



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **130797** (13) **C2**

(51) МПК (2026.01)

A61K 39/00

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/13 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61P 31/00

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2021 02398**
(22) Дата подання заявки: **04.10.2019**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **21.05.2026**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **201821038850**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **12.10.2018**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **IN**
(41) Публікація відомостей про заявку: **23.06.2021, Бюл.№ 25**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **20.05.2026, Бюл.№ 20**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/IN2019/050737, 04.10.2019**

(72) Винахідник(и):
**Шарма Індер Джіт (IN),
Ракеш Кумар (IN),
Кілвані Яганатан Сембураккіаннан (IN),
Доддапанені Манохар (IN),
Шітоле Аніл В'янкатрао (IN)**
(73) Володілець (володільці):
**СІРЕМ ІНСТІТЮТ ОФ ІНДІА ПРАЙВЕТ
ЛТД,
212/2, Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar,
Pune, Maharashtra 411 028, India (IN)**
(74) Представник:
**Могилевський Валентин Михайлович,
реєстр. № 13**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2017/048038 A1, 23.03.2017
WO 2010/046934 A1, 29.04.2010
WO 2012/093406 A2, 12.07.2012
US 6790445 B1, 14.09.2004
US 2004/258700 A1, 23.12.2004
MARTA C NUNES et al. Review of a new fully liquid, hexavalent vaccine: Hexaxim, EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 13, no. 4, 27.02.2013, ASHLEY, LONDON; GB, pages 575 - 593
BRICKLEY ELIZABETH B et al. Maximising the impact of inactivated polio vaccines, LANCET INFECTIOUS DISEASES, ELSEVIER LTD, US, vol. 17, no. 7, 25.04.2017, pages 680 - 681
KUTUB MAHMOOD et al. Hexavalent IPV-based combination vaccines for public-sector markets of low-resource countries, HUMAN VACCINES AND IMMUNOTHERAPEUTICS, vol. 9, no. 9, 19.09.2013, US, pages 1894 - 1902

(54) КОМБІНОВАНА ВАКЦИННА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО МІСТИТЬ ЗНИЖЕНУ ДОЗУ ІНАКТИВОВАНОГО ПОЛІОВІРУСУ, ТА СПОСІБ ЇЇ ОДЕРЖАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується повністю рідкої імуногенної композиції, що містить комбінацію антигенів/імуногенів. Імуногенна композиція містить оптимальну кількість антигенів/імуногенів

UA 130797 C2

для надання захисту від низки захворювань. Композиція виявляє імуногенність та стабільність. Також винахід стосується способу одержання композиції вакцини.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід стосується галузі біотехнології, більш конкретно, воно стосується способу одержання комбінованої багатодозової вакцинної композиції, що містить групу антигенів/імуногенів та консервант. Даний винахід додатково стосується вдосконаленої методології у галузі виробництва комбінованих вакцин.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Комбінована вакцина, яка може забезпечити імуногенність проти великої кількості захворювань, завжди має переваги порівняно з однокомпонентною вакциною, оскільки зменшує кількість зроблених уколів, зменшує ускладнення, пов'язані з багаторазовими внутрішньом'язовими ін'єкціями, зменшує витрати на введення та виробництво, зменшує витрати на запас, зменшує ризик відкладених або пропущених вакцинацій та покращує прихильність пацієнта до лікування за рахунок зменшення кількості окремих вакцинацій. Більше того, повністю рідкі препарати комбінованої вакцини мають суттєві переваги перед тими, які потребують відновлення. Встановлено, що середній час одержання для повністю рідкої вакцини становить майже половину часу, потрібного для одержання не повністю рідкої вакцини. Майже весь медичний персонал (97,6 %) зазначив, що віддав би перевагу використанню повністю рідкої вакцини у своїй щоденній практиці. (Посилання: Soubeyrand B, et al; Assessment of preparation time with fully-liquid versus non-fully liquid paediatric hexavalent vaccines. A time and motion study; Vaccine 2015; 33:3976-82). Відомі та доступні на сьогоднішній день комбіновані вакцини можуть не містити відповідних рецептур відповідних антигенів у відповідних імуногенних формах для досягнення бажаних рівнів безпеки, ефективності та імуногенності у сприйнятливій людській популяції для низки захворювань одним введенням.

Кількість різних комбінацій вакцин, які можна створити лише за допомогою декількох додаткових антигенів, є значною. Додаючи від 1 до 4 інших компонентів антигену (наприклад, Hib (ліюфілізований або рідкий), HBV, IPV, HAV) до DTaP або DTwP, можна створити 44 можливі різні комбінації вакцин. Кількість зросла б до тисяч, якщо врахувати окремі компоненти різних виробників. Оскільки кожна окрема нова комбінована вакцина (з урахуванням відмінностей у компонентах відповідно до джерела) повинна розроблятися індивідуально, щоб продемонструвати безпеку, стабільність, сумісність та ефективність, розробка всіх цих вакцин стає складним завданням.

