (SIPL), концентрували до (15-20 мг/мл) на мембрані 30 кДа і аналізували на вміст білка.

Таблиця 53

Вміст білка, виміряний методом аналізу Лоурі

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл
Концентрований ТТ	16,29

- 25 У концентрований ТТ свіжоодержаний 1М MES буфер додавали дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 100 мМ MES буфері pH:6,0) у співвідношенні 1:10 за масою та EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл в 100мМ MES буфері pH: 6,0) при масовому співвідношенні 1:1. Реакцію продовжували при pH 6,0 протягом 1 години, потім реакційну суміш фільтрували на 30 кДа TFF в 10 мМ фосфатному буфері pH 7, для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст білка і ступінь дериватизації.

30 Стислий опис аналізу або посилання: Вміст білка вимірювався методом аналізу Лоурі.

Таблиця 54

Ступінь дериватизації за результатами аналізу TNBS

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл	DOD
ADH дериватизований ТТ	16,29	12,9

2) Кон'югація полісахариду S.Paratyphi A (OSP) та дериватизованого ТТ з ADH:

- 35 OSP, одержаний від DSP Team, був концентрований на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-13 мг/мл).

Таблиця 55

Вміст полісахаридів, проаналізований методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Загальна кількість PS мг/мл
Концентрований OSP	13,20

Два експерименти були проведені шляхом зміни співвідношення 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT) (CPIP).

Експеримент №:1

5 До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,25 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,25

10 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

Див. Фіг. 8: Порівняння полісахариду, білка та кон'югату (PS:PR:CPIP 1:0,8:1,25)

15 3) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат очищали методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа 10 мМ PBS pH 7,2, потім 10 мМ Tris буфер pH7,2. Кінцевий концентрований зразок відправляли на аналіз.

Таблиця 56

Оцінка очищеного кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,25)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат OSP-TT ADH	0,098	0,120	0,816

Див. Фіг. 9: Хроматограма очищеного GFC кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,25)

Експеримент №: 2

20 До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,3 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,9 за масою PS:PR:CPIP 1:0,9:1,3

25 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

Див. Фіг. 10: Порівняння полісахариду, білка та кон'югату (PS:PR:CPIP1:0,9:1,3)

30 3) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат був очищений методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа в 10 мМ PBS pH7,2, потім 10 мМ Tris буфер pH7,2. Кінцевий концентрований зразок був відправлений на аналіз.

Таблиця 57

Оцінка очищеного кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP1:0,9:1,3)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат OSP-TT ADH	0,025	0,035	0,715

Див. Фіг. 11: Хроматограма очищеного GFC кон'югату OSP-DT ADH (PS:PR:CPIP1:0,9:1,3)

35 Висновки: Кон'югація Paratyphi A PS з використанням ADH дериватизованого TT була визнана успішною, були застосовані два різні типи стратегії діалізації, і обидва процеси дали задовільне співвідношення PS/Pr.

2) Кон'югація OSP Paratyphi з білком-носієм дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT) на основі хімії карбодііміду

40 А) Дериватизація концентрованого OSP (додавання лінкеру ADH) за допомогою хімії ціанілювання та кон'югація з правцевим анатоксином (TT) за допомогою хімії карбодііміду.

В) Дериватизація концентрованого OSP (додавання лінкеру ADH) за допомогою хімії ціанілювання та кон'югація з дифтерійним анатоксином (DT) за допомогою хімії карбодііміду.

С) Дериватизація концентрованого OSP (додавання лінкеру ADH) за допомогою хімії ціанілювання та кон'югація з CRM197 за допомогою хімії карбодііміду.

45 2А) Одержання кон'югатів S. Paratyphi з використанням анатоксину правця як білка-носія.

1) Дериватизація полісахаридів: OSP, отриманий від DSP Team, був сконцентрований на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-13 мг/мл).

Таблиця 58

Вміст полісахаридів, проаналізований методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Загальна кількість PS мг/мл
Концентрований OSP	13,20

До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:0,7 за масою. рН негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім дигідразид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 0,5 М бікарбонатному буфері рН: 8,0) у співвідношенні 1:10 за масою PS: ADH: CPIP як 1:10:0,7. Реакцію продовжували при рН 9,5 приблизно 2 годин, гасили за допомогою 2 М гліцину 10 і потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 100 мМ MES буфері рН 6,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст полісахаридів

Таблиця 59

Вміст полісахаридів, проаналізований методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Вміст PS (мг/мл)
Вміст PS	20,7

2) Підготовка білка: Високомономерний таксоїд правця (ТТ), отриманий з виробничого відділу (SIPL), був сконцентрований до (10-15мг/мл) на мембрані 30 кДа і проаналізований на вміст білка.

Стислий опис аналізу або посилання: Вміст білка вимірювали методом аналізу Лоурі.

Таблиця 60

Вміст білка, виміряний методом аналізу Лоурі

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл
Концентрований ТТ	15,3

3) Кон'югація дериватизованого ADH полісахариду S.Paratyphi A (OSP) та концентрованого ТТ: Два експерименти були проведені за різних температур для перевірки конверсії Pr.

Експеримент №:1

До дериватизованого ADH PS додавали білок у співвідношенні 1:0,9 за масою та свіжоодержаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,86 за масою. Реакцію продовжували при рН 6,0, температурі 6°C, співвідношення PS:PR:EDC як 1:0,9:0,86.

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу перетворення білка. Реакцію гасили через 23 год. додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

Фіг. 12: Хроматограма, що відображає хід реакції кон'югації (нейтралізація реакційної суміші через 23 години)

4) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат очищали методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа 10 мМ PBS pH7,2, потім 10 мМ Tris Buffer pH7,2. Кінцевий концентрований зразок відправляли на аналіз.

Таблиця 61

Оцінка очищеного кон'югату OSP ADH-TT (PS:PR:EDC 1:0,9:0,86)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат ADH OSP-TT	0,013	0,200	0,06

Експеримент №: 2

До дериватизованого ADH PS додавали білок у співвідношенні 1:0,9 за масою та свіжоодержаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100 мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,86 за масою. Реакцію продовжували при pH 6,0, температури 10 °C співвідношення PS:PR:EDC як 1:0,9:0,86.

5 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу перетворення білка. Реакційну суміш гасили через 4 години додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

Фіг. 13: Хроматограма, що відображає хід реакції кон'югації

10 4) Очистка кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Toyoperal HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений в колонку і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Фракції 2-10 були об'єднані відповідно до профілю ВЕРХ. Остаточні об'єднані фракції фільтрували та відправляли на аналіз.

Таблиця 62

Оцінка очищеного кон'югату ADH OSP-TT

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат ADH OSP-TT	0,017	0,270	0,06

20 Висновки: Використовуючи хімію зворотної кон'югації (активуючий PS), кон'югація ADH-дериватизованого Paratyphi A PS та концентрованого TT була визнана успішною при підвищенні температури з 6 до 10 °C. Швидкість реакції кон'югації збільшилася, співвідношення PS/Pr було дуже низьким в обох реакціях.

2B) Одержання кон'югатів S.Paratyphi з використанням дифтерійного токсиду як білка-носія.

25 1) Дериватизація полісахаридів: OSP, отриманий від DSP Team, був сконцентрований на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-13 мг/мл).

Таблиця 63

Вміст полісахаридів, проаналізований методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Загальна кількість PS мг/мл
Концентрований ОСП	10,09

30 До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (0,114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:0,7 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім дигідразид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 0,5 М бікарбонатному буфері pH:8,0) у співвідношенні 1:10 за масою PS:ADH:CPIP як 1:10:0,7. Реакцію продовжували при pH 9,5 приблизно 2 годин, гасили за допомогою 2 М гліцину 10 і потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 100 мМ MES буфері pH 6,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Остаточний зразок аналізували на вміст полісахаридів.

Таблиця 64

Вміст полісахаридів, проаналізований методом антронового аналізу

Контрольний зразок	Вміст PS (мг/мл)
Вміст PS	18,20

2) Підготовка білка: Високомономерний дифтерійний анатоксин (DT), отриманий з виробничого відділу (SIPL), концентрували до (10-20 мг/мл) на мембрані 10 кДа та аналізували на вміст білка.

40 Стислий опис аналізу або посилання: Вміст білка вимірювався методом аналізу Лоурі.

Таблиця 65

Вміст білка, виміряний методом аналізу Лоурі

Контрольний зразок	Загальний білок мг/мл
Концентрований DT	16,09

3) Кон'югація дериватизованого полісахариду S.Paratyphi A (OSP) та концентрованого DT: Ті ж умови кон'югації TT були застосовані до DT для перевірки перетворення Pr.

5 Експеримент №:1

До дериватизованого ADH PS додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою та свіжоодржаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,86 за масою Реакцію продовжували при рН 6,0, температурі 6°C, співвідношення PS:PR:EDC як 1:0,8:0,86.

10 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу перетворення білка. Реакцію гасили через 20 годин додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

Див. Фіг. 14: Хроматограма, що відображає хід реакції кон'югації (нейтралізація реакційної суміші через 20 годин)

15 4) Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Tyoperal HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений на колонку і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Фракції 2-12 були об'єднані відповідно до профілю ВЕРХ. Остаточні об'єднані фракції були відфільтровані та надіслані на аналіз.

Таблиця 66

Оцінка очищеного кон'югату OSP ADH-DT (PS:PR:EDC 1:0,9:0,86)

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат ADH OSP-DT	0,020	0,300	0,060

Див. Фіг. 15: Хроматограма, що зображує очищений кон'югат (об'єднані фракції)

25 Експеримент №:2

До дериватизованого ADH PS додавали білок у співвідношенні 1:1,0 за масою та свіжоодржаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100 мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,9 за масою. Реакцію продовжували при рН 6,0, температурі 10°C, співвідношення PS:PR:EDC як 1:1,0:0,9.

30 Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу перетворення білка. Реакцію гасили через 4 години додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

Див. Фіг. 16: Хроматограма, що відображає хід реакції кон'югації (нейтралізація реакційної суміші через 4 години)

35 4) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат був очищений методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа 10 мМ PBS рН 7,2, потім 10 мМ Трис буфер рН 7,2. Кінцевий концентрований зразок був відправлений на аналіз.

Див. Фіг. 17: Хроматограма, що зображує очищений кон'югат

Таблиця 67

Оцінка очищеного кон'югату ADH OSP-DT

Контрольний зразок	TPS (мг/мл)	TPr (мг/мл)	Співвідношення (Ps/pr)
Кон'югат ADH OSP-DT	0,019	0,230	0,08

40

Висновки: Кон'югація дериватизованого ADH Paratyphi A PS за допомогою хімії карбодііміду була визнана успішною при використанні концентрованого DT. Швидкість реакції кон'югації

збільшувалася при підвищенні температури, але співвідношення PS/Pr було низьким в обох експериментах.

D3) Спосіб кон'югації полісахариду, одержаного зі штамів *Salmonella* серовар *S. typhimurium* і *S. enteritidis*, з білком-носієм, вибраним з правцевого анатоксина (TT), дифтерійного анатоксина (DT) або CRM197.

1) Кон'югація полісахариду *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з білком-носієм дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT) на основі хімії ціанілювання

А) Дериватизація дифтерійного токсину (DT), (додавання лінкеру ADH) за допомогою карбодіімідної хімії та кон'югація з концентрованим полісахаридом *S. typhimurium* та *S. enteritidis* за допомогою хімії ціанілювання

В) Дериватизація CRM197 (додавання лінкеру ADH) з використанням хімії карбодііміду та кон'югація з концентрованими *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з використанням хімії ціанілювання

С) Дериватизація правцевого анатоксину (TT) (додавання лінкеру ADH) за допомогою карбодіімідної хімії та кон'югація з концентрованими *S. typhimurium* та *S. enteritidis* за допомогою хімії ціанілювання

Д) Кон'югація Paratyphi OSP з білком-носієм дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT) без дериватизації полісахариду або білка-носія на основі хімії ціанілювання (CPPT).

Процедуру наведено нижче:

А) Одержання полісахаридних кон'югатів *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з використанням дифтерійного анатоксину (DT) як білка-носія.

1) Дериватизація білків:

Високомономерний дифтерійний анатоксин (DT) концентрували до (10-20 мг/мл) на мембрані 10 кДа та аналізували на вміст білка

До концентрованої DT додавали свіжоодержаний 1М MES буфер, дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 100мМ MES буфері pH: 5,8) у співвідношенні 1:10 за масою та EDAC (1-етил-3-(3- диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері pH: 5,8) у співвідношенні 1:1 за масою. Реакцію продовжували при pH 5,8 протягом 1 години, потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 50 мМ боратному буфері pH 9,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст білка та ступінь дериватизації.

2) Кон'югація полісахариду (PS) *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з дериватизованим ADH DT:

Два експерименти були проведені шляхом зміни співвідношення 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT) (CPIP).

Експеримент №1 - Полісахарид *S. typhimurium* і *S. enteritidis* був сконцентрований на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-15 мг/мл).

До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,3 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

3) Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Туорепал HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений в колонку, і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Остаточні об'єднані фракції фільтрували та відправляли на аналіз.

Експеримент №: 2 -

До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,1 по масі. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою PS:PR:CPIP як 1:0,8:1,1.

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Туорепал HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl 1 % оцінки

цілісності упакованої колонки Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений в колонку і фракції були зібрані з інтервалом 1 хв. Остаточно об'єднані фракції фільтрували та відправляли на аналіз.

Висновки: Кон'югація полісахаридів *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з використанням ADH дериватизованого DT була визнана успішною, а співвідношення PS/PR-задовільним.

В. Одержання полісахаридних кон'югатів *S. typhimurium* і *S. enteritidis* з використанням CRM197 як білка-носія

1) Дериватизація білка: Для дериватизації був взятий мутант, що перехресно реагує, (CRM197), отриманий з виробничого відділу (SIPL).

До концентрованого CRM197 додавали свіжоодержаний 1М MES буфер, дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 100мМ MES буфері pH:6,5) у співвідношенні 1:3,5 за масою та EDAC (1-етил-3- диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері pH:6,5) у співвідношенні 1:0,25 за масою. Додавали 5 % Tween 80. Кінцевий об'єм реакції доводили до 100 мМ буферу MES для досягнення кінцевої концентрації 3-4 мг/мл. Реакцію продовжували при pH 6,5 протягом 3 годин, потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 50 мМ боратному буфері і 0,005 % Tween 80 pH 9,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст білка та ступінь дериватизації.

2) Кон'югація полісахариду (PS) *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з ADH-дериватизованим CRM197:

PS, отриманий від DSP, концентрували на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-15 мг/мл).

До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,3 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:1 за масою PS:PR:CPiP як 1:1:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

3) Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Tuperal HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений в колонку і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Остаточно об'єднані фракції були відфільтровані та надіслані на аналіз.

Висновки: Кон'югація PS *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з використанням АДГ дериватизованого CRM197 була визнана успішною, а співвідношення PS/PR-задовільним.

С) Одержання кон'югатів *S. Paratyphi* з використанням анатоксину правця як білка-носія:

1) Дериватизація білка: Високомономерний таксоїд правця (ТТ), отриманий з виробничого відділу (SIPL), концентрували до (15-20 мг/мл) на мембрані 30 кДа і аналізували на вміст білка. До концентрованого ТТ додавали свіжоодержаний 1М MES буфер, дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100 мг/мл у 100мМ MES буфері pH:6,0) у співвідношенні 1:10 за масою та EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл в 100мМ MES буфері pH:6,0) у масовому співвідношенні 1:1. Реакцію продовжували при pH 6,0 протягом 1 години, потім реакційну суміш фільтрували на 30 кДа TFF в 10 мМ фосфатному буфері 2 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст білка і ступінь дериватизації.

2) Кон'югація полісахариду (PS) *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з дериватизованим ТТ, що містить ADH:

OSP, отриманий від DSP Team, був концентрований на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-13 мг/мл).

Два експерименти були проведені шляхом зміни співвідношення 1-ціано-4-піролідінопіридиній тетрафтороборату (CPPT) (CPiP).

Експеримент №:1

До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,25 по масі. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою PS:PR:CPiP як 1:0,8:1,25

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж, ніж PS за масою.

3) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат очищали методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа 10 мМ PBS pH7,2, потім 10 мМ Tris буфер pH7,2. Кінцевий концентрований зразок відправляли на аналіз.

Експеримент №: 2

До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114 мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:1,3 за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5 М NaOH і витримували до 3 хв. Потім додавали білок у співвідношенні 1:0,9 за масою PS:PR:CPIC 1:0,9:1,3.

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 3-4 години додаванням 2М гліцину в 10 разів більш ніж PS за масою.

3) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат очищали методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа 10 мМ PBS pH7,2, потім 10 мМ Tris Buffer pH7,2. Кінцевий концентрований зразок відправляли на аналіз.

Висновки: Кон'югація полісахаридів *S. typhimurium* та *S. enteritidis* (PS) з використанням АДН дериватизованого ТТ була визнана успішною, були застосовані два різні типи стратегії діалізації, і обидва процеси призвели до задовільного співвідношення PS/Pr.

2) Кон'югування полісахариду *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з білком-носієм дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT) на основі хімії карбодііміду

А) Дериватизація концентрованого полісахариду *S. typhimurium* і *S. enteritidis* (додавання лінкеру АДН) за допомогою хімії ціанілювання та кон'югація зі правцевим анатоксином (TT) за допомогою хімії карбодііміду.

В) Дериватизація концентрованого полісахариду *S. typhimurium* і *S. enteritidis* (додавання лінкеру АДН) за допомогою хімії ціанілювання та кон'югація з дифтерійним анатоксином (DT) за допомогою хімії карбодііміду.

С) Дериватизація концентрованого полісахариду *S. typhimurium* і *S. enteritidis* (додавання лінкеру АДН) за допомогою хімії ціанілювання та кон'югація з CRM197 за допомогою хімії карбодііміду.

Д) Кон'югування Paratyphi OSP до білків-носіїв дифтерійного анатоксину (DT), CRM197 та правцевого анатоксину (TT) без дериватизації полісахариду або білка-носія на основі хімії карбодііміду (EDAC).

Процедуру дотримано:

1) Дериватизація полісахариду (PS): Одержаний полісахарид *S. typhimurium* та *S. enteritidis* концентрували на мембрані 10 кДа для досягнення концентрації (10-13 мг/мл). До концентрованого PS додавали 0,9 % NaCl і свіжоодержаний розчин CPIP (114мг/мл в ацетонітрилі) додавали у полісахарид у співвідношенні 1:0,5-1:2 (1:0,7) за масою. pH негайно зсували до 9,5 за допомогою 2,5М NaOH і витримували до 3 хв. Потім дигідрозид адипінової кислоти (ADH) (розчинений 75-100мг/мл у 0,5М бікарбонатному буфері натрію pH:8,0) у співвідношенні 1:10 за масою PS:ADH:CPIC як 1:2:0,7 до 1:10:0,7 Реакцію продовжували при 9,5 pH протягом приблизно 2 годин, гасили за допомогою 2М гліцину 10 і потім реакційну суміш фільтрували на 10 кДа TFF в 100мМ MES буфері pH 6,0 для видалення залишків і компонентів, що не прореагували. Кінцевий зразок аналізували на вміст полісахаридів.

2) Підготовка білків:

2А) Підготовка білка: Високомономерний таксоїд правця (TT), отриманий з виробничого відділу (SIPL), був сконцентрований до (10-15мг/мл) на мембрані 30 кДа і проаналізований на вміст білка.

2В) Підготовка білка: Високомономерний дифтерійний анатоксин (DT), отриманий з виробничого відділу (SIPL), концентрували до (10-20 мг/мл) на мембрані 10 кДа та аналізували на вміст білка.

2С) Підготовка білка: Високомономерний CRM197, отриманий з виробничого відділу (SIPL), був сконцентрований до (10-20 мг/мл) на мембрані 10 кДа і проаналізовано на вміст білка

3) Кон'югація

3А) Кон'югація АДН дериватизованого полісахариду *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з концентрованим ТТ:

До АДН дериватизованого PS додавали білок у співвідношенні 1:0,9 за масою та свіжоодержаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл

у 100мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,86 за масою Реакцію продовжували при рН 6,0, температурі 6°C, співвідношення PS:PR:EDC як 1:0,9:0,86

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу конверсії білка. Реакцію гасили через 23 год. додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

3В) Кон'югація дериватизованого ADH полісахариду *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з концентрованим DT: Ті ж умови кон'югату TT були застосовані до DT для перевірки Pr-конверсії.

До ADH дериватизованого PS додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою та свіжоодржаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл) карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,86 за масою Реакцію продовжували при рН 6,0, температурі 6°C, співвідношення PS:PR:EDC як 1:0,8:0,86

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу перетворення білка. Реакцію гасили через 20 годин додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

3С) Кон'югація ADH дериватизованого полісахариду *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з концентрованим CRM197: Ті ж умови кон'югації TT та DT були застосовані до CRM197 для перевірки Pr-конверсії.

До ADH дериватизованого PS додавали білок у співвідношенні 1:0,8 за масою та свіжоодржаний EDAC (1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл)карбодіімід) (розчинений 30-40 мг/мл у 100мМ MES буфері) у співвідношенні 1:0,86 за масою Реакцію продовжували при рН 6,0, температурі 6°C, співвідношення PS:PR:EDC як 1:0,8:0,86

Колонки Shodex SB-804 HQ та SB-805 HQ використовувалися послідовно з PBS як рухома фаза при швидкості потоку 1 мл/хв для моніторингу перетворення білка. Реакцію гасили через 20 годин додаванням 100 мМ фосфатного буфера, що містить EDTA.

4) Очищення кон'югату

4А) Очищення кон'югату методом ультрафільтрації: Нейтралізований кон'югат був очищений методом діалізації через мембрану TFF 300 кДа в 10 мМ PBS pH7,2, потім 10 мМ Tris буфер pH7,2 Кінцевий концентрований зразок був відправлений на аналіз.

4В) Очищення кон'югату за допомогою GFC: Колонка XK16/70 була підготовлена з використанням смоли GFC (Tюperal HW65F) з висотою шару 40 см. Колонка була упакована при швидкості потоку 100 см/год., її залишили осаджуватися і пропустили 1М NaCl колонки з метою оцінки цілісності упакованої колонки. Колонка була врівноважена за допомогою 0,9 % NaCl при швидкості 30 см/год., кон'югат був завантажений на колонку і фракції збиралися з інтервалом 1 хв. Фракції 2-12 були об'єднані відповідно до профілю ВЕРХ. Остаточні об'єднані фракції були відфільтровані та надіслані на аналіз.

Висновки: Використовуючи хімію зворотної кон'югації (активуючий PS), кон'югація ADH дериватизованого полісахариду *S. typhimurium* і *S. enteritidis* і концентрованих TT, DT і CRM197 була визнана успішною при підвищенні температури від 6 до 10 °C. Швидкість реакції кон'югації збільшилася; співвідношення PS/Pr було дуже низьким у всіх реакціях.

Кон'югація ADH дериватизованого полісахариду *S. typhimurium* та *S. enteritidis* з концентрованими TT, DT та CRM197 з використанням хімії карбодііміду була визнана успішною. Швидкість реакції кон'югації збільшувалася при підвищенні температури, але співвідношення PS/Pr було низьким в обох експериментах.

Приклад 4: Імуногенні композиції

Таблиця 68А

Моновалентні імуногенні композиції, що містять кон'югований антиген
Salmonella enterica серовар typhi ViPs

№	Компоненти композиції	Імуногенна композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]
1	<i>Salmonella enterica</i> серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
2	<i>Salmonella enterica</i> серовар typhi ViPs-DT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
3	<i>Salmonella enterica</i> серовар typhi ViPs-CRM197 кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
4	<i>Salmonella enterica</i> серовар paratyphi A OSP-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)

Таблиця 68А

Моновалентні імуногенні композиції, що містять кон'югований антиген
Salmonella enterica серовар typhi ViPs

№	Компоненти композиції	Імуногенна композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]
5	Salmonella enterica серовар paratyphi A OSP-DT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
6	Salmonella enterica серовар paratyphi A OSP-CRM197 кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
7	Salmonella enterica серовар typhimurium сахарид - TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
8	Salmonella enterica серовар typhimurium сахарид - DT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Salmonella enterica серовар typhimurium сахарид-CRM197 кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
10	Salmonella enterica серовар enteritidis сахарид - TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
11	Salmonella enterica серовар enteritidis сахарид-DT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)
12	Salmonella enterica серовар enteritidis сахарид-CRM197 кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)

Однократна доза не містить консерванту 2-феноксиетанолу

Багатократна композиція може додатково містити 2-феноксиетанол - 5 мг (1-10 мг)

Таблиця 68В

Бівалентні імуногенні композиції

№	Компоненти композиції	Імуногенна композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]					
		1	2	3	4	5	6
1	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)			
2	Salmonella enterica серовар paratyphi A OSP-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)			25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	
3	Salmonella enterica серовар typhimurium сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою TT або DT або CRM197		25 мкг (1,25-50 мкг)		25 мкг (1,25-50 мкг)		25 мкг (1,25-50 мкг)
4	Salmonella enterica серовар enteritidis сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197			25 мкг (1,25-50 мкг)		25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)

Таблиця 68С

Тривалентні імуногенні композиції

№	Компоненти композиції	Імуногенна композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]			
		1	2	3	4
1	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)		25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
2	Salmonella enterica серовар paratyphi A OSP-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	
3	Salmonella enterica серовар typhimurium сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою TT або DT або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)		25 мкг (1,25-50 мкг)
4	Salmonella enterica серовар enteritidis сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197		25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)

Таблиця 68D

Тетравалентні імуногенні композиції

№	Компоненти композиції	Імуногенна композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]
1	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)
2	Salmonella enterica серовар paratyphi A OSP-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)
3	Salmonella enterica серовар typhimurium сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою TT або DT або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)
4	Salmonella enterica серовар enteritidis сахарид-CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)

Таблиця 68Е

Комбінація допоміжних речовин, протестованих відповідно до антигенного компонента, розкритого вище

№	Експіцієнт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2	Хлорид натрію (140-160 мм)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)	4,5 мкг (1-10 мкг)
3	Трис-буфер (від 10 мМ до 25 мМ)	-	0,61-1,52 мкг	0,61-1,52 мкг	0,61-1,52 мкг									

Таблиця 68Е

Комбінація допоміжних речовин, протестованих відповідно до антигенного компонента, розкритого вище

№	Експіцієнт	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4	Цитратний буфер (від 10 до 25 мМ) Одержаний шляхом розчинення моногідрату лимонної кислоти (СAМ) та дегідрату тринатрій цитрату (ТCD).	-	-	-		CAM - 1,05-2,63 мг TCD- 1,47-3,68 мг	CAM- 1,05-2,63 мг TCD- 1,47-3,68 мг	CAM - 1,05-2,63 мг TCD- 1,47-3,68 мг						
5	Гістидиновий буфер (від 10 до 25 мМ)	-	-	-					0,78-1,94 мг	0,78-1,94 мг	0,78-1,94 мг			
6	Сукцинатний буфер (від 10 до 25 мМ)	-	-	-								0,59-1,48 мг	0,59-1,48 мг	0,59-1,48 мг
7	Полісорбат-20 (0,005-0,1 % мас./об)	-	-	25-500 мкг	25-500 мкг		25-500 мкг	25-500 мкг		25-500 мкг	25-500 мкг		25-500 мкг	25-500 мкг
8	Сахароза (від 0,5 % до 5,0 % внутрішньо венно)				2,5-25 мг			від 2,5 до 25 мг			2,5-25 мг			від 2,5 до 25 мг
9	Вода для ін'єкцій (WFI)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

√ = включений до складу композиції

Таблиця 69

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та зменшену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), D, T, HepB, wP, ViPs-TT і антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]									
		1	2	3	4	5	6	7			
1	Анатоксин дифтерії (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованний антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU

Таблиця 69

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та зменшену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), D, T, HepB, wP, ViPs-TT і антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивований вірус поліомієліту (IPV)									
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	7,5	8	5	10	10	10	10	4	40
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	2	2	2	2	2	2	0,5	8
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	5	10	5	12	16	3.2	32
7	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
8	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг

Таблиця 70

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та зменшену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), D, T, HepB, wP, ViPs-TT, кон'югат OSP та антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
1	Анатоксин дифтерії (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивований антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивований вірус поліомієліту (IPV)									
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	7,5	8	5	10	10	10	10	4	40
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	2	2	2	2	2	2	0,5	8

Таблиця 70

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та зменшену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), D, T, HepB, wP, ViPs-TT, кон'югат OSP та антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	5	10	5	12	16	3,2	32
7	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
8	Кон'югат OSP-CP; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг

Додатково відрегулюйте рН композиції, як описано вище, приблизно до 6,0-7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію та заповніть об'єм шляхом додавання нормального фізіологічного розчину (0,9 %).

5 Може додатково містити одну з комбінацій консервантів

i. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)

ii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

10 iii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

iv. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

15 Комбіновані вакцинні композиції, що включають зменшені дози IPV, D, T, HepB, ViPs-TT, кон'югату OSP, ацелюлярного кашлюку та Hib антигену, можуть містити ацелюлярний кашлюковий антиген, вибраний з - токсину Bordetella у детоксикованій формі (зокрема, генетично або хімічно детоксифікованого), зокрема, анатоксина кашлюку; філаментозного гемаглютиніну; пертактину; або фімбрії. Зокрема, анатоксин кашлюку: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно 8 мікрограм); - філаментозний гемаглютинін: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно 8 мікрограм); - пертактин: від 1 до 20 мікрограм (більш конкретно 2,5 мікрограм); -

20 необов'язково, фімбрії: від 2 до 25 мікрограм; на 0,5мл.

Таблиця 71

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Sabin тип 1 або тип 2 або тип 3), D, T, HepB, wP, ViPs--TT та антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Дифтерійний анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованний антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивованний вірус поліомієліту (IPV)			
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	5	2,5	7,5

Таблиця 71

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Sabin тип 1 або тип 2 або тип 3), D, T, HepB, wP, ViPs--TT та антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	8	16
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	10
7	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
8	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг

Таблиця 72

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Sabin тип 1 або тип 2 або тип 3), D, T, HepB, wP, ViPs-TT, кон'югат OSP та антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Дифтерійний анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованний антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивованний вірус поліомієліту (IPV)			
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	8	16
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	10
7	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
8	Кон'югат OSP-CP; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг

Додатково відрегулюйте рН композиції, як описано вище, приблизно до 6,0-7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію та заповніть об'єм шляхом додавання нормального фізіологічного розчину (0,9 %).

Може додатково містити одну з комбінацій консервантів

i. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)

ii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

iii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

iv. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

Комбіновані вакцинні композиції, що містять зменшені дози IPV, D, T, HepB, ViPs-TT, кон'югату OSP, ацелюлярного кашлюку та антигену Hib, можуть включати антиген ацелюлярного кашлюку, вибраний з - токсину Bordetella у детоксикованій формі (зокрема, генетично або хімічно детоксикованого), зокрема, анатоксина кашлюку; філаментозного гемаглютиніну; пертактину; або фімбрії. Зокрема, анатоксин кашлюку: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно, 8 мікрограм); - філаментозний гемаглютинін: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно, 8 мікрограм); - пертактин: від 1 до 20 мікрограм (більш конкретно, 2,5 мікрограм); - необов'язково, фімбрії: від 2 до 25 мікрограм; на 0,5мл.