Антигени комбінованої вакцини:

Антигени дифтерії та правця

Дифтерія та правець - це гострі інфекції, спричинені *Corynebacterium diphtheriae* та *Clostridium tetani*, відповідно. В обох випадках саме потужний екзотоксин цих бактерій відповідає за клінічне захворювання. Вакцини, що забезпечують захист від цих бактерій, містять токсини, які хімічно модифіковані, утворюючи анатоксини, хімічно модифіковані токсини, які вже не є токсичними, але все ще є антигенними. Дифтерійний та правцевий токсини виробляються зростанням *Corynebacterium diphtheriae* та *Clostridium tetani* у середовищі, що містить бичачий екстракт. Токсини інактивуються за допомогою наступної обробки, яка включає нагрівання, УФ, формалін/формальдегід, глутаральдегід, ацетилетиленімін та ін. для одержання анатоксинів [Дифтерійний анатоксин (D) та правцевий анатоксин (T)]. Занепокоювання щодо спонгіформної енцефалопатії великої рогатої худоби (BSE), трансмісивної спонгіформної енцефалопатії (TSE), хвороби Крейтцфельда - Якоба (CJD та різновиди CJD) можуть виникати через компоненти тваринного походження, що використовуються в середовищі росту, що містить екстракт великої рогатої худоби, що поширюється через вакцину. (посилання: WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation-Biological and Pharmaceutical Products; 2003 & EMEA/CPMP/BWP/819/01; 24 April 2001).

Антигени кашлюку

Введення цільноклітинних вакцин, що складаються з хімічно та інактивованих нагріванням організмів *Bordetella pertussis*, у 1940-х рр. спричинило різке зменшення зустрічності кашлюку, спричиненого *B. pertussis*. Цільноклітинні DTP-вакцини зазвичай асоціюються з декількома місцевими побічними явищами (наприклад, еритемою, набряком та болем у місці ін'єкції), лихоманкою та іншими легкими системними подіями (наприклад, сонливістю, роздратованістю та анорексією) (Посилання: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. Paediatrics 1981; 68:650-60) & (Ref: Long SS, DeForest A, Penridge Pediatric Associates, et al. Longitudinal study of adverse reactions following Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in infancy. Paediatrics 1990; 85:294-302). Більш тяжкі системні події (наприклад, судомні {з лихоманкою або без них} та гіпотонічні гіпореактивні епізоди) трапляються рідше (співвідношення одного випадку до 1750 введених доз) серед дітей, які одержують

цільноклітинну DTP-вакцину (Посилання: Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children. *Paediatrics* 1981; 68:650-60). Гостра енцефалопатія виникає ще рідше (співвідношення 0-10,5 випадків на один мільйон введених доз). Експерти дійсно сходяться на думці, що цільноклітинна вакцина від кашлюку в деяких рідкісних випадках спричиняє тривале ураження мозку. (Посилання: Institute of Medicine; DPT vaccine and chronic nervous system dysfunction, a new analysis; Washington D.C., National Academy Press, 1994). Декілька звітів, що посилаються на взаємозв'язок між вакцинацією проти цільноклітинного кашлюку, реактогенністю та серйозними побічними ефектами, призвели до зниження рівня приймання вакцин та подальших нових епідемій (Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H. та Brawson, N.S.B. (1981). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children: *Brit Med. J.* 282: 1595-1599).

Побічні реакції, пов'язані з цілоклітинним кашлюком (wP), є перешкодою для їх подальшого використання у всьому світі, тому комбіновані вакцини на основі wP поступово замінюються в індустріальному світі комбінованими вакцинами на основі ацелюлярного кашлюку. Зовсім недавно були розроблені певні компоненти проти кашлюку. Раніше повідомлялося про всі рідкі шестикомпонентні вакцини на основі ацелюлярного кашлюку (DTaP IPV PRP-T-HBsAg) (EP1028750).

На сьогоднішній день Infanrix®Hexa (GSK) є єдиною шестикомпонентною педіатричною комбінованою вакциною, що містить Salk IPV. Цей продукт (DTaP3-IPV-HBV//Hib) продається у вигляді попередньо заповненого шприца з п'ятикомпонентним продуктом, упакованого разом з ліофілізованим кон'югатом PRB-T антигену Hib в окремій колбі, який слід розчинити з рештою вакцини перед використанням. Друга шестикомпонентна вакцина Hexyon® (також відома під назвою Hexacima® та Hexaxim®) - це повністю рідка шестикомпонентна вакцина від Sanofi Pasteur; проте вона також має aP. Ця вакцина, ймовірно, буде націлена на приватні ринки Європи та світу.

Bharat Biotech International розробляє семикомпонентну комбіновану вакцину, яка складається з DT, ацелюлярного кашлюку, Sabin IPV (тип 1: 40 DU, тип 2: 8 DU, тип 3: 32DU), інактивованого ротавірусом одного штаму (штам G9, тобто штам 116E), кон'югату гемофільного грипу типу b PRP, кон'югату з TT та вакцини проти рекомбінантного гепатиту B.

Однак виникають занепокоєння щодо довгострокової ефективності (aP) вакцин ацелюлярного кашлюку, особливо в країнах, що розвиваються. Останні повідомлення свідчать про те, що імунітет до кашлюку падає у підлітковому віці, і що це відповідає за збільшення випадків захворювання у немовлят у віці до шести місяців, перш ніж вони будуть повністю вакциновані. Ефективність вакцини оцінюється у 24 відсотки у віці 8-12 років, імунізованих у грудному віці aP. Оглядове дослідження в Австралії також показало вищі показники захворюваності серед підлітків, яким вводили aP вакцину в дитинстві, ніж серед тих, хто одержував wP вакцину (відносний ризик 3,3, 95 відсотків довірчого інтервалу 2,4-4,5).

З точки зору витрат, антигени aP історично перевищували вартість антигенів wP в 10-30 разів через різницю у виробництві та витрати на роялті, а отже, становлять економічний тягар для країн, що розвиваються. Як результат, вартість шестикомпонентних вакцин на основі wP була б більш придатною для використання в державному секторі країн з низьким рівнем ресурсів.

Отже, використання цільноклітинного кашлюку (wP) у шестикомпонентних вакцинах, призначених для країн, що розвиваються, набуває важливого значення через вартість та виникаючі занепокоєння щодо довгострокової ефективності aP вакцин, особливо в країнах, що розвиваються. Порівняно з найкращими вакцинами цільноклітинного кашлюку (wP), aP вакцини не настільки ефективні в програмах масової імунізації (Vickers et al. 2006; Cherry 2012). Нещодавні дослідження спалахів у високоімунізованих популяціях показали, що тривалість захисту aP вакцин занадто коротка (Klein et al. 2012; Misegades et al. 2012), що призводить до зниження імунітету у дітей старшого віку та підлітків, і відповідного збільшення випадків у цій віковій групі (Skowronski et al. 2002; Klein et al. 2012). Це відрізняє їх від wP вакцин, які забезпечують захист ще в підлітковому віці (Klein et al. 2012). Як результат цих недоліків, у країнах, які перейшли на aP вакцину 1990-х роках, у нас зараз існує покоління дітей не тільки менш захищених від кашлюку, але які також можуть бути менш чутливими до бустерів, оскільки вакцина, якою дитину прищеплюють, може визначити її імунну відповідь на пізнішу бустерну вакцинацію (Podda et al. 1995; Mascart et al. 2007; Sheridan et al. 2012; Liko, Robison and Cieslak 2013; Smits et al. 2013). Одним з найважливіших факторів, що сприяє реактогенності wP, є наявність ліпо-олігосахариду (LOS), ендотоксину із зовнішньої мембрани бактерії.

Інактивація токсинів у wP вакцинах може бути здійснена різними методами, але в кінцевому продукті не повинно бути виявлено активного токсичного лабільного токсину. Масова обробка

цільноклітинним кашлюком (wP) для інактивації токсинів wP, яку практикує велика кількість виробників, використовує термічну обробку/формалін. Декілька звітів посиляються на використання тимеросалу для інактивації wP. Однак використання тимеросалу спричиняє втрату антигенності IPV (Vaccine 1994 Volume 12 No. 9 851-856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine), а отже, у випадку комбінованої вакцини, що містить IPV, може знадобитися, щоб зазначена вакцина була надана у колбі, відокремленій від вмісту тимеросалу, щоб зберегти її ефективність з часом, або змінивши джерело масової інактивації кашлюку. Деякі антигени, тобто активні РТ, можуть також слугувати модифікаторами імунної відповіді, і спостерігалися значні відмінності в імунній відповіді на різні антигени між різними вакцинами (WHO, 1993).

Хімічна екстракція LOS призвела до значного зменшення вмісту ендотоксинів (на 20 %) та вражаючого зниження токсичності, пов'язаної з ендотоксинами (до 97 %), залежно від використовуваного тесту *in vitro* або *in vivo*. Екстракція LOS не впливала на цілісність продукту і, що важливіше, не впливала на ефективність та/або стабільність DTP. Більше того, навряд чи спостерігались відмінності у відповідях антитіл та Т-клітин. (Посилання: Waldely Oliveira Dias et. al; An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin; Human Vaccines & Immunotherapeutics 9:2, 339–348; February 2012)

Антигени гепатиту В

Існують різні штами вірусу гепатиту. Гепатит В - це хвороба, спричинена вірусом гепатиту В (НерВ), який вражає печінку людини та викликає запалення, яке називається гепатитом. Вакцина проти хвороби містить один з білків вірусної оболонки, клітинномембранний антиген гепатиту В (HBsAg). Наразі доступні вакцини, які використовувались для масової імунізації, наприклад, препарати Recombivax HB® та Comvax® від Merck, Engerix-B® та Pediarix® від Glaxo SmithKline Biologicals. Комбінована вакцина, що має компонент гепатиту В, була пов'язана як з більш високим рівнем завершення, так і з урахуванням комплаєнсу в порівнянні з одноантигенною вакциною НерВ. (Посилання: Kurosky. et. al; Effect of combination vaccines on Hepatitis B Vaccine Compliance in Children in the United States; The Pediatric Infectious Disease Journal. 36(7):e189–e196, JUL 2017). Декілька посилань містять цитати щодо адсорбції клітинномембранного антигену гепатиту В на фосфаті алюмінію в поєднанні з іншими антигенами. Нехавас® - комбінована вакцина, вилучена з ринку через низьку імуногенність компонента гепатиту В. Тому існує потреба у комбінованій вакцинній композиції, що містить антиген гепатиту В з адекватною або посиленою імуногенністю.