Таблиця 73

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), інактивованій ротавірус (IRV), D, T, HepB, wP, ViPs-TT і Hib антиген IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
1	Дифтерійний анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованій антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивованій вірус поліомієліту (IPV)									
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	7.5	8	5	10	10	10	10	4	40
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	2	2	2	2	2	2	0.5	8
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	5	10	5	12	16	3.2	32
7	IRV	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг
8	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг

Таблиця 74

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), інактивованій ротавірус (IRV), D, T, HepB, wP, ViPs-TT і Hib антиген IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
1	Дифтерійний анатоксин (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованій антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг

Таблиця 74

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett)), інактивованій ротавірус (IRV), D, T, HepB, wP, ViPs-TT і Hib антиген IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]								
		1	2	3	4	5	6	7		
5	Кон'югований антиген PRP-TT Hib	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивованій вірус поліомієліту (IPV)									
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	7,5	8	5	10	10	10	10	4	40
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	2	2	2	2	2	2	0,5	8
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	5	10	5	12	16	3.2	32
7	IRV	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг
8	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Кон'югат OSP-CP; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
10	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг	Не більш ніж 0,5 мг

Додатково відрегулюйте рН композиції, як описано вище, приблизно до 6,0-7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію та заповніть об'єм шляхом додавання нормального фізіологічного розчину (0,9 %).

5 Може додатково містити одну з комбінацій консервантів

i. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)

ii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

iii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

iv. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

Комбіновані вакцинні композиції, що містять зменшені дози IPV, IRV, D, T, HepB, ViPs-TT, ацелюлярного кашлюку та Hib антигену, можуть містити ацелюлярний кашлюковий антиген, вибраний з - токсину Bordetella у детоксикованій формі (зокрема, генетично або хімічно детоксикованого), зокрема, анатоксину кашлюку; філаментозного гемаглютиніну; пертактину; або фімбрії. Зокрема, анатоксин кашлюку: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно 8 мікрограм); - філаментозний гемаглютинін: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно 8 мікрограм); - пертактин: від 1 до 20 мікрограм (більш конкретно 2,5 мкг); - необов'язково, фімбрії: від 2 до 25 мікрограм; на 0,5 мл.

Таблиця 75

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Sabin тип 1 або тип 2 або тип 3), D, T, HepB, wP, ViPs--TT та антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Анатоксин дифтерії (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованний антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивованний вірус поліомієліту (IPV)			
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	8	16
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	10
7	IRV	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг
8	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг

Таблиця 76

Комбіновані вакцинні композиції, що містять стандартну дозу та знижену дозу IPV (штам Sabin тип 1 або тип 2 або тип 3), D, T, HepB, wP, ViPs--TT і антиген Hib IPV

№	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного розкриття [на дозу 0,5 мл]		
		1	2	3
1	Анатоксин дифтерії (D)	22,5 Lf	22,5 Lf	22,5 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	7,5 Lf	7,5 Lf	7,5 Lf
3	Інактивованний антиген B. pertussis (wP)	15 IOU	15 IOU	15 IOU
4	HBs антиген	12,5 мкг	12,5 мкг	12,5 мкг
5	Кон'югований антиген Hib PRP-TT	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивованний вірус поліомієліту (IPV)			
	Тип 1 (антигенні одиниці D)	5	2,5	7,5
	Тип 2 (антигенні одиниці D)	16	8	16
	Тип 3 (антигенні одиниці D)	10	5	10
7	IRV	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг	10 мкг від 1 до 50 мкг
8	Salmonella enterica серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген;	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
9	Кон'югат OSP-CP; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)	25 мкг (1,25-50 мкг)
10	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺)	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг	Не більш ніж 0,9 мг

Додатково відрегулюйте рН композиції, як описано вище, приблизно до 6,0-7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію та заповніть об'єм шляхом додавання нормального фізіологічного розчину (0,9 %).

5 Може додатково містити одну з комбінацій консервантів

i. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.)

ii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

10 iii. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

iv. 2-феноксіетанол у кількості від 1 до 10 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

15 Комбіновані вакцинні композиції, що містять знижені дози IPV, IRV D, T, HepB, ViPs-TT, ацелюлярний кашлюковий і Hib антигени, можуть містити целюлярний кашлюковий антиген, вибраний з - токсину Bordetella в детоксикованій формі (зокрема, генетично або хімічно детоксиковані), зокрема, анатоксину кашлюку; філаментозного гемаглютинину; пертактину; або фібрії. Зокрема, анатоксин кашлюку: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно 8 мікрограм); - філаментозний гемаглютинін: від 1 до 50 мікрограм (більш конкретно 8 мікрограм); - Пертактин: від 1 до 20 мікрограм (більш конкретно 2,5 мікрограм); - неов'язково, фібрії: від 2 до 25 мікрограм; на 0,5мл.

Таблиця 77

Повністю рідкий імуногенний склад

	Однократна доза (0,5 мл)	Однократна доза (0,5 мл)	Однократна доза (0,5 мл)	Однократна доза (0,5 мл)	Однократна доза (0,5 мл)
Кон'югат Men A-TT	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Men C- CRM197	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Men Y- CRM197	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Men W- CRM197	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Men X-TT	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Vi-TT	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	-
Кон'югат OSP-CP; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	-	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)
Salmonella enterica серофар typhimurium сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою TT або DT або CRM197	-	-	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)
Salmonella enterica серофар enteritidis сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою або TT, або DT, або CRM197	-	-	-	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)
Хлорид натрію	4,5 мг (1-10 мг)	4,5 мг (1-10 мг)	4,5 мг (1-10 мг)	4,5 мг (1-10 мг)	4,5 мг (1-10 мг)
2-феноксіетанол	5,0 мг (1-10 мг)	5,0 мг (1-10 мг)	5,0 мг (1-10 мг)	5,0 мг (1-10 мг)	5,0 мг (1-10 мг)
Вода для ін'єкцій	Q.s... 0,5 мл	Q.s... 0,5 мл	Q.s... 0,5 мл	Q.s... 0,5 мл	Q.s... 0,5 мл

Таблиця 78

Ліофілізована (висушена сублімацією) імуногенна композиція

	Разова доза (0,5 мл)	Разова доза (0,5 мл)	Разова доза (0,5 мл)	Разова доза (0,5 мл)	Разова доза (0,5 мл)
Кон'югат Мен А-ТТ	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Мен С- CRM197	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Мен Y- CRM197	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Мен W- CRM197	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Мен Х-ТТ	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)	5 мкг (1-30 мкг)
Кон'югат Vi-ТТ	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	-
Кон'югат OSP-CP; CP являє собою або ТТ, або DT, або CRM197	-	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)
Salmonella enterica серофар typhimurium сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою ТТ або DT або CRM197	-	-	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)
Salmonella enterica серофар enteritidis сахарид - CP кон'югований антиген; CP являє собою або ТТ, або DT, або CRM197	-	-	-	25 мкг (1,25- 50 мкг)	25 мкг (1,25- 50 мкг)
Сахароза	11,90 мг (1- 50 мг)	11,90 мг (1- 50 мг)	11,90 мг (1- 50 мг)	11,90 мг (1- 50 мг)	11,90 мг (1- 50 мг)
Цитрат натрію (дигідрат)	1,98 мг (1- 50 мг)	1,98 мг (1- 50 мг)	1,98 мг (1- 50 мг)	1,98 мг (1- 50 мг)	1,98 мг (1- 50 мг)
Трис-буфер	0,48 мг (0,1- 5 мг)	0,48 мг (0,1- 5 мг)	0,48 мг (0,1- 5 мг)	0,48 мг (0,1- 5 мг)	0,48 мг (0,1- 5 мг)

Приклад 5: Дані стабільності

- 5 Стабільність моновалентного кон'югату Salmonella typhi при температурі 2-8 град. протягом початкових (0), 3, 6 місяців; при температурі 25 град С протягом початкових (0), 1, 3 місяців і при температурі 40 град С протягом початкових (0), 14, 28 днів:

Таблиця 79

Стабільність моновалентного кон'югату *Salmonella typhi* при температурі 2-8 градусів Цельсія протягом початкових (0), 3, 6 місяців

Температура зберігання (Цельсій): 2-8 град С					0 місяць				3 місяці				6 місяців			
№	Зразок	Цільовий розмір PS (кДа)	SIPL PS Розмір (кДа)	Номер партії	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)
1)	Кон'югат SIPL (основний)	180-220	214 (Shoedex)	G7 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 2 B#10	6,9	прозора жовта рідина	4,4	1389	6,8	прозора жовта рідина	6,6	1398	7,2	прозора жовта рідина	5,8	1380
2)	Кон'югат SIPL	300	388 (Shoedex)	G6 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 1 B#9	7,3	прозора жовта рідина	7,5	1359	6,9	прозора жовта рідина	9,7	1350	7,3	прозора жовта рідина	8,8	1345
3)	Кон'югат SIPL	120	80 (Shoedex)	G9 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 4 B#12	6,9	прозора жовта рідина	8,0	1352	7,2	прозора жовта рідина	8,5	1300	6,9	прозора жовта рідина	6,7	1310
4)	Кон'югат SIPL	45	42 (TSK 3000 PWXL)	68 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 3 B#12	6,8	прозора жовта рідина	5,4	1293	7,1	прозора жовта рідина	6,5	1200	6,6	прозора жовта рідина	7,7	1187

Таблиця 80

Стабільність моновалентного кон'югату *Salmonella typhi* при 25d град С протягом початкових (0), 1, 3 місяців

Температура зберігання (Цельсій): 25d град С					0 місяць				1 місяць				3 місяці			
№	Зразок	Цільовий розмір PS (кДа)	SIPL PS Розмір (кДа)	Номер партії	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)
1)	Кон'югат SIPL (основний)	180-220	214 (Shoe dex)	G7 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 2 B#10	6,9	прозора жовта рідина	4,4	1392	6,8	прозора жовта рідина	5,4	1380	6,7	прозора жовта рідина	6,1	1387
2)	Кон'югат SIPL	300	388 (Shoe dex)	G6 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 1 B#9	7,3	прозора жовта рідина	7,5	1360	7,2	прозора жовта рідина	8,2	1370	7,1	прозора жовта рідина	7,3	1350
3)	Кон'югат SIPL	120	80 (Shoe dex)	G9 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 4 B#12	6,9	прозора жовта рідина	8,0	1350	7,1	прозора жовта рідина	8,1	1280	7,2	прозора жовта рідина	8,5	1268
4)	Кон'югат SIPL	45	42 (TSK 3000 PWXL)	68 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 3 B#12	6,8	прозора жовта рідина	5,4	1285	6,9	прозора жовта рідина	5,9	1180	6,6	прозора жовта рідина	5,2	1162

Таблиця 81

Стабільність моновалентного кон'югату *Salmonella typhi* при 40 град С
протягом початкових (0), 14, 28 днів

Температура зберігання (за Цельсієм): 40 °С					0 місяць				14 днів (2 тижні)				28 днів (4 тижні)			
№	Зразок	Цільовий розмір PS (кДа)	SIPL PS Розмір (кДа)	Номер партії	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)	pH	Зовнішній вигляд	Вільний PS (%)	SIPL PS Розмір кон'югату (кДа)
1)	Кон'югат SIPL (основний)	180-220	214 (Shoe dex)	G7 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 2 B#10	6,9	прозора жовта рідина	4,4	1388	6,7	прозора жовта рідина	5,8	1348	6,4	прозора жовта рідина	7,5	1355
2)	Кон'югат SIPL	300	388 (Shoe dex)	G6 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 1 B#9	7,3	прозора жовта рідина	7,5	1356	7,1	прозора жовта рідина	9,7	1310	6,8	прозора жовта рідина	10,5	1320
3)	Кон'югат SIPL	120	80 (Shoe dex)	G9 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 4 B#12	6,9	прозора жовта рідина	8,0	1355	6,8	прозора жовта рідина	12,3	1266	6,6	прозора жовта рідина	14,7	1270
4)	Кон'югат SIPL	45	42 (TSK 3000 PWXL)	68 SIPL Vi PS-TT (кон'югований) 3 B#12	6,8	прозора жовта рідина	5,4	1290	6,7	прозора жовта рідина	8,8	1150	6,5	прозора жовта рідина	11,5	1168

Спостереження:

- 5 Вільний Ps ("вихідний" < 4,5 %, через 6 місяців НМТ 7,5 % " для 180-220 кДа Ps Vs "вихідний 5,4 % через 6 місяців НМТ 10,5 % для 388/80/45 кДа " при 40 град С/2 до 8 град С/25 град С).

Для 180-220 кДа, спочатку низький вільний Ps, розмір кон'югату також зберігався протягом дослідження стабільності, спостерігалось менш ніж вільного Ps через 6 місяців порівняно з іншими розмірами.

Дані стабільності SE-BEPX

- 10 (Кон'югат VI-TT в Трис, Трис-NaCl і 0,17M NaCl)

Таблиця 82

Дані SE-BEPX стабільності кон'югату Vi-TT в Трис, Трис-NaCl і 0,17M NaCl

№	Назва зразка	BEPX- SEC Розмір (в кДа)	
		0 День	Тиждень 2
1	B#9 Vi-TT CJ (в 10 мМ Трис) 1:1 розведення в 1X PBS -20 °С	1049	1099
2	B#9 Vi-TT CJ (в 10 мМ Трис + 0,17 М NaCl) 1:1 розведення в 1X PBS-20 °С	1108	1035
3	B#13 Vi-TT CJ (в 0,17 М NaCl) 1:1 розведення в 1X PBS -20 °С	996	1009
4	B#13 Vi-TT CJ (в 0,17 М NaCl+10mm Tris) 1:1 Dil в 1X PBS-20 °С	1004	1006
5	B#9 Vi-TT CJ (в 10 мМ Трис) нативний 2-8 °С 1:1 розведення в 1X PBS	1049	996
6	B#13 Vi-TT CJ (в 0,17 М NaCl) нативний 2-8 °С 1:1 розведення в 1X PBS	996	965

Висновок:

Кон'югат Vi-TT виявився стабільним в 10 мМ трис-буфері, 10 мМ трис, що містить 0,17 М NaCl, і лише 0,17 М NaCl.

Дані для різних концентрацій TRIS (5 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 50 мМ) показують, що 25 мМ Трис є найкращим варіантом.

- Концентрація Vi-TT CJ підтримувалась при трьох різних концентраціях Триса, рН 7,2, таких як 5 мМ, 10 мМ та 20 мМ. Це підтримувалося за різних температурних умов, таких як -20 °С, 2-8 °С, кімнатна температура та 37 °С.

- Дослідження проводилося протягом 2 тижнів і щодня проводився моніторинг рН.

- Зразки перевірялися на розмір часток та зета-потенціал.

Результати рН

Таблиця 83

рН кон'югату Vi-TT в 5мМ, 10мМ, 20мМ Трис при -20 °С, 2-8 °С, кімнатній температурі та 37 °С

День	Vi TT CJ в 5мМ Трис рН 7,0				Vi TT CJ в 10 мМ Трис рН 7,14				Vi TT CJ в 20 мМ Трис рН 7,21			
	-20 °С	2-8 °С	RT	37 °С	-20 °С	2-8 °С	RT	37 °С	-20 °С	2-8 °С	RT	37 °С
0 День	7,0	7,0	7,0	7,0	7,14	7,14	7,14	7,14	7,21	7,21	7,21	7,21
Через 2 тижні	6,58	6,95	6,76	6,94	6,56	7,08	6,98	7,06	7,06	7,10	7,19	7,00

Висновок:

- У дослідженні Vi-TT CJ кон'югат підтримувався в 5, 10 і 20 мМ Трис рН 7,2, рН було у межах діапазону при 2-8 °С концентрації 5, 10 і 20 мМ.

Вимірювання в'язкості та осмоляльності кон'югату Vi-TT

Частина А: Результати вимірювання в'язкості та осмоляльності трис-буферу та хлориду натрію без кон'югату

Таблиця 84

Частина А: В'язкість та осмоляльність трис-буферу та хлориду натрію без кон'югату

Міцність буфера (у мМ)	Осмоляльність (мОсм/кг)	Густина (г/см ³)	В'язкість	
			Кінематична (мм²/с)	Динамічний (мПа.с)
1) Трис-буфер рН 7,2				
5	13	0,9986	1,030	1,028
30	61	0,9999	1,020	1,020
50	81	1,0005	1,031	1,031
75	113	1,0014	1,028	1,030
2) Хлорид натрію				
150	270	1,0043	1,013	1,017
308	562	1,0117	1,020	1,031
350	607	1,0110	1,023	1,035

Частина В: Результати вимірювання в'язкості та осмоляльності трис-буферу та хлориду натрію з кон'югатом

Частина В: В'язкість та осмоляльність трис-буферу та хлориду натрію з кон'югатом

Міцність буфера (у мМ)	Осмоляльність (мОсм/кг)	Густина (г/см ³)	В'язкість	
			Кінематична (мм ² /с)	Динамічний (мПа.с)
I) Трис-буфер + кон'югат				
5	18	0,9985	1,058	1,057
30	53	0,9997	1,061	1,061
50	84	1,0005	1,066	1,067
75	124	1,0017	1,079	1,081
II) Хлорид натрію + кон'югат				
150	281	1,0046	1,048	1,052
308	550	1,0107	1,053	1,064
350	1253	1,0122	1,053	1,066

Висновок:

Кон'югат із змінною концентрацією трису виявився ізотонічним, а кон'югат із 150 мМ NaCl - ізотонічним.