Антигени гемофілічного грипу (Hib)

Гемофілічний грип (Haemophilus influenzae) - це грамнегативна коккобактерія, яка є нормальною частиною флори верхніх дихальних шляхів. Haemophilus influenzae типу b (Hib b) є основною причиною менінгітних інвазивних інфекцій, що передаються через кров у маленьких дітей, і основною причиною менінгіту в перші 2 роки життя. Імунізація проти Haemophilus influenzae розпочалася в Канаді в 1987 р. За допомогою вакцини проти полісахаридів [полірибозний рибітолфосфат (PRP)]. Полірибозилрибітолфосфатна (PRP) капсула Hib є основним фактором вірулентності для організму. Антитіла до PRP є головним фактором бактерицидної активності в сироватці крові, і підвищення рівня антитіл пов'язане зі зменшенням ризику інвазивного захворювання. PRP є незалежним від Т-клітин антигеном і, отже, характеризується: а) індукцією поганої реакції антитіл у немовлят та дітей віком до 18 місяців; b) варіативною та кількісно меншою реакцією антитіл, ніж та, що спостерігається у Т-клітинних антигенів, c) виробленням більш високої частки імуноглобуліну М (IgM), і d) неможливістю викликати бустерну відповідь. Перші вакцини, засновані лише на компоненті PRP, виявились неефективними для немовлят. Подальші зусилля були спрямовані на кон'юговану вакцину PRP, де PRP кон'югується з білками, які називаються білками-носіями, такими як білок зовнішньої мембрани Neisseria meningitidis, дифтерійний анатоксин, правцевий анатоксин та CRM 197. Включення Hib-кон'югованих компонентів у комбіновані вакцини асоціюється зі зниженою імуногенністю Hib. Крім того, Hib-кон'югати нестійкі у водних середовищах і не можуть пережити тривалого зберігання у цій формі. Отже, полісахарид PRP Haemophilus influenzae b (Hib) часто входить до складу композиції у вигляді висушеної твердої речовини, яка під час доставки відновлюється рідким складом інших антигенів. Наприклад в Infanrix® hexa (WO99/48525).

Антиген поліомієліту

Доступні різні види вакцин:

- Жива ослаблена (атенуйована) пероральна вакцина проти поліомієліту (OPV), розроблена доктором Альбертом Сабіном (Dr. Albert Sabin) у 1961 р. OPV, що містить штами Sabin, вводиться перорально.

- Інактивована (вбита) поліомієлітна вакцина (IPV), розроблена в 1955 році доктором Йонасом Салком (Dr. Jonas Salk). IPV, що містить штами Salk, яку вводять у вигляді ін'єкції.

- Нещодавно вірус інактивованого поліомієліту Sabin, який був одержаний шляхом інактивації поліовірусом штамів Sabin формаліном, був розроблений для ін'єкцій, а також

5 доступний у комерційних продуктах.

Як живі аттенуйовані (OPV), так і інактивовані (IPV) вакцини проти поліомієліту були ефективними в боротьбі з поліомієлітом у всьому світі. Вакцина проти поліомієліту може включати штами Salk або Sabin. У 1955 р. доктору Йонасу Солку (Dr. Jonas Salk) вдалося інактивувати вірус поліомієліту дикого типу, включивши його у форму ін'єкційного типу, і назвав

10

його штамом Salk, що включає Mahoney тип 1, MEF тип 2 і Saukett тип 3, які застосовували у вакцині проти хвороби поліомієліту. Штами Sabin включають штами Sabin 1 і Sabin 2. На сьогоднішній день прийнята стандартна доза поліомієлітної вакцини містить 40 D антигенних одиниць інактивованого поліовірусу типу 1 (Mahoney), 8 D антигенних одиниць інактивованого поліовірусу типу 2 (MEF-I) та 32 D антигенних одиниць інактивованого поліовірусу типу 3 (Saukett) наприклад Infanrix-hexa® (WO99/48525).

15

В даний час IPV доступний як окремих препарат без ад'юванту, так і в різних комбінаціях, включаючи DT-IPV (з дифтерійним та правцевим анатоксинами) та шестикомпонентні вакцини IPV (додатково з кашлюком, гепатитом В, гемофільним грипом b та ад'ювантом) наприклад Infanrix® hexa (WO99/48525). Однак у порівнянні з OPV загальна вартість виробництва IPV значно вища. Це головним чином пов'язано з вимогами щодо: (i) більшої кількості вірусу на дозу; (ii) додаткової подальшої обробки (тобто концентрація, очищення та інактивація) та відповідного тестування якості (iii) втрати антигену або поганого відновлення у вихідному потоку та iv) забруднення. Дотепер фінансовий виклик був головним недоліком для інновацій та впровадження IPV у країнах з низьким та середнім рівнем доходу. Майбутній глобальний попит на IPV після викорінення поліовірусів може зрости з нинішнього рівня 80 млн. доз до 450 млн. доз на рік. Отже, ймовірно, будуть потрібні підходи до "розтягування" поставок IPV.

20

25

Автори даного винаходу неочікувано виявили, що зменшена доза IPV демонструє не меншу ефективність/еквівалентний захист від поліомієліту порівняно зі стандартною дозою антигену IPV. Ефективні вакцинні препарати зі зменшеними дозами, які забезпечують захист від інфекції з використанням меншої дози антигену IPV, бажані в ситуаціях, коли постачання звичайної вакцини є недостатнім для задоволення загальносвітових потреб або коли вартість виробництва звичайної вакцини перешкоджає продажу вакцини за ціною, яка є доступною для країн, що розвиваються. Також вплив нижчої дози IPV, порівняно з існуючими на ринку складми може бути більш безпечним. Таким чином, необхідно оцінити різні стратегії надання IPV за більш доступними цінами. Отже, комбінована вакцина, що містить знижену дозу IPV, може зробити її дешевшою та простішою для введення.

30

35

У випадку вакцин проти пандемічного грипу, використання ад'ювантів дозволило зменшити дозу, збільшити доступність та зменшити вартість вакцини. Отже, припускають, що склад вакцини IPV з ад'ювантом зменшить вартість, а також збільшить кількість доступних доз IPV у всьому світі. Додатково, солі алюмінію вважаються безпечними, що вже використовуються в комбінованих вакцинах, що містять IPV, мають найнижчі перешкоди в розвитку та недорогі у виробництві. Однак відсутні відомості про те, що ад'юванти алюмінію дозволяють значно зменшити дозу. Додатково, цілісноклітинний антиген кашлюку, присутній у шестикомпонентній вакцині, виявився потужним імуностимулятором. Завдяки імуностимулюючій дії як ад'юванту фосфату алюмінію, так і цілісноклітинної вакцини проти кашлюку, ми припускаємо, що одержуємо добру імунну відповідь із зменшеною дозою IPV.

40

45

Інші антигени

Іншими антигенами, які можуть бути включені до комбінованої вакцини, є Haemophilus influenzae (серотипи a, c, d, e, f та некапсульовані штами), гепатит (штами A, C, D, E, F та G),

50

менінгіт Neisseria A, B, C, W, X, Y, грип, пневмококи, стрептококи, сибирська виразка, лихоманка денге, малярія, кір, паротит, краснуха, БЦЖ, японський енцефаліт, ротавірус, віспа, жовта лихоманка, черевний тиф, оперізуючий лишай, вірус вітряної віспи та інші.

Діапазон та тип антигенів, що використовуються в комбінованій вакцині, залежать від віку цільової популяції, яку слід використовувати, наприклад, немовлят, малюків, дітей, підлітків та дорослих. Є відомими найдавніші комбіновані вакцини, які можуть запобігти зараженню Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium Diphtheriae та не обов'язково інактивованим поліовірусом (IPV) та/або вірусом гепатиту В та/або інфекцією гемофільного грипу типу В (див., наприклад, WO 93/24148, WO97/00697, WO2000/030678, WO2008/028956, US 6013264 і WO2005089794).

55

Однак добре задокументоване явище антигенної конкуренції ускладнило і перешкодило розробці багатокomпонентних вакцин. Це явище стосується спостереження, що спільне введення декількох антигенів часто призводить до зменшення реакції на певні антигени щодо імунної відповіді на ці антигени при введенні індивідуально. Тим часом, багатодозова вакцина повинна містити консервант, щоб уникнути забруднення шкідливими мікробами. Для вакцинних продуктів, що експортуються в менш розвинені країни, переважними є багатодозові вакцини, що містять консервант, враховуючи середовище країн, де вакцини повинні використовуватися, способи розподілу тощо. Приклади консервантів, які використовували, включають бензетоній хлорид (фемерол), тіомерсал, фенол, формальдегід та 2-феноксіетанол (2-PE) відомі в даній галузі. Консерванти, придатні для вакцин, повинні бути екологічно безпечними, ефективними проти бактерій, а також дріжджів та інших грибів та позбавлені негативного впливу на імуногенний ефект вакцини. Тіомерсал - це похідна діетилртуті, яка широко використовується у багатьох вакцинах як консервант. Тіомерсал відомий тим, що запобігає росту забруднюючих мікроорганізмів та підтримує стерильні умови під час зберігання або використання вакцинних продуктів, а багато комбінованих вакцин, які одержали попередню кваліфікацію ВООЗ (PQ), містять тіомерсал як консервант. Однак є повідомлення, що стосуються певних алергічних реакцій (приблизно у 16 % населення) на тіомерсал, переважно у вигляді місцевих реакцій гіперчутливості уповільненого типу, включаючи почервоніння та набряк у місці ін'єкції. Додатково, інактивована поліомієлітна вакцина зазвичай використовує 2-PE як консервант замість тіомерсалу, оскільки, як відомо, використання тіомерсалу як консерванту в інактивованій вакцині проти поліомієліту знижує ефективність вакцини на 50 % і більше, протягом тижня, навіть зберігаючи в холодильнику. (Vaccine 1994 Volume 12 No.9 851-856. Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine).