В'язкість кон'югату з різними концентраціями трис-буфера і NaCl виявилася однаковою, і в'язкість підходить для використання їх в якості парентеральних композицій.

Приклад 6: Дані імуногенності

А. Дослідження імуногенності моновалентної кон'югованої вакцини:

Імуногенний потенціал вакцини SIIP Vi TT оцінювали на мишачій моделі.

Дослідження імуногенності на мишах №1:

Дослідження імуногенності було проведено на мишах, де некон'югована та кон'югована з TT вакцина SIIPL (Vi TT) вводилася внутрішньом'язово мишам (8 тварин у групі). Тварин прищеплювали на 1 та 14 день, а зразки сироватки збирали на 14 (дані не показані) та 21 день. Детальний опис наведено у Таблиці 86. Парні зразки сироватки були отримані від усіх тварин у кожній групі. Зразок сироватки використовувався для визначення антитіл проти введеного полісахариду за допомогою відповідного способу серологічного імунохімічного, наприклад, власного IgG ELISA. Сироватка мишей, що отримали некон'югований полісахарид SIIPL (Vi PS), використовувалася як порівняльний контроль для індукції IgG-відповіді в сироватках мишей, що отримали кон'юговані версію Vi PS (з різним розміром PS).

Дослідження імуногенності на мишах №2:

Інше аналогічне дослідження було проведено на мишах. В обох дослідженнях використовувався аналогічний протокол лікування тварин. Протокол лікування тварин стисло описано нижче. Сироватки обох досліджень протестували ідентичним імунологічним/серологічним аналізом, тобто за допомогою IgG ELISA. У дослідженні використовували мишей-самок 5-6 тижневого віку (штам Balb C; розведені на місці), використовуючи протокол дослідження тварин, затверджений IAEC. Всі тварини були вільні від особливих патогенів та оброблялися в асептичних умовах у боксі біологічної безпеки під час щеплень та взяття зразків крові. Маса мишей на початку дослідження становила ~ 18-20 г. Кожна миша отримала 2,5 мкг кон'югованої вакцини Vi TT внутрішньом'язово. Вакцина SIIPL Vi TT була розведена у фосфатно-буферному сольовому розчині (PBS) як основа. У дослідженні не використовувався ад'ювант для жодної з груп лікування.

Схема лікування У наступній таблиці наводиться загальний план лікування для дослідження.

План лікування мишей

№	Ідентифікатор групи	Група лікування (фактичний план)	Тварини/група	Доза Vi PS на тварину	Об'єм ін'єкції	День ін'єкції (IM)	День відбору крові (сироватки)
			Миші Balb/C (самка)				
1	G1	Тільки основа (PBS)	8	PBS	100 мкл	1, 14	21
2	G2	Турбар (некон'югований)	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
3	G3	Турбар TCV (кон'югований)	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
4	G4	Стандарт NIBSC Vi PS	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
5	G5	SIPL Vi PS (некон'югований)	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
6	G6	G6 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
7	G7	G7 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
8	G8	G8 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21
9	G9	G9 SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	100 мкл	1, 14	21

Методологія та способи, що використовуються для серологічного аналізу:

- Зразок крові у експериментальних тварин відібрали із ретроорбітальної вени за допомогою стерильних скляних капілярних трубок. Як безпечний анестетик під час процедури відбору крові використовувалася ізофлуран. Сироватки піддавали аналізу на антитіла IgG, що виробляються у відповідь на введення некон'югованої або кон'югованої вакцини Vi TT, за допомогою власної IgG ELISA. В ELISA використовували еталонний стандарт NIBSC Vi PS (каталожний номер 16/126; перший міжнародний стандарт для Vi PS S. Typhi) як покриваючий антиген. Рівень IgG оцінювали за допомогою аналізу оптичної щільності (OD), що спостерігається в сироватках мишей, що отримували кон'югований Vi PS (Vi TT з різним розміром PS), порівняно з OD, що спостерігається у зразках сироваток мишей, що отримували некон'югований полісахарид SIPL (Vi PS).

- У наступних таблицях наведено дані щодо індукції імуногенності (на 21 день) різних Vi TT PS.

Таблиця 87, 88, 89 та 90 Результати імуногенності

Таблиця 87

Таблиця 88

Результати імуногенності

Результати імуногенності

Дослідження імуногенності 1			Дослідження імуногенності 1		
G7 SIPL Vi PS-TT			G6 SIPL Vi PS-TT		
Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення	Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення
8	F	Кон'югований та некон'югований	8	F	Кон'югований та некон'югований
>4 Підвищення		63,2	>4 кратне підвищення		67,23
n/N %		100 % (8 з 8)	n/N %		100 % (8 з 8)
Середнє геометричне		1,8	Середнє геометричне		1,8
Мінімальне		1,45	Мінімальне		1,57
Максимальне		1,95	Максимальне		1,98

Таблиця 89

Таблиця 90

Результати імуногенності

Результати імуногенності

Дослідження імуногенності 1			Дослідження імуногенності 1		
G9 SIPL Vi PS-TT			G8 SIPL Vi PS-TT		
Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення	Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення
8	F	Кон'югований та некон'югований	8	F	Кон'югований та некон'югований
>4 кратне підвищення		65,4	>4 кратне підвищення		62.5
н/н%		100 % (8 із 8)	н/н%		100 % (8 із 8)
Середнє геометричне		1.7	Середнє геометричне		1.7
Мінімум		1.50	Мінімум		1.05
Максимальний		2.287	Максимальний		1.95

Спостереження:

- 5 У групах мишей, що отримували Vi TT, спостерігалася більш ніж 4-кратна індукція IgG (порівняно з мишами, яким вводили некон'югований Vi PS), що переконливо свідчить про імуногенний потенціал SIPL Vi TT при всіх розмірах PS. Два окремі дослідження були проведені з Vi TT, і обидва дослідження показали подібну відповідь Vi TT порівняно з Vi PS.

У різних групах порівнювалися такі параметри:

- 10 а. >4-кратне збільшення: середнє збільшення було >60 кратним
 б. GM в титрі антитіл: у всіх групах спостерігався вищий GM, ніж при некон'югованих PS (>1,9)
 в. % мишей з позитивною відповіддю: всі миші у всіх групах Vi TT показали більш високу відповідь антитіл (100 % позитивних відповідей).

Висновки з аналізу серологічних даних:

- 15 Дослідження імуногенності на мишах проводилося за участю 8 мишей (самок) у кожній групі. Індукція антитіл оцінювалася у всіх групах у відповідь на введення Vi TT (з різним розміром PS) порівняно з некон'югованим Vi PS. Всі форми PS Vi TT переконливо вказували на індукцію специфічних IgG антитіл до Vi TT (на 21 день; після першого бустера) у порівнянні з групою, в якій вводили тільки Vi PS. Індукція IgG у сироватках мишей є сильною детермінантою серологічної відповіді на Vi TT. Таким чином, моновалентний Vi TT здатний викликати сильну імуногенну відповідь у мишачій моделі і є перспективним потенціалом для майбутніх досліджень на вищих тварин.
- 20

Таблиця 91

Стислий опис потенціалу імуногенності моновалентної вакцини SIPL Vi TT у мишачій моделі

№	Зразок	Цільовий розмір PS (кДа)	SIPL PS Розмір (кДа)	Зміни у кон'югатах	Номер партії	Імуногенність (дані GM)	Підвищення рівня GM	% О-ацетилювання (методом ЯМР)
1)	Кон'юговат SIPL (основний)	180-220	214	Очищення: GFC	G7 SIPL Vi PS-TT	1.94	69	105 %
2)	Кон'юговат SIPL	300	388	Очищення: GFC	G6 SIPL Vi PS-TT	1.79	64	107 %
3)	Кон'юговат SIPL	120	80	Очищення: GFC	G9 SIPL Vi PS-TT	1.79	64	102 %
4)	Кон'юговат SIPL	45	42	Очищення: Діафільтрація	G8 SIPL Vi PS-TT	1.75	63	102 %
5)	Typbar TCV	250-300	NA	NA	NA	1.69	60	-

Спостереження:

1. Дані імуногенності оцінюються за рівнем антитіл IgG, що спостерігаються у відповідь на кон'югати SIPL Vi TT в мишачій моделі.

2. Індукція IgG вимірюється як середня геометрична (geometric mean) колориметрична відповідь (OD), що спостерігається в IgG ELISA.

3. GM, що спостерігається у відповідь на SIPL Vi TT, вважається імуногенним, якщо збільшення OD при лікуванні VI TT перевищує в 4-кратне підвищення OD, що спостерігається у відповідь на некон'югований Vi PS.

Висновки:

1. Було встановлено, що всі моновалентні кон'югати Vi-TT викликають імуногенну відповідь, що спостерігається за допомогою серологічного аналізу.

2. Всі моновалентні кон'югати Vi-TT продемонстрували вищі рівні IgG, ніж спостерігалось у групі вакцини Турбар TCV.

3. Індукція імуногенної відповіді (GM та >4-кратне збільшення) спостерігалася в наступному порядку: G7 SIPL Vi PS-TT (розмір PS 214) > G7 SIPL Vi PS-TT (розмір PS 388) > Турбар TCV (комерційна вакцина)

В. Дослідження імуногенності бівалентної кон'югованої вакцини

Імуногенний потенціал бівалентної (тифозної та паратифозної) вакцини SIPL був оцінений на мишачій моделі.

Дослідження імуногенності на мишах №1:

Було проведено дослідження імуногенності на мишах, в якому використовувалася бівалентна вакцина, що містить комбінацію моновалентної вакцини Vi TT і моновалентного O-SP A (О-специфічний полісахаридний антиген S. Paratyphi A), кон'югованого з білками-носіями, такими як TT, DT та CRM. Моновалентні та бівалентні версії цих вакцин вводили внутрішньом'язово мишам (по 8 тварин у групі). Тварин прищеплювали на 1, 14 та 28 день, а зразки сироваток збирали на 14, 28 та 42 день. Парні зразки сироваток були отримані від усіх тварин кожної групи. Детальна інформація про план лікування наведена в Таблиці 92. Зразки сироваток використовувалися для визначення антитіл проти введеного полісахариду за допомогою відповідного способу серологічного імунохімічного, наприклад, власного IgG ELISA. Сироватки мишей, що отримували відповідний некон'югований полісахарид SIPL (Vi PS) і тільки O-SP, використовувалися як порівняльний контроль для індукції IgG відповіді.

Стислий опис протоколу для тварин наведено у Таблиці нижче.

Зразки сироватки було досліджено імунологічним/серологічним аналізом, тобто, IgG ELISA. У дослідженні використовували мишей-самок 5-6 тижневого віку (штам Balb C, виведений на місці), використовуючи протокол дослідження тварин, затверджений IAEC. Усі тварини були вільні від особливих патогенів та оброблялися в асептичних умовах у кабінеті біобезпеки під час щеплень та збору зразків крові. У дослідженні використовувалися миші масою ~18-20 г. Кожна миша отримала 2,5 мкг моновалентної кон'югованої Vi TT окремо або O-SP A DT/TT/CRM окремо та 2,5 мкг кожної з двовалентних вакцин (моновалентна кон'югована Vi TT в суміші з O-SP A DT/TT/CRM) внутрішньом'язово. Вакцини були розведені у фосфатно-буферному сольовому розчині (PBS) як основі. У дослідженні не використовувався ад'ювант для жодної з груп лікування.

Схема лікування У наступній таблиці наводиться загальний план лікування для дослідження.

Таблиця 92

План лікування мишей

№	Ідентифікатор групи	Група лікування (фактичний план)	Тварини / Група	Vi PS/O-SP доза на тварину	Об'єм ін'єкції	День ін'єкції (IM)	День відбору крові (сироватки)
			Миші Balb/C (самка)				
1	G1	Тільки основа (PBS)	8	PBS	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
2	G2	Турбар TCV (кон'югована)	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
3	G3	SIPL Vi PS (некон'югований)	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42

План лікування мишей

№	Ідентифікатор групи	Група лікування (фактичний план)	Тварини / Група	Vi PS/O-SP доза на тварину	Об'єм ін'єкції	День ін'єкції (IM)	День відбору крові (сироватки)
			Миші Balb/C (самка)				
4	G4	SIPL Vi PS-TT	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
5	G5	SIPL O-SP A (некон'югований)	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
6	G6	SIPL O-SP A DT/TT/CRM	8	2,5 мкг	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
7	G7	SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A DT	8	2,5 мкг кожного компонента	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
8	G8	SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A TT	8	2,5 мкг кожного компонента	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
9	G9	SIPL Vi PS-TT + SIPL O-SP A CRM	8	2,5 мкг кожного компонента	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42
10	G10	SIPL O-SP A CRM+Typbar TCV (кон'югований)	8	2,5 мкг кожного компонента	50 мкл	1, 14, 28	14, 28, 42

Методологія та способи, що використовуються для серологічного аналізу:

- Зразки крові були взяті у експериментальних тварин із ретроорбітальної вени за допомогою стерильних скляних капілярних трубок. Як безпечний анестетик під час процедури відбору крові використовувався ізофлуран. Сироватки піддавали аналізу на антитіла IgG, вироблювані у відповідь введення антигену, з допомогою власної IgG ELISA. Рівень IgG оцінювався у зразках сироватки всіх досліджуваних груп за допомогою колориметричного аналізу.

Спостереження:

- У наступних таблицях наведено дані щодо індукції імуногенності (на 21 день) різних бівалентних (тиф та паратиф) вакцин SIPL.

Таблиця 93, 94, 95, 96: Результати імуногенності

Таблиця 93

Таблиця 94

Результати імуногенності

Результати імуногенності

Дослідження імуногенності 1			Дослідження імуногенності 1		
SIPL Vi PS-TT+SIPL O-SP A DT			SIPL Vi PS-TT+SIPL O-SP A TT		
Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення	Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення
8	F	Кон'югований та некон'югований	8	F	Кон'югований та некон'югований
>4 кратне підвищення		Так	>4 кратне підвищення		Так
n/N %		100 % (8 з 8)	n/N %		100 % (8 з 8)

Таблиця 95

Таблиця 96

Результати імуногенності

Результати імуногенності

Дослідження імуногенності 1			Дослідження імуногенності 1		
SIIPL Vi PS-TT+SIIPL O-SP A CRM			SIIPL O-SP A CRM+Турвар TCV		
Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення	Кількість мишей	Стать	Кратне збільшення
8	Ф	Кон'югований та некон'югований	8	Ф	Кон'югований та некон'югований
>4 кратне підвищення		Так	>4 кратне підвищення		Так
n/N %		100 % (8 з 8)	n/N %		100 % (8 з 8)

Спостереження:

- 5 Групи мишей, яким вводили бівалентну (тифозну та паратифозну) вакцину SIIPL, таку як а) SIIPL Vi PS-TT+SIIPL O-SP A DT; PS-TT+SIIPL O-SP A CRM Vi TT продемонстрували в 4 рази більш високу індукцію IgG (порівняно з мишами, яким вводили некон'югований Vi PS або некон'югований SIIPL O-SP A), що вказує на імуногенний потенціал бівалентної вакцини SIIPL, що містить комбінацію Vi TT та SIIPL O-SP A (DT/TT/CRM).

- 10 Індукція IgG бівалентної (тифозної та паратифозної) вакциною SIIPL була вищою, ніж індукція IgG, що спостерігається при використанні бівалентної вакцини, що містить SIIPL O-SP A CRM та комерційної вакцини Vi TT Турвар TCV.