Комбіновані вакцини (включаючи D, T, wP, Hib, HBsAg та IPV) також використовують 2-PE у концентрації 5 мг/мл (WO2010046934, WO2008020322 та WO2012093406). Однак було встановлено, що 2-PE має слабшу антимікробну активність, ніж тіомерсал, проти дріжджів та грибів у комбінованій вакцині на основі DTP при температурі 2-80 °C. Підвищення ефективності консервантів комбінованої вакцини за рахунок збільшення кількості 2-PE з метою задоволення необхідних критеріїв є одним із варіантів. Однак збільшення концентрації 2PE може спричинити проблеми з безпекою у маленьких дітей, які є суб'єктами приймання комбінованих вакцин, і тим самим призвести до регуляторних перешкод для затвердження такої вакцини (таких вакцин). Отже, було б корисним підвищити консервуючу ефективність комбінованої вакцини, поєднуючи 2-PE з щонайменше одним іншим консервантом, який відповідає критеріям безпеки та регуляторним нормам. Приклади консервантів, крім 2-PE, які можна використовувати, включають бензетоній хлорид (фемерол), естери парабену, фенол, формальдегід, відомі в даній галузі. Встановлено, що метил та пропілпарабен, бензиловий спирт проходять антимікробну перевірку згідно з USP, BP та EP. Додатково, ці консерванти нетоксичні, але ефективні. Токсичність парабенів порівняно низька, завдяки легкості та швидкості, з якою організм позбавляється цих препаратів. LD50 метилпарабену у мишей внутрішньочеревно становить 1 г/кг. Ніколи не було відомо, що суміш метил та пропілпарабену використовується в комерційних вакцинах. Авторами даного винаходу було виявлено, що консервуюча ефективність суміші естерів 2-феноксіетанолу та парабенів (наприклад, метил-, пропіл-парабенів) є відносно більш ефективною порівняно з окремим 2-феноксіетанолом. Додатково авторами даного винаходу було виявлено, що імуногенність, реактогенність, стабільність та підтримка правильної форми антигенів у комбінованій вакцинній композиції залежить від способу складання композиції, що включає:

a) Спосіб утворення окремих антигенів

b) Послідовність додавання антигенів

c) Використання специфічних ад'ювантів у певній кількості для певних антигенів,

d) Індивідуальну адсорбцію або комбіновану адсорбцію антигенів на ад'ювантах, де комбінована адсорбція має свої переваги у вигляді простоти експлуатації, а недоліки включають те, що перші попередньо адсорбовані антигени можуть частково або повністю десорбуватися під час додавання таких антигенів. Антигени, додані на останньому етапі, можуть не повністю адсорбуватися, оскільки попередні антигени можуть наситити адсорбційну здатність. Слабко адсорбовані антигени можуть десорбуватися при зберіганні.

d) Ступінь адсорбції антигену на ад'ювантах

f) З використанням мінімальної концентрації галунів

e) З використанням оптимальної концентрації та типу консерванту

h) Використання різних параметрів, включаючи перемішування, температуру та pH.

ЗАВДАННЯ ВИНАХОДУ

Деякі завдання даного винаходу, яким задовольняє щонайменш ніж один варіант втілення винаходу, є наступними:

Завданням даного винаходу є усунення однієї або декількох проблем рівня техніки або щонайменше надання корисної альтернативи. Ще одним завданням даного винаходу є забезпечення повністю рідкої комбінованої вакцини, придатної для профілактики інфекцій, спричинених дифтерією, правцем, кашлюком, поліомієлітом, гемофільною паличкою та гепатитом В, або щоб запобігти, покращити або затримати початок або прогресування їх клінічних проявів. Ще одним завданням даного винаходу є забезпечення повністю рідкої комбінованої вакцини, що містить різні антигени інактивованого поліовірусом (IPV) зі зниженою дозою, яка демонструє не меншу ефективність/еквівалентний захист від поліомієліту порівняно зі стандартною дозою антигену IPV. Ще одним завданням даного винаходу є забезпечення повністю рідкої комбінованої вакцини, що містить щонайменше один парабен, тобто метил- або пропілпарабеновий консервант та 2-феноксіетанол (2-PE), щоб покращити консервуючу ефективність багатодозової комбінованої вакцини. Ще одним завданням даного винаходу є забезпечення вдосконаленого способу виготовлення такої композиції/рецептури комбінованої вакцини, де вакцина, що демонструє покращену імуногенність, знижує реактогенність, покращує стабільність і додатково відповідає критерію серологічного захисту для кожного із зазначених імуногенних компонентів. Інші завдання та переваги даного винаходу стануть більш очевидними з наведеного нижче опису, який не призначений для обмеження обсягу даного винаходу.

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Комбінована вакцинна композиція, що містить знижену дозу антигену інактивованого поліовірусом (IPV) у поєднанні з іншими антигенами/імуногенами та щонайменше одними естерами парабенів, тобто метил- або пропілпарабену, та 2-феноксіетанолом (2-PE), що застосовуються як консервант, причому ефективність багатодозової комбінованої вакцини покращена, та спосіб її одержання.

Даний винаходу стосується комбінованої вакцинної композиції, що містить –

а) Високоочищений дифтерійний (Diphtheria) анатоксин (D) і правцевий (tetanus) анатоксин (T), вироблений з використанням напівсинтетичного середовища, з наступною детоксифікацією та індивідуальною адсорбцією на ад'юванті фосфату алюмінію, що призводить до посилення імуногенності

б) Інактивованний цільноклітинний компонент *B. pertussis* (wP), одержаний із застосуванням комбінації нагрівання та хімічної інактивації, специфічних штамів *Bordetella pertussis* у певному співвідношенні, що призводить до зниження реактогенності та підвищення ефективності.

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

д) Знижену дозу Salk або Sabin IPV (інактивованого поліовірусом), що демонструє порівнянну ефективність відносно стандартної дози, одержаної за допомогою вдосконалених методів формальдегідної інактивації та необов'язково адсорбування на ад'юванті фосфату алюмінію.

е) Поверхневий антиген гепатиту В (Hepatitis B, HepB), адсорбований індивідуально на ад'юванті фосфату алюмінію, що призводить до посилення імуногенності

ф) Мінімальний вміст галунів, тим самим забезпечуючи знижену реактогенність

г) Щонайменш один естер парабену, тобто метил- або пропілпарабену, що відрізняється від 2-феноксіетанолу (2-PE) як консерванту.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Незважаючи на те, що даний опис може бути придатним для різних втілень даного винаходу, деякі втілення винаходу показані в наведеному нижче детальному описі з розумінням того, що дане розкриття може вважатися прикладом принципів розкриття і не призначене обмежувати обсяг даного винаходу тим, що проілюстровано та розкрито в цьому описі. Втілення даного винаходу пропонуються таким чином, щоб всебічно та повністю передати обсяг даного винаходу фахівцям. Викладені численні деталі, що стосуються конкретних компонентів та способів, представлені щоб забезпечити повне розуміння втілень винаходу у даному розкритті. Для фахівця в даній галузі буде очевидно, що деталі, наведені у втіленнях винаходу, не слід тлумачити як обмеження обсягу даного винаходу. В деяких втіленнях даного винаходу загальновідома композиція, загальновідомі способи та загальновідомі методики не описуються детально. Термінологія, що використовується у цьому описі, призначена лише для пояснення конкретного втілення даного винаходу, і така термінологія не повинна розглядатися як обмеження обсягу даного винаходу. Застосовувані у цьому описі форми однини можуть включати також форми множини, якщо контекст чітко не вказує на інше. Терміни перший, другий, третій тощо не слід тлумачити як обмеження обсягу даного опису, оскільки

вищезазначені терміни можуть використовуватися лише для відрізнання одного елемента, компонента, галузі, шару чи секції від іншого компонента, галузі, шару або секції. Такі терміни, як перший, другий, третій тощо, що використовуються у цьому описі, не передбачають певної послідовності або порядку, якщо це чітко не передбачено цим описом. Даний опис забезпечує

5 імуногенну композицію та спосіб її одержання.

Термін "вакцина" необов'язково замінюється терміном "імуногенна композиція" і навпаки. "D-антигенні одиниці" (їх також називають "міжнародними одиницями" або МО): D-антигенна форма поліовірусу індукуює захисні нейтралізуючі антитіла. D-антигенні одиниці, зазначені в цій заявці (наприклад, у вакцинах за даним винаходом), - це виміряні загальні D-антигенні одиниці кожного неадсорбованого масового типу антигену IPV до створення остаточної вакцини, які додають в кожну дозу, припустиму для організму людини, вакцини, яку створюють (зазвичай 0,5 кінцевий об'єм у мл). Надійні методи вимірювання одиниць D-антигену добре відомі в даній галузі і опубліковані, наприклад, Європейською фармакопеею. Наприклад, одиниці D-антигену можна виміряти, використовуючи тест ELISA, як описано в Прикладі 1 ("Кількісне визначення D-антигену за допомогою ELISA") нижче. Європейська Фармакопея забезпечує тестовий зразок (Біологічна довідка Європейської Фармакопеї (European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation) - доступна в Ph. Eur. Secretariat, наприклад, код P 216 0000) для стандартизації таких методів між виробниками (Pharmeuropa Special Issue, Bio 96-2). Таким чином, значення одиниці D-антигену добре зрозуміле в даній галузі. Термін "доза" у цій заявці, як правило, означає одне введення вакцини згідно з даним винаходом, яке зазвичай являє собою одну ін'єкцію. Типова людська доза становить 0,5 мл. Звичайно, різні дози можна вводити згідно графіка введення вакцини.