У різних групах порівнювалися такі параметри:

- 15 а. >4-кратне збільшення: середнє збільшення було > 10 кратного збільшення
 б. GM у титрі антитіл: у всіх групах спостерігався вищий GM, ніж у некон'югованому PS
 в. % мишей з позитивною відповіддю: всі миші у всіх групах Vi TT показали більш високу відповідь антитіл (100 % позитивних відповідей).

Висновки з аналізу серологічних даних:

- 20 Дослідження імуногенності на мишах проводилося за участю 8 мишей (самок) у кожній групі. Індукцію антитіл оцінювали у всіх групах у відповідь на введення бівалентної (тифозної та паратифозної) вакцини SIIPL у порівнянні з некон'югованими Vi PS та O-SP A PS. Всі бівалентні (тифозні та паратифозні) вакцини SIIPL сильно індуктували специфічні IgG-антитіла до PS (на 21 день; після першої ревакцинації) порівняно з групою лише PS (Vi PS та O-SP A). Індукція IgG у сироватках мишей є сильним визначальним фактором серологічної відповіді на бівалентну (тифозну та паратифозну) вакцину SIIPL. Таким чином, бівалентна (тифозна і паратифозна) вакцина SIIPL здатна викликати сильну імуногенну відповідь у мишачій моделі і є перспективним потенціалом для майбутніх досліджень на вищих тварин.

Спостереження:

- 30 1. Дані імуногенності оцінюються за рівнем антитіл IgG, що спостерігаються у відповідь на бівалентну (тифозну і паратифозну) вакцину SIIPL в мишачій моделі.
 2. Індукція IgG вимірюється як середня геометрична (geometric mean) колориметрична відповідь (OD), що спостерігається в IgG ELISA.
 3. GM, що спостерігається у відповідь на бівалентну (тифозну і паратифозну) вакцину SIIPL вважається імуногенним, якщо кратне збільшення OD при обробці Vi TT перевищує 4 кратне підвищення OD, що спостерігається у відповідь на некон'югований Vi PS.

Висновки:

- 35 1. Усі бівалентні (тифозні та паратифозні) кон'югати вакцини SIIPL викликали імуногенну відповідь, що спостерігається за допомогою серологічного аналізу.
 2. Всі кон'югати бівалентної (тифозної та паратифозної) вакцини SIIPL показали вищі рівні IgG, ніж некон'юговані аналоги.
 40 3. Індукція IgG бівалентної (тифозної та паратифозної) вакциною SIIPL була вищою, ніж індукція IgG, що спостерігається при використанні бівалентної вакцини, що містить SIIPL O-SP A CRM та комерційної вакцини Vi TT Турвар TCV.
 4. Індукція імуногенної відповіді (GM та >4-кратне підвищення) спостерігалася у мишей, які отримували "бівалентну (тифозну і паратифозну) вакцину SIIPL", і, отже, можна зробити висновок, що бівалентна (тифозна і паратифозна) вакцина SIIPL здатна викликати імуногенна відповідь у мишачій моделі, що свідчить про її клінічний імуногенний потенціал.

Приклад 7: Набір вакцин з однократною дозою

А) Набір вакцин з однократною дозою, що складається з:

перший контейнер, що містить ліофілізовану (висушену сублімацією) імуногенну композицію:

- a) *Neisseria meningitidis* A сахарид - ТТ кон'югований антиген 5 мкг на 0,5 мл;
- b) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* C сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- 5 c) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* Y сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- d) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* W-135 сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- e) *Neisseria meningitidis* X сахарид - ТТ кон'югований антиген 5 мкг на 0,5 мл;
- f) сахароза 1-12 мг на 0,5 мл;
- 10 g) цитрат натрію (дигідрат) 0,1-2 мг на 0,5 мл;
- h) Трис-буфер 0,05-0,5 мг на 0,5 мл;
- i

другий контейнер, що містить рідку композицію для відновлення ліофілізованої (висушеною сублімацією) імуногенної композиції, що містить:

- a) *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген 1,25-50 мкг;
- 15 b) хлорид натрію 1-10 мг;
- c) Вода для ін'єкцій (WFI) q.s.;

Інтерпретація:

Відсутність антигенної інтерференції ViPs-TT з антигенами *Neisseria meningitidis*, для профілактики тифу, викликаного *Salmonella typhi* і антигенами *Neisseria meningitidis*, де зазначена вакцинна формула достатня для того, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi*, молодше 2 років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою тільки однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

В) Набір вакцин з однократною дозою, що складається з:

перший контейнер, що містить ліофілізовану (висушену сублімацією) імуногенну композицію:

- a) *Neisseria meningitidis* A сахарид - ТТ кон'югований антиген 5 мкг на 0,5 мл;
- b) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* C сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- c) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* Y сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- 30 d) кон'югований антиген *Neisseria meningitidis* W-135 сахарид - CRM197 5 мкг на 0,5 мл;
- e) *Neisseria meningitidis* X сахарид - ТТ кон'югований антиген 5 мкг на 0,5 мл;
- f) сахароза 1-12 мг на 0,5 мл;
- g) цитрат натрію (дигідрат) 0,1-2 мг на 0,5 мл;
- h) Трис-буфер 0,05-0,5 мг на 0,5 мл;
- i

35 другий контейнер, що містить рідку композицію для відновлення ліофілізованої (висушеною сублімацією) імуногенної композиції, що містить:

- a) *Salmonella enterica* серовар typhi ViPs-TT кон'югований антиген 1,25-50 мкг;
- b) *Salmonella enterica* серовар paratyphi A OSP-CP кон'югований антиген 1,25-50 мкг; де CP являє собою ТТ або DT або CRM197;
- 40 c) Хлорид натрію 1-10 мг;
- d) Вода для ін'єкцій (WFI) q.s.;

Інтерпретація:

Відсутність антигенної інтерференції ViPs-TT; OSP антигену з антигенами *Neisseria meningitidis*, для профілактики тифу та паратифів, викликаних *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* та антигенами *Neisseria meningitidis*, де зазначена вакцинна композиція достатня, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi* у дітей молодше 2 років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою всього однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

С) Набір вакцин з однократною дозою, що складається з:

перший контейнер, що містить повністю рідку шестивалентну імуногенну композицію:

- 50 a) інактивованний антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;
- b) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;
- c) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;
- 55 d) цілюноклітинний кашлюковий, (wP) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що містить один або декілька з модифікованої аденілатциклази, кашлюкового анатоксину (PT) 1-50 мкг, філаментозного гемаглютиніну 1-50 мкг, пертактину (P69 або PRN) 1-20 мкг або фімбріальних білків (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;
- 60 e) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;
i

другий контейнер, що містить повністю рідку імуногенну композицію, що містить:

a) *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT кон'югований антиген 1,25-50 мкг;

b) хлорид натрію 1-10 мг; та/або

c) трис-буфер або цитратний буфер або гістидиновий буфер або сукцинатний буфер 0,1 мг - 1,6 мг; та/або

d) полісорбат 20; та/або

e) 2-феноксіетанол 1-10 мг; та/або

f) Вода для ін'єкцій (WFI) q.s.

Інтерпретація:

Відсутність антигенної інтерференції ViPs-TT з імуногенною шестивалентною композицією для профілактики тифу, викликаного *Salmonella typhi* та шестивалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi*, у тому числі у дітей, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою тільки однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

D) Набір вакцини з однократною дозою, що складається з:

Першого контейнера, що містить повністю рідку шестивалентну імуногенну композицію:

a) інактивовані антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;

b) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

c) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

d) цілноклітинний кашлюковий, (wP) антиген у кількості від 1 до 50 МО на 0,5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що включає один або декілька з модифікованої аденілатциклази, коклюшного анатоксину (PT) 1-50 мкг, нітевідного) 1-50 мкг, пертактину (P69 або PRN) 1-20 мкг або фімбріальних білків (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5 мл;

e) поверхневий антиген вірусу гепатиту B (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

f) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

i

другий контейнер, що містить повністю рідку імуногенну композицію, що містить:

a) *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT кон'югований антиген 1,25-50 мкг;

b) *Salmonella enterica* серовар *paratyphi* A OSP-CP кон'югований антиген 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197;

c) хлорид натрію 1-10 мг; та/або

d) Трис-буфер або цитратний буфер або гістидиновий буфер або сукцинатний буфер 0,1 мг - 1,6 мг; та/або

g) полісорбат, вибраний з полісорбату 20; та/або

h) 2-феноксіетанол 1-10 мг; та/або

e) воду для ін'єкцій (WFI) q.s.

Інтерпретація:

Відсутність антигенної інтерференції ViPs-TT; OSP антигену з шестивалентними антигенами, для профілактики тифу та паратифу, викликаних *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* та шестивалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня для того, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi* та *paratyphi*, включаючи дітей у віці до 2 років, підлітків, дорослих та літніх людей, за допомогою всього однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

E) Набір вакцин з однократною дозою, що складається з:

першого контейнера, що містить повністю рідку семивалентну імуногенну композицію:

a) інактивовані антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;

b) інактивовані ротавірусний антиген, вибраний з CDC-9, CDC-66 або будь-яких інших інактивованих штамів ротавірусу, присутній у кількості від 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

c) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

d) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

e) цілноклітинний кашлюковий (wP) антиген у кількості від 1 до 50 IOU на 0,5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що включає один або декілька з модифікованої аденілатциклази, кашлюкового анатоксину (PT) 1-50 мкг, філаментозного гемаглютиніна 1-50

мкг, пертактину (P69 або PRN) 1-20 мкг або фімбріальних білків (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

f) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

5

i

другий контейнер, що містить повністю рідку імуногенну композицію, що містить:

a) *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT кон'югований антиген 1,25-50 мкг;

b) хлорид натрію 1-10 мг;

c) Вода для ін'єкцій (WFI) q.s.;

10

Інтерпретація:

де відсутня антигенна інтерференція ViPs-TT з імуногенною семивалентною композицією, для профілактики тифу, викликаного *Salmonella typhi* та семивалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi*, у тому числі у дітей років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою тільки однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

15

F) Набір вакцин з однократною дозою, що складається з:

першого контейнера, що містить повністю рідку шестивалентну імуногенну композицію:

a) інактивованний антиген вірусу поліомієліту (IPV), вибраний із штаму Sabin або Salk; де IPV типу 1 знаходиться у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), IPV типу 2 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU) або IPV типу 3 у дозі 1-50 одиниць D-антигену (DU), на 0,5 мл;

20

b) інактивованний ротавірусний антиген, вибраний з CDC-9, CDC-66 або будь-яких інших інактивованих штамів ротавірусу, присутній у кількості від 1 до 50 мкг на 0,5 мл;

c) дифтерійний анатоксин, (D) антиген у кількості від 1 до 50 Lf на 0,5 мл;

d) правцевий анатоксин, (T) антиген у кількості від 1 до 30 Lf на 0,5 мл;

25

e) цілноклітинний кашлюковий (wP) антиген у кількості від 1 до 50 IOU на 0,5 мл або ацелюлярний кашлюковий, (aP) антиген, що включає один або декілька з модифікованої аденілатциклази, кашлюкового анатоксину (PT) 1-50 мкг, філаментозного гемаглютиніну 1-50 мкг, пертактину (P69 або PRN) 1-20 мкг або фімбріальних білків (FIM 1, 2 та 3) 2-25 мкг; на 0,5мл;

30

f) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

g) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості від 1 до 20 мкг на 0,5 мл;

i

другий контейнер, що містить повністю рідку імуногенну композицію, що містить:

a) *Salmonella enterica* серовар *typhi* ViPs-TT кон'югований антиген 1,25-50 мкг;

35

b) *Salmonella enterica* серовар *paratyphi* A OSP-CP кон'югований антиген 1,25-50 мкг; де CP являє собою TT або DT або CRM197;

c) хлорид натрію 1-10 мг; та/або

d) трис-буфер або цитратний буфер або гістидиновий буфер або сукцинатний буфер 0,1 мг-1,6 мг; та/або

40

g) полісорбат, вибраний з полісорбату 20;

h) 2-феноксіетанол 1-10 мг; та/або

e) воду для ін'єкцій (WFI) q.s.

Інтерпретація:

Відсутність антигенної інтерференції ViPs-TT; OSP антигену з гептавалентними антигенами, для профілактики тифу та паратифів, викликаних *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* та гептавалентними антигенами, де зазначена вакцинна композиція достатня, щоб викликати необхідну Т-залежну імунну відповідь проти *S. typhi* та *paratyphi*, молодше 2 років, підлітків, дорослих і людей похилого віку за допомогою тільки однієї ін'єкції, щоб скласти повний графік вакцинації.

50

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Імуногенна композиція, в якій 0,5 мл композиції містить:

a) кон'югатний антиген полісахариду Vi *Salmonella enterica* серовару *typhi* з правцевим анатоксином (TT); та

55

b) кон'югатний антиген полісахариду OSP *Salmonella enterica* серовару *paratyphi* A з дифтерійним анатоксином (DT).

2. Імуногенна композиція за п. 1, в якій кожний з антигенів Vi-TT та OSP-DT присутній у кількості від 1,25 до 50 мкг.

3. Імуногенна композиція за п. 1 або 2, в якій композиція містить фармацевтично прийнятний буфер, вибраний з групи, що складається з хлориду натрію, ацетату, карбонату, цитрату, лактату, глюконату, тартрату, фосфатно-сольового буфера (PBS), борату, гістидинового буфера, сукцинатного буфера, HEPES, TRIS та цитратно-фосфатного буфера.
- 5 4. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-3, в якій композиція містить фармацевтично прийнятний допоміжний компонент, вибраний з групи, що складається з цукрів, поверхнево-активних речовин, полімерів, солей, амінокислот та модифікаторів pH.
5. Імуногенна композиція за п. 4, в якій цукри вибрані з групи, що складається з сахарози, манітолу, трегалози, манози, рафінози, лактитолу, лактобіонової кислоти, глюкози, мальтулози, ізомальтулози, мальтози, лактози, сорбітолу, декстрази, фруктози, гліцеролу та їх комбінації.
- 10 6. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-5, в якій, при введенні у вигляді одноразової дози, імуногенна композиція не містить консервантів.
7. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-5, в якій, при введенні у вигляді багатодозової композиції, імуногенна композиція містить один або більше консервантів, вибраних з групи, що складається з 2-феноксіетанолу, бензетонію хлориду (Phemerol), фенолу, тіомерсалу, формальдегіду, естерів парабенів (метил-, етил-, пропіл- або бутилпарабен), бензилового спирту, m-крезолу, бензалконію хлориду, хлорбутанолу та p-хлор-m-крезолу.
- 15 8. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-7, в якій композиція додатково містить ад'ювант, вибраний з групи, що складається з гідроксиду алюмінію, фосфату алюмінію, гідроксифосфату алюмінію, сульфату алюмінію калію та їх суміші.
- 20 9. Імуногенна композиція за п. 1, в якій 0,5 мл композиції містить:
- a) кон'югатний антиген ViPs-TT *Salmonella enterica* серовару *typhi* у кількості 1,25-50 мкг;
- b) кон'югатний антиген OSP-DT *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* у кількості 1,25-50 мкг;
- 25 c) хлорид натрію у кількості 1-10 мг; та
- d) воду для ін'єкцій у кількості, достатній для доведення об'єму композиції до 0,5 мл.
10. Імуногенна композиція за п. 1, в якій 0,5 мл композиції містить:
- a) кон'югатний антиген ViPs-TT *Salmonella enterica* серовару *typhi* у кількості 1,25-50 мкг;
- b) кон'югатний антиген OSP-DT *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* у кількості 1,25-50 мкг;
- 30 c) хлорид натрію у кількості 1-10 мг;
- d) 2-феноксіетанол у кількості 1-10 мг; та
- e) воду для ін'єкцій у кількості, достатній для доведення об'єму композиції до 0,5 мл.
11. Імуногенна композиція за п. 1, в якій 0,5 мл композиції містить:
- a) кон'югатний антиген ViPs-TT *Salmonella enterica* серовару *typhi* у кількості 1,25-50 мкг;
- b) кон'югатний антиген OSP-DT *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* у кількості 1,25-50 мкг;
- 35 c) хлорид натрію у кількості 1-10 мг;
- d) TRIS-буфер, цитратний буфер, гістидиновий буфер або сукцинатний буфер у кількості 0,1-1,6 мг;
- e) полісорбат, вибраний з полісорбату-20, полісорбату-40, полісорбату-60, полісорбату-65, полісорбату-80, полісорбату-85, нонілфеноксіполіетоксіетанолу, октилфеноксіполіетоксіетанолу, октоксинолу-40, ноноксинолу-9, триетаноламіну, поліпептидного олеату триетаноламіну, поліоксіетилену-660 гідроксистеарату, поліоксіетилену-35 рицинолеату, соєвого лецитину та полоксамеру, у кількості 25-500 мкг; та
- 40 f) воду для ін'єкцій у кількості, достатній для доведення об'єму композиції до 0,5 мл.
12. Імуногенна композиція за п. 1, в якій 0,5 мл композиції містить:
- 45 a) кон'югатний антиген ViPs-TT *Salmonella enterica* серовару *typhi* у кількості 1,25-50 мкг;
- b) кон'югатний антиген OSP-DT *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* у кількості 1,25-50 мкг;
- c) хлорид натрію у кількості 1-10 мг;
- d) TRIS-буфер, цитратний буфер, гістидиновий буфер або сукцинатний буфер у кількості 0,1-1,6 мг;
- 50 e) полісорбат, як визначено у п. 11, у кількості 25-500 мкг;
- f) 2-феноксіетанол у кількості 1-10 мг; та
- g) воду для ін'єкцій у кількості, достатній для доведення об'єму композиції до 0,5 мл.
13. Імуногенна композиція за п. 1, в якій 0,5 мл композиції містить:
- 55 a) кон'югатний антиген ViPs-TT *Salmonella enterica* серовару *typhi* у кількості 1,25-50 мкг;
- b) кон'югатний антиген OSP-DT *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* у кількості 1,25-50 мкг;
- c) хлорид натрію у кількості 1-10 мг;
- d) TRIS-буфер, цитратний буфер, гістидиновий буфер або сукцинатний буфер у кількості 0,1-1,6 мг;
- 60 e) полісорбат, як визначено у п. 11, у кількості 25-500 мкг;
- f) сахарозу у кількості 2,5-25 мг; та

g) воду для ін'єкцій у кількості, достатній для доведення об'єму композиції до 0,5 мл.

14. Імуногенна композиція за п. 1, в якій 0,5 мл композиції містить:

a) кон'югатний антиген ViPs-TT *Salmonella enterica* серовару *typhi* у кількості 1,25-50 мкг;

b) кон'югатний антиген OSP-DT *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* у кількості 1,25-50 мкг;

5 c) хлорид натрію у кількості 1-10 мг;

d) TRIS-буфер, цитратний буфер, гістидиновий буфер або сукцинатний буфер у кількості 0,1-1,6 мг;

e) полісорбат, як визначено у п. 11, у кількості 25-500 мкг;

f) сахарозу у кількості 2,5-25 мг;

10 g) 2-феноксіетанол у кількості 1-10 мг; та

h) воду для ін'єкцій у кількості, достатній для доведення об'єму композиції до 0,5 мл.

15. Спосіб одержання кон'югата полісахариду Vi *Salmonella enterica* серовару *typhi* з правцевим анатоксином (TT) для імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-14, який включає:

a) культивування у режимі fed-batch з метою одержання високоврожайного збору капсульного Vi-полісахариду (ViPs) *Salmonella typhi*, при цьому використання під час культивування комбінації антипінного агента, соєвого пептону в діапазоні 40-70 г/л та дріжджового екстракту в діапазоні 40-70 г/л забезпечує підвищений вихід продукту (100-700 мг/л), а параметри ферментації включають підтримання pH у діапазоні 6,7-7,1, температури у діапазоні 34,0-38,0 °C, рівня розчиненого кисню в межах 36-39 %, інтенсивності перемішування в межах 150-500 об./хв та осмоляльності 400-600 мОсмоль/кг;

b) очищення капсульного ViPs *Salmonella typhi* шляхом обробки аніонним детергентом, включаючи додецилсульфат натрію (SDS) у концентрації менше 2 %, та катіонним детергентом, включаючи CTAB, етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA) у концентрації 4-10 мМ, ацетат натрію у концентрації 5-10 %, осадження спиртом у концентрації 30-60 %, а також концентрування та діалізацію з використанням мембран з порогом відсікання 30 кДа на різних стадіях, при цьому процес забезпечує зниження рівня ендотоксинів (<100 EU ендотоксину на 1 мкг полісахариду), білкових домішок (<1 %) та нуклеїнових кислот (<2 %), вихід капсульного полісахариду в діапазоні 40-65 %, рівень О-ацетилювання (>2,0 ммоль/г полісахариду), вихід очищеного Vi-полісахариду в діапазоні 100-4000 мг/л, розподіл молекулярних розмірів (>50 % полісахариду елюється до досягнення коефіцієнта розподілу (KD) 0,25) та середню молекулярну масу очищеного Vi-полісахариду в діапазоні 40-400 кДа;

c) кон'югацію очищеного ViPs з правцевим анатоксином (TT) з використанням карбодііміду, відновного амінування або реакції ціанування; та

d) очищення кон'югата ViPs-правцевий анатоксин (TT) за допомогою гель-фільтраційної хроматографії або ультрафільтрації, при якій об'єм кон'югата концентрують щонайменше у 3 рази та практично повністю видаляють усі непрореаговані сполуки, некон'юговані полісахариди та некон'юговані білки, з одержанням очищеної вакцини на основі кон'югата Vi-полісахариду з розміром у межах 1000-1500 кДа, при цьому вихід кон'югата становить ≥50 %.

16. Спосіб за п. 15, за яким перед кон'югацією ViPs піддають деполімеризації/регулюванню розміру хімічними засобами, вибраними з групи, що складається з FeCl₃, H₂O₂, метаперіодату натрію та ацетату натрію, або механічними засобами, вибраними з групи, що складається з високотискового руйнування клітин, гомогенізатора та ультразвукової обробки; та за яким перед кон'югацією полісахарид та/або правцевий анатоксин (TT) дериватизують гетеро- або гомобіфункціональним лінкером, вибраним з групи, що складається з гідразину, карбогідразиду, гідразинхлориду, дигідразиду, ε-аміногексанової кислоти, хлоргексанолу диметилацеталу, D-глюкуронолактону, цистаміну, p-нітрофенілетиламіну, гександіаміну, етилендіаміну, 1,6-діамінооксигексану, β-пропінаміду, нітрофенілетиламіну, галогеноалкілгалогеніду та 6-амінокапронової кислоти, з використанням карбодіімідної реакції, відновного амінування або реакції ціанування.

17. Спосіб за п. 16, за яким очищений ViPs ковалентно зв'язують з правцевим анатоксином (TT) з використанням карбодіімідної реакції кон'югації у присутності 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDAC), змішаного у співвідношенні 1:0,5-1:2 за масою ViPs:EDAC, при цьому співвідношення Vi-полісахариду і білка-носія становить від 0,5 до 1,5, де співвідношення ViPs:CP:EDAC становить 1:1:2 або 1:0,9:2, або 1:0,8:1,8, або 1:0,7:1,8, а реакцію проводять при pH у діапазоні 5-7 та температурі у діапазоні від 2 до 30 °C; та за яким перед кон'югацією правцевий анатоксин (TT) дериватизують лінкером дигідразиду адипінової кислоти (ADH) у присутності EDAC з тривалістю реакції 1 година, яку проводять при pH у діапазоні 5-7.

18. Спосіб одержання кон'югата полісахариду OSP *Salmonella enterica* серовару *paratyphi A* з дифтерійним анатоксином (DT) для імуногенної композиції за будь-яким з пп. 1-14, який включає:

а) очищення О-специфічного полісахариду (OSP) ліпополісахариду (LPS) *Salmonella Paratyphi A* шляхом кислотного гідролізу LPS з використанням оцтової кислоти (кінцева концентрація 0,5-5 %) при рН приблизно 2,0-3,0 з подальшою нейтралізацією до рН 7,0 водним аміаком, застосуванням дезоксихолату натрію (кінцева концентрація 0,5-5 %), а також концентруванням та діалізацією з використанням мембран з порогом відсікання 10-30 кДа на різних стадіях, при цьому процес забезпечує зниження рівня ендотоксинів (<100 EU ендотоксину на 1 мкг полісахариду), білкових домішок (<1 %) та нуклеїнових кислот (<2 %), вихід полісахариду в діапазоні 40-65 %, рівень О-ацетилювання (>2,0 ммоль/г полісахариду), розподіл молекулярних розмірів (>50 % полісахариду елюється до досягнення коефіцієнта розподілу (KD) 0,25) та середню молекулярну масу очищеного OSP у діапазоні 40-400 кДа;

б) кон'югацію очищеного OSP з дифтерійним анатоксином (DT) з використанням карбодіїмідної реакції, відновного амінування або реакції ціанування; та

с) очищення кон'югата OSP-дифтерійний анатоксин (DT) за допомогою гел'фільтраційної хроматографії або ультрафільтрації, при якій об'єм кон'югата концентрують щонайменше у 3 рази та практично повністю видаляють усі непрореаговані сполуки, некон'юговані полісахариди та некон'юговані білки, з одержанням очищеної вакцини на основі кон'югата OSP-DT, при цьому вихід кон'югата становить ≥ 50 %.

19. Спосіб за п. 18, за яким перед кон'югацією OSP піддають деполімеризації/регулюванню розміру хімічними засобами, вибраними з групи, що складається з FeCl_3 , H_2O_2 , метаперіодату натрію та ацетату натрію, або механічними засобами, вибраними з групи, що складається з високотискового руйнування клітин, ультразвукової обробки та гомогенізатора; та за яким перед кон'югацією дифтерійний анатоксин (DT) дериватизують гетеро- або гомобіфункціональним лінкером, вибраним з групи, що складається з гідразину, карбогідразиду, гідразинхлориду, дигідразиду, ϵ -аміногексанової кислоти, хлоргексанолу диметилацеталу, D-глюкуронолактону, цистаміну, р-нітрофенілетиламіну, гександіаміну, етилендіаміну, 1,6-діамінооксигексану, β -пропінаміду, нітрофенілетиламіну, галогеноалкілгалогеніду та 6-амінокапронової кислоти, з використанням карбодіїмідної реакції, відновного амінування або реакції ціанування; та/або за яким перед кон'югацією OSP дериватизують гетеро- або гомобіфункціональним лінкером, вибраним з групи, що складається з гідразину, карбогідразиду, гідразинхлориду, дигідразиду, ϵ -аміногексанової кислоти, хлоргексанолу диметилацеталу, D-глюкуронолактону, цистаміну, р-нітрофенілетиламіну, гександіаміну, етилендіаміну, 1,6-діамінооксигексану, β -пропінаміду, нітрофенілетиламіну, галогеноалкілгалогеніду та 6-амінокапронової кислоти, з використанням карбодіїмідної реакції, відновного амінування або реакції ціанування.

20. Спосіб за п. 18, за яким очищений OSP ковалентно зв'язують з дифтерійним анатоксином (DT) з використанням хімії кон'югації шляхом ціанування, при цьому реагент для ціанування вибраний з групи, що складається з 1-ціано-4-піролідінопіридинію тетрафтороборату (CPPT) (CPIP), 1-ціано-імідазолу (1-CI), 1-ціанобензотриазолу (1-CBT), 1-ціано-4-(диметиламіно)-піридинію тетрафтороборату (CDAP), р-нітрофенілціанату, N-ціанотріетиламонію тетрафтороборату (CTEA) та 2-ціанопіридазин-3(2H)-ону (2-CPO).

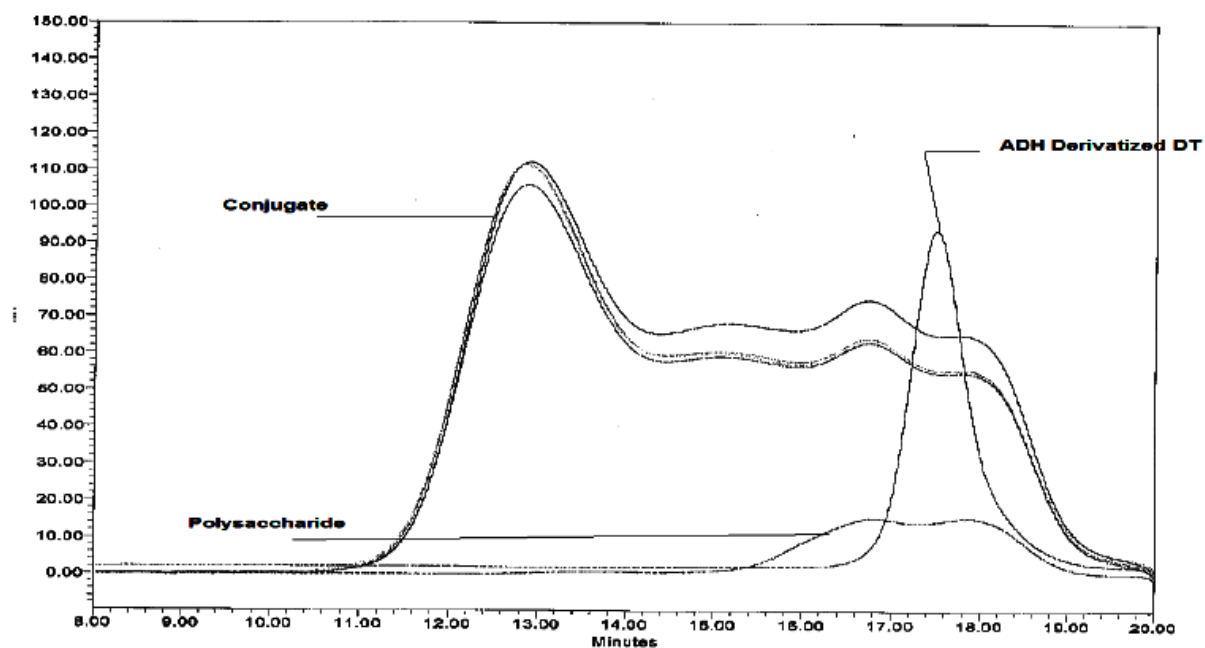
21. Спосіб за п. 18, за яким очищений OSP ковалентно зв'язують з дифтерійним анатоксином (DT) з використанням хімії кон'югації шляхом ціанування, при цьому реагентом для ціанування є CPPT, змішаний у співвідношенні 1:0,5-1:2 за масою OSP:CPPT, а співвідношення OSP та дифтерійного анатоксину (DT) становить від 0,5 до 1,5, і реакцію проводять при рН у діапазоні 5-7 та температурі у діапазоні від 2 до 30 °C.

22. Спосіб за будь-яким з пп. 18-21, за яким перед кон'югацією дифтерійний анатоксин (DT) дериватизують лінкером дигідразиду адипінової кислоти (ADH) у присутності карбодіїмиду, включаючи EDAC, змішаного у співвідношенні 1:1-1:10 за масою OSP:ADH, при цьому співвідношення OSP:EDAC становить від 0,5 до 1,5, а реакцію проводять при рН у діапазоні 5-7 протягом 1-2 годин при температурі у діапазоні від 2 до 30 °C.

23. Спосіб за п. 18, за яким очищений OSP ковалентно зв'язують з дифтерійним анатоксином (DT) з використанням карбодіїмідної реакції кон'югації у присутності 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмиду (EDAC), змішаного у співвідношенні 1:0,5-1:2 за масою OSP:EDAC, при цьому співвідношення OSP-полісахариду та дифтерійного анатоксину (DT) становить від 0,5 до 1,5, а реакцію проводять при рН у діапазоні 5-7 та температурі у діапазоні від 2 до 30 °C.

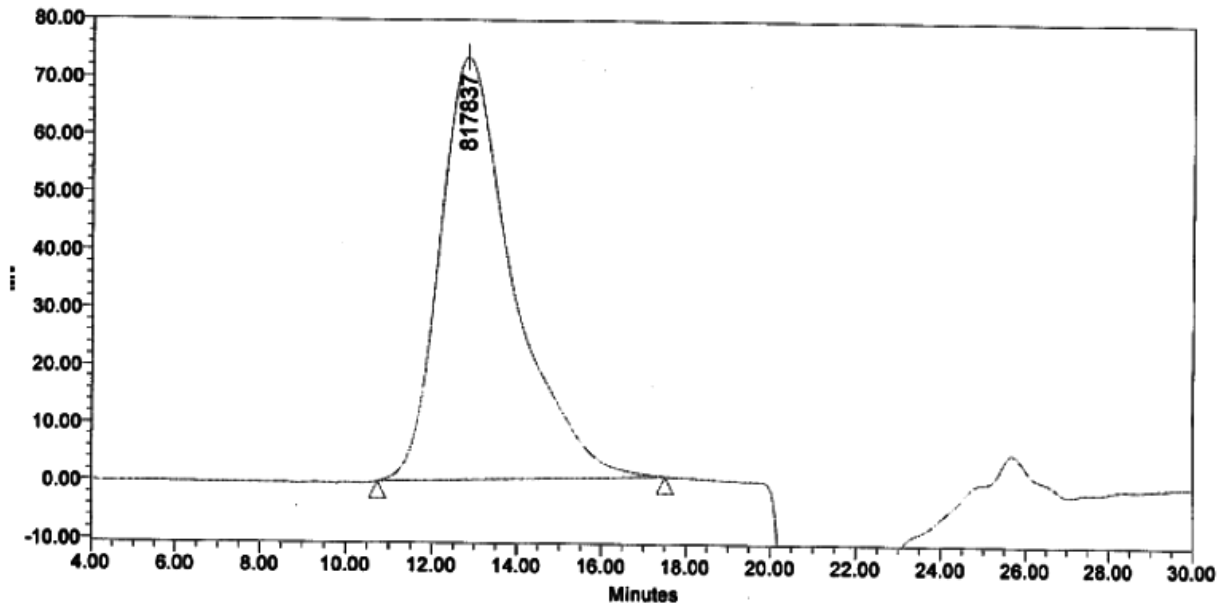
24. Спосіб за п. 23, за яким перед кон'югацією OSP дериватизують лінкером дигідразиду адипінової кислоти (ADH) з використанням хімії кон'югації шляхом ціанування, при цьому реагент для ціанування вибраний з групи, що складається з CPPT (CPIP), 1-CI, 1-CBT, CDAP, р-нітрофенілціанату, CTEA та 2-CPO.

25. Спосіб за п. 24, за яким перед кон'югацією OSP дериватизують лінкером дигідрозиду адипінової кислоти (ADH) з використанням хімії кон'югації шляхом ціанування, при цьому реагентом для ціанування є CPPT (CPIP), змішаний у співвідношенні 1:1-1:10 за масою OSP:ADH, а співвідношення OSP:CPPT становить від 0,5 до 1,5, і реакцію проводять при рН у діапазоні 7-10 протягом 1-2 годин при температурі у діапазоні від 2 до 30 °С.
26. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-14, яка є стабільною при 2-8, 25 та 40 °С протягом періоду понад шість місяців.
27. Імуногенна композиція за п. 26, в якій після 6 місяців вміст вільного полісахариду становить не більше 7,5 % для полісахариду з молекулярною масою 180-220 кДа та не більше 10,5 % для полісахаридів з молекулярною масою 388, 80 та 45 кДа.



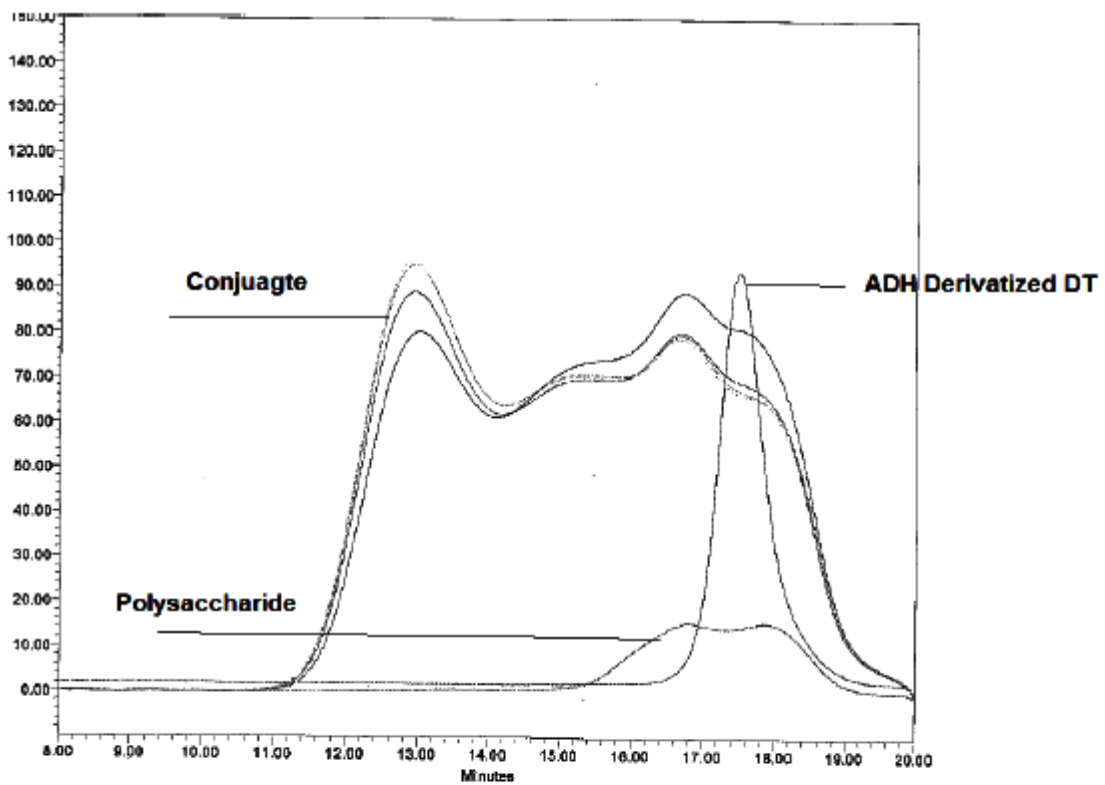
Хроматограма порівняння очищеного полісахариду, білку та прогрес процесу кон'югації (PS:PR:CPPT: 1:0,8:1,3)

Fig. 1



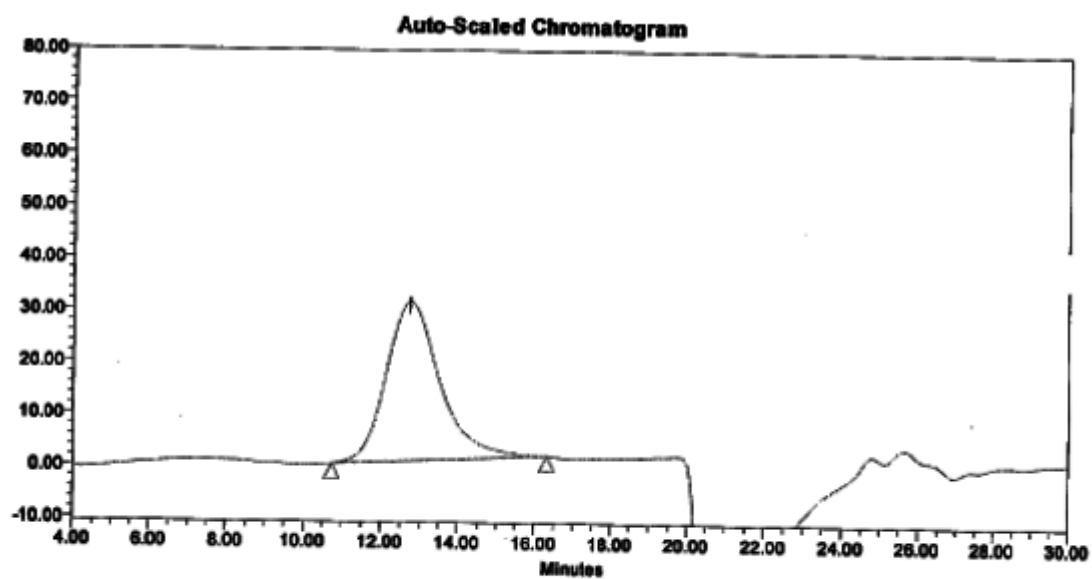
Хроматограма GFC очищеного OSP-DT ADH кон'югата (PS:PR:CIP: 1:0,8:1,3)

Fig. 2



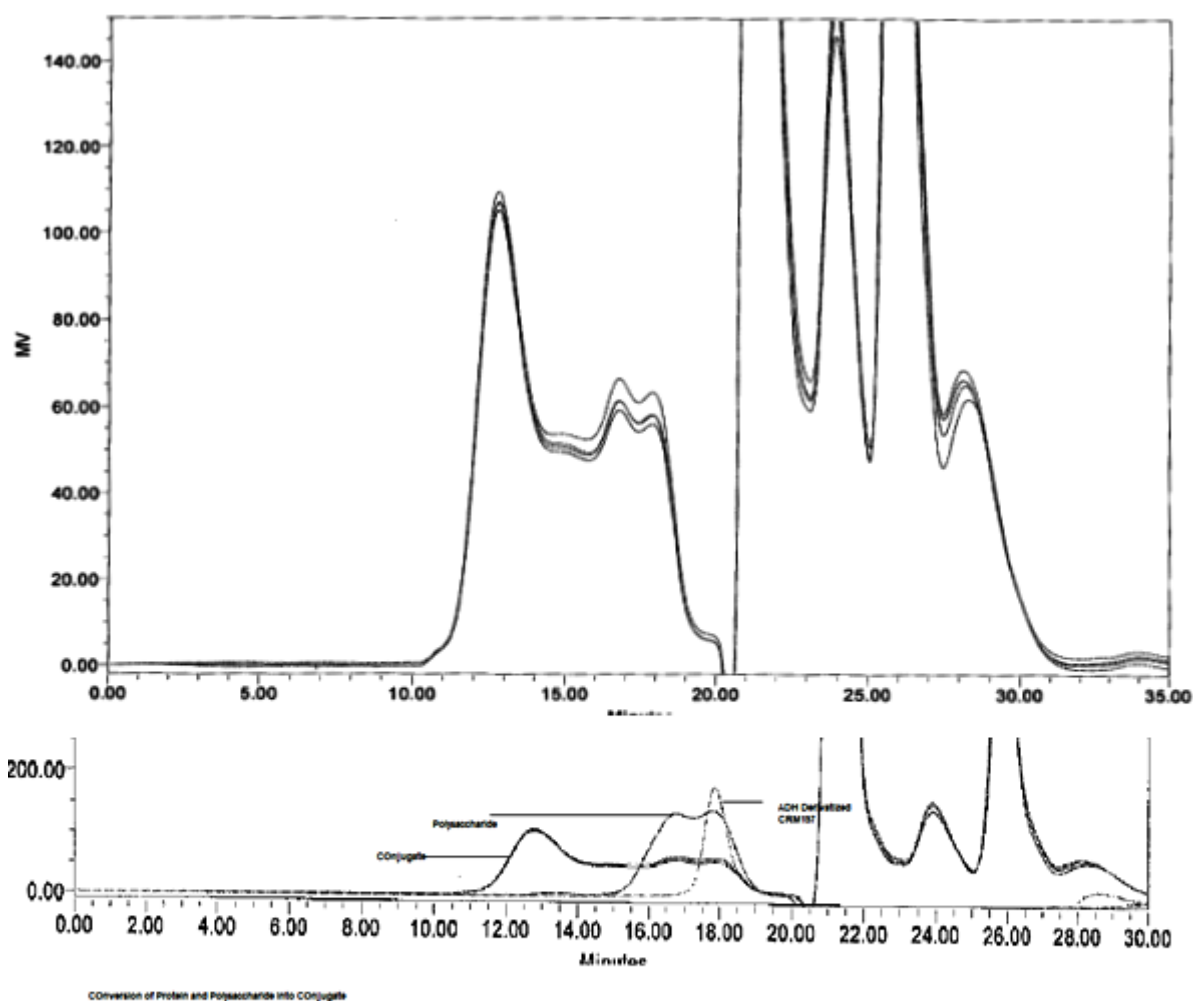
Хроматограма порівняння очищеного полісахариду, білку та прогрес процесу кон'югації (PS:PR:CIP: 1:0,8:1,3)

Fig. 3



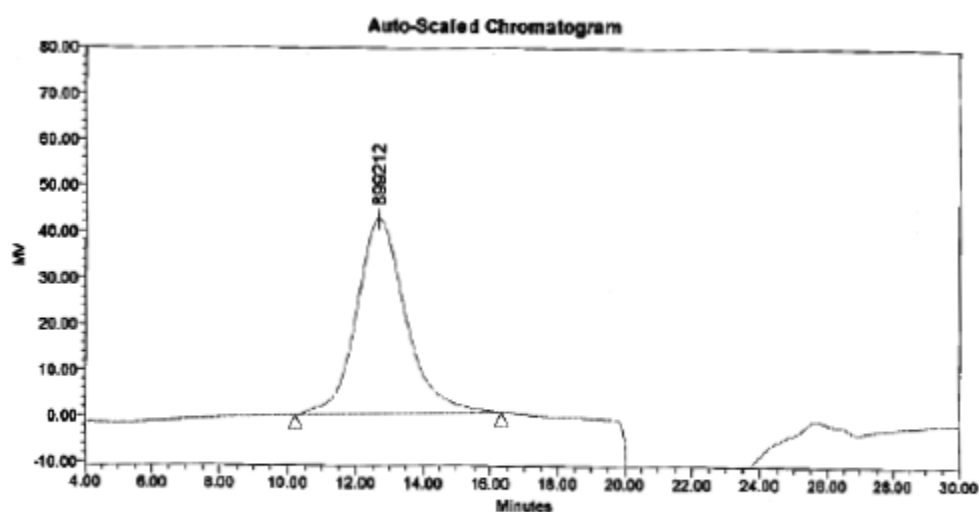
Хроматограма GFC очищеного OSP-DT ADH кон'югата (PS-PR-CPIP: 1:0,8:1,1)

Фиг. 4



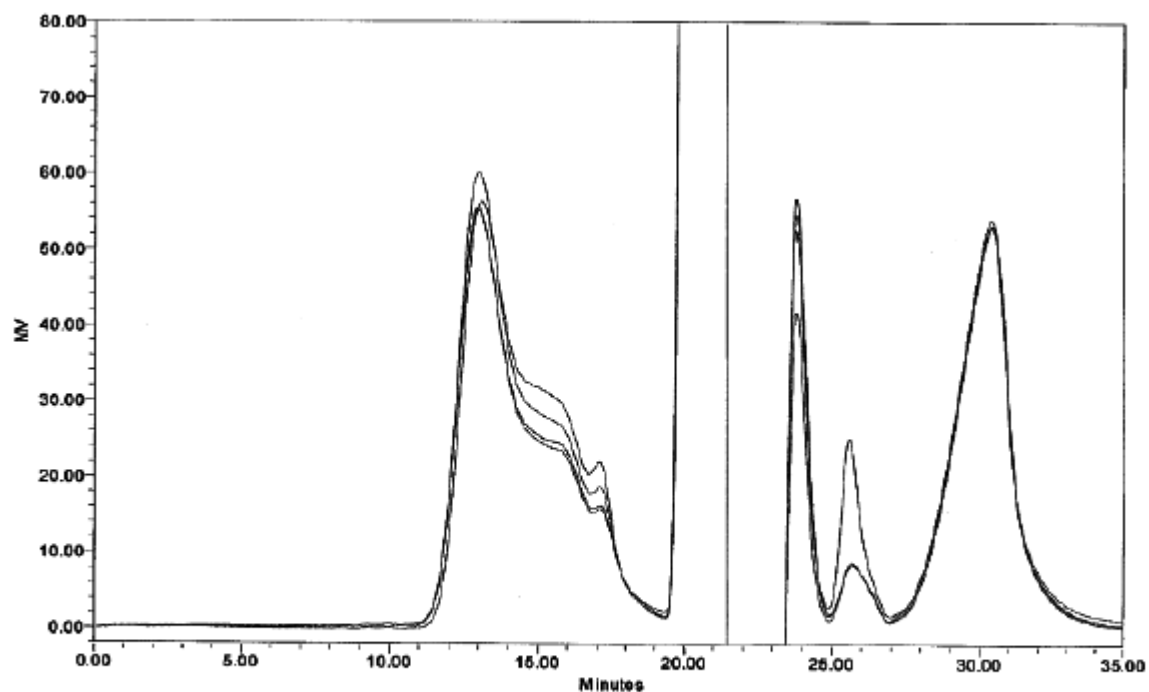
Хроматограма порівняння очищеного полісахариду, білку та прогрес процесу кон'югації (PS:PR:CPIP: 1:1:1,3)

Фігура 5 і 6



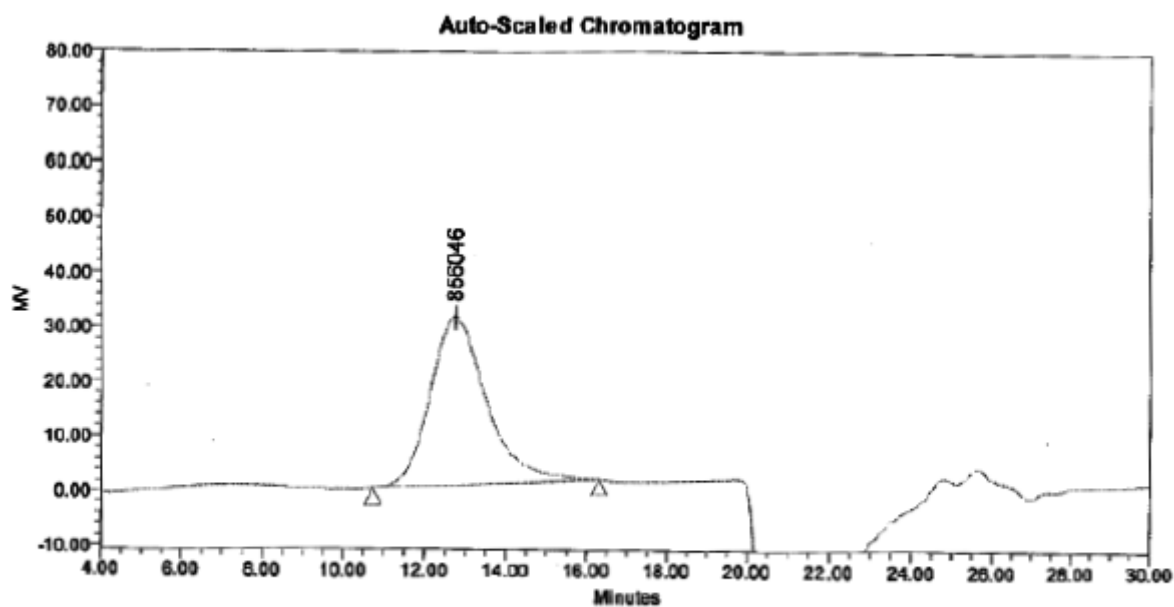
Хроматограма GFC очищеного OSP-DT ADH кон'югата (PS:PR:CPIP: 1:1:1,3)

Фіг. 7



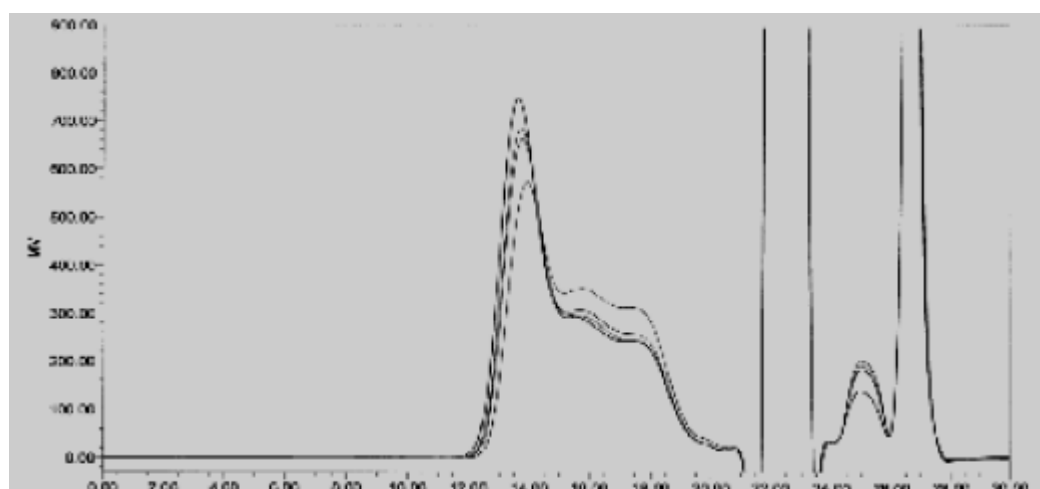
Хроматограма, що відображує прогрес кон'югації (PS:PR:CIP: 1:0,8:1,25)

Фиг. 8



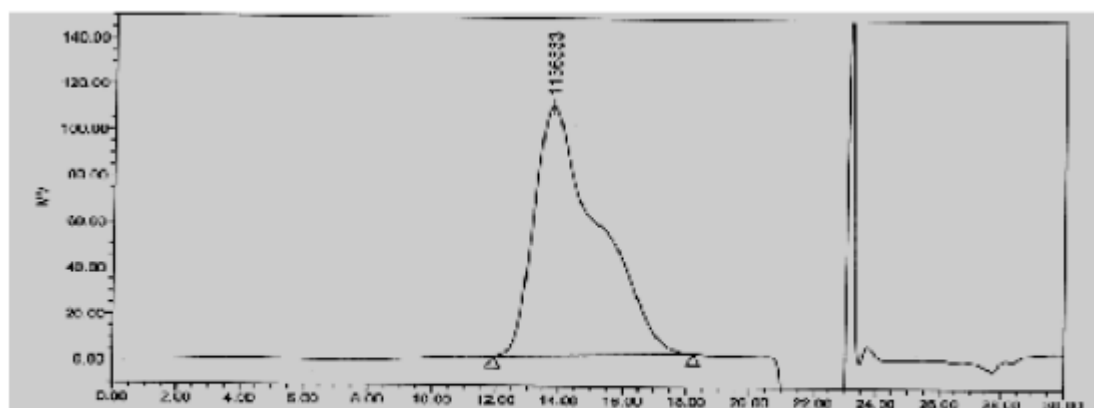
Хроматограма GFC очищеного OSP-DT АДН кон'югата (PS:PR:CIP: 1:0,8:1,25)

Фиг. 9



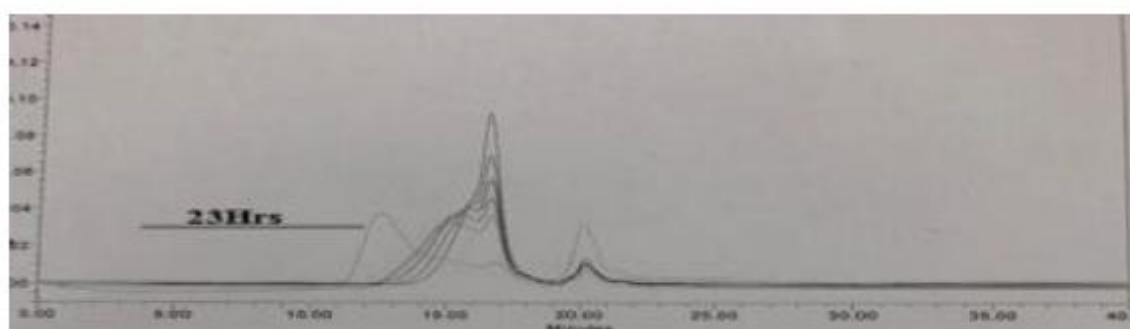
Хроматограма, що відображує прогрес кон'югації (PS:PR:CIP: 1:0,9:1,3)

Fig. 10



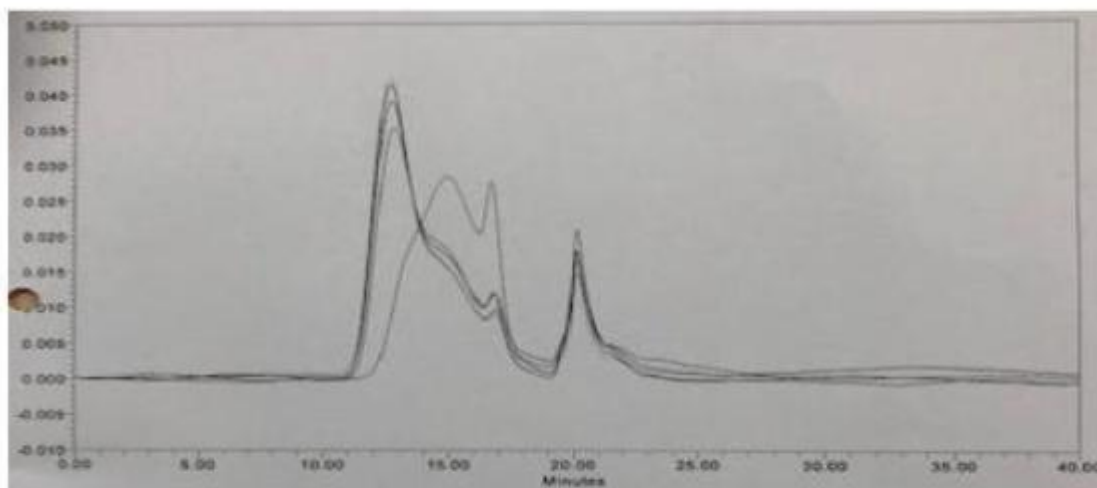
Хроматограма GFC очищеного OSP-DT ADH кон'югата (PS:PR:CIP: 1:0,9:1,3)

Fig. 11

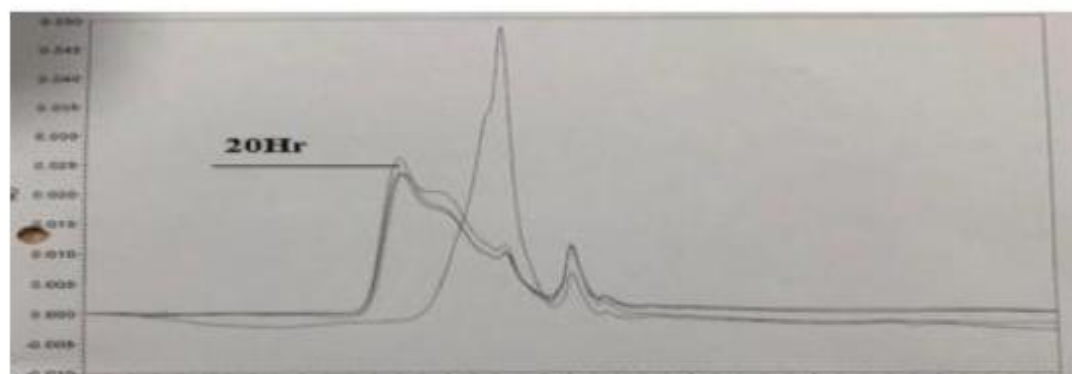


Хроматограма, що відображує прогрес реакції кон'югації (гасіння реакційної суміші при 23 год)

Fig. 12

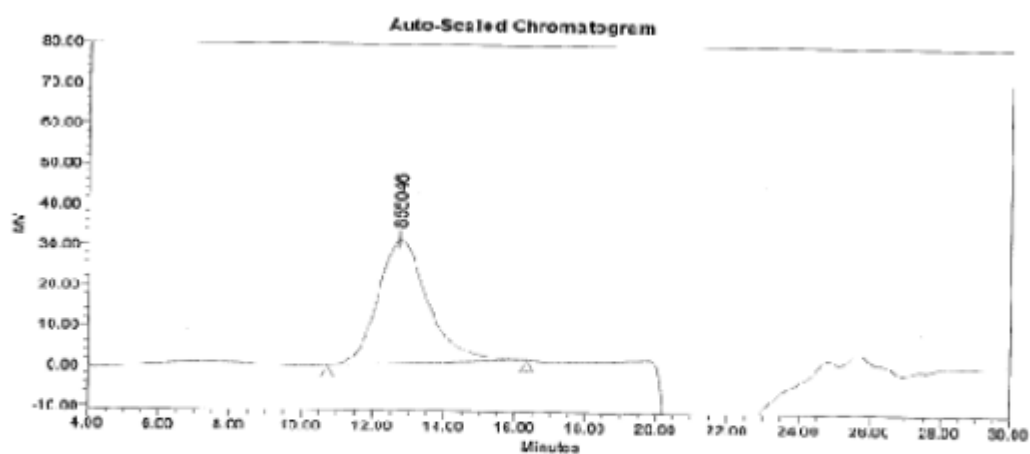


Хроматограма, що відображує прогрес реакції кон'югації
Fig. 13



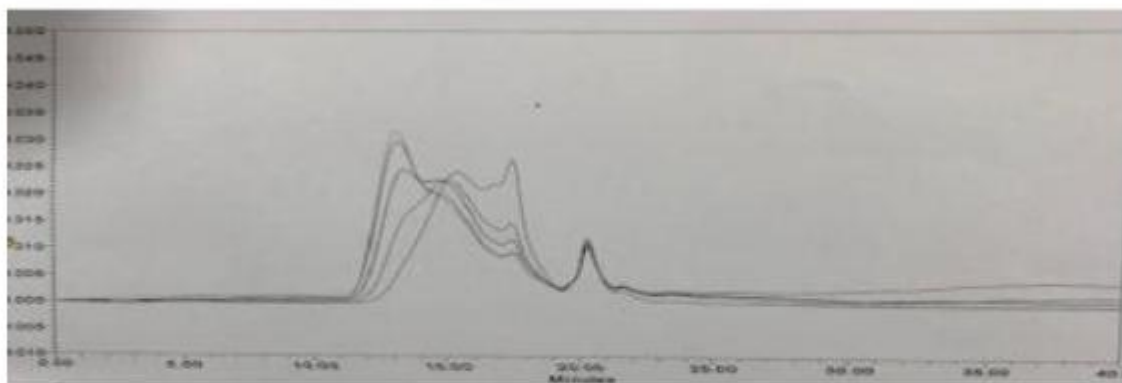
Хроматограма, що відображує прогрес реакції кон'югації (гасіння реакційної суміші
при 20 год)

Fig. 14



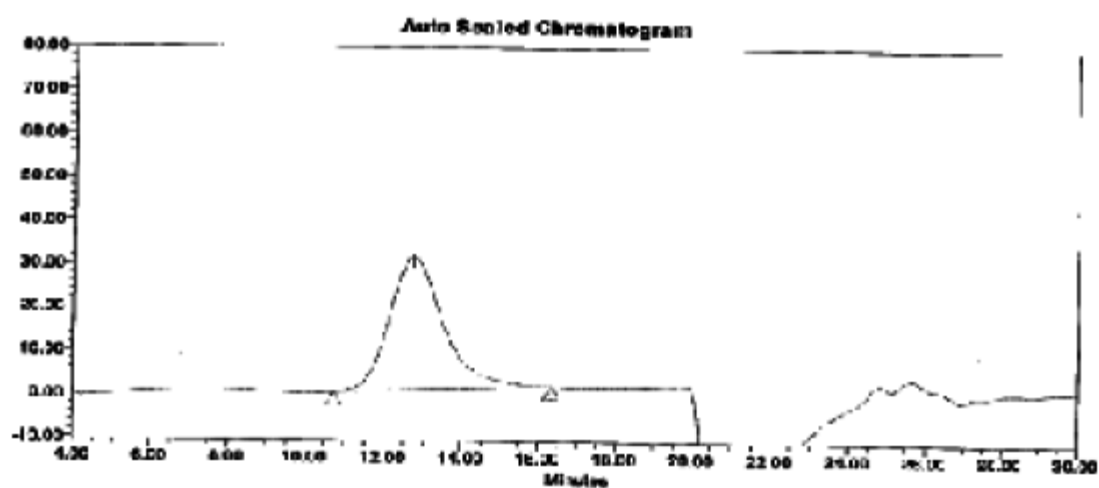
Хроматограма, що відображує очищений кон'югат (об'єднані фракції)

Fig. 15



Хроматограма, що відображує прогрес реакції кон'югації (гасіння реакційної суміші при 14 год)

Fig. 16



Хроматограма, що відображує очищений кон'югат

Fig. 17