Термін "IPV" або імуногенна композиція, що містить ці компоненти, у цій заявці призначено для позначення інактивованого поліовірусом типу 1 (наприклад, Mahoney, як переважно використовується), типу 2 (наприклад, MEF-1) або типу 3 (наприклад, Saukett), або Sabin серотипу 1, 2, 3 комбінації двох, або всіх трьох даних типів. Прикладом повної (або стандартної) дози (40-8-32 D одиниць антигену IPV на основі типів Salk 1, 2 та 3 відповідно) імуногенної композиції IPV для цілей даного винаходу може бути Poliovac® (Serum Institute of India Pvt. Ltd.). Таким чином, там, де зазначено, що в імуногенній композиції за даним винаходом присутнє

однократне, двократне або трикратне зниження (зменшення) дози у порівнянні зі стандартною Salk дозою на основі IPV, маються на увазі одиниці D-антигену, що дорівнюють X% зниження дози на 40, 8 та/або 32 одиниці D-антигену IPV типів 1, 2 та/або 3 відповідно (як вимірюється у кожному балку антигену IPV), що складають у композицію в межах кожної дози зазначеної вакцини.

Термін "сахарид" у даному описі може означати полісахарид або олігосахарид і включає обидва з них. Капсульний сахаридний антиген може бути повнорозмірним полісахаридом, або він може поширюватися на бактеріальні "класифіковані сахариди" та "олігосахариди" (які, природно, мають невелику кількість повторюваних ланок, або які є полісахаридами, зменш ніжними в розмірах для більш легкої обробки, але все ще здатний викликати захисну імунну

відповідь у хазяїна.

Згідно з першим втіленням даного винаходу, комбінована вакцинна композиція містить групу антигенів/імуногенів, вибраних з, але не обмежуючись наведеним, дифтерійного анатоксину (Diphtheria) (D), правцевого анатоксину (Tetanus) (T), цілісної клітини кашлюку B. pertussis (wP), кон'югату ПЦР-СР гемофілічного грипу типу b (Haemophilus influenzae) (Hib), гепатиту В (HepB), зменшеної дози інактивованого поліовірусом (IPV) і додатково містить комбінацію 2-феноксіетанолу та щонайменш ніж одного з консервантів на основі естерів парабенів.

Згідно з другим втіленням даного винаходу, комбінована вакцинна композиція може додатково містити один або більше антигенів, вибраних із групи, що складається, але не обмежується наведеним, антигени Haemophilus influenzae (серотипи a, c, d, e, f та некапсульовані штами), Hepatitis (штами A, C, D, E, F та G), Neisseria meningitidis A, B, C, Y, W-135, або X, грипу, Staphylococcus aureus, антигену(антигенів) Salmonella typhi, антигену ацелюлярного кашлюку, модифікованої аденилатциклази, антигену малярії (RTS, S), Pneumococci, Streptococci, сибірської виразки, лихоманки Денге, малярії, кору, паротиту, краснухи, BCG, вірусу папіломи людини, японського енцефаліту, лихоманки Денге, вірусу Зіка, лихоманки Ебола, вірусу чикунгунья, ротавірусу, вірусу чорної віспи, жовтої лихоманки, флавівірусу, оперізуючого лишая, вірусу вітряної віспи, відповідно.

Відповідно до третього втілення даного винаходу, штами IPV, що використовуються у комбінованій вакцинній композиції, містять інактивовані штами Sabin, вибрані з групи типу 1, типу 2 та типу 3, або інактивовані штами Salk, вибрані з групи Mahoney типу 1, MEF типу 2 та Saukett типу 3.

В одному з аспектів третього втілення даного винаходу вірус поліомієліту можна вирощувати наступним способом:

- Клітинна лінія CCL81-VERO (нірка мавпи) була використана в якості клітин-хазяїв для вирощування вірусів поліомієліту, тобто штамів Sabin та Salk.

5 - Після зараження клітин-хазяїв необхідним штамом поліовірусом та інкубації протягом 72 годин, середовище, що містить вірус та залишки клітин, об'єднували та збирали в одному контейнері.

- Фільтрат піддавали фільтруванню тангенціальним потоком за допомогою касети 100 кДа; діалізували за допомогою фосфатного буфера і очищали за допомогою аніонообмінної хроматографії.

10 - Перед введенням пацієнтам віруси необхідно інактивувати, використовуючи відповідні методи інактивації.

Однак авторами даного винаходу було неочікувано виявлено, що високий відсоток втрат D-антигену після формальдегідної інактивації може бути обумовлений наявністю фосфатного буфера, який несподівано викликає небажану агрегацію частинок поліовірусом.

Отже, важливий аспект даного розкриття включає вдосконалений спосіб інактивації формаліну, що включає такі стадії:

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

20 б) до зазначеної вище суміші додавали середовище М-199, що містить гліцин (5 г/л)

с) додавали 0,025 % формальдегіду і потім перемішували,

д) потім суміш інкубували при 37 °С протягом 5-13 днів при безперервному перемішуванні вірусного балку на магнітній мішалці,

е) постінкубаційну суміш піддавали дії проміжної системи TFF (100 кДа, 0,1 м²) на 7 день та остаточній фільтрації після інактивації

25 ф) потім відфільтрований балк зберігали при 2-8 °С,

г) проводили D-Ag ELISA для визначення одиниць D-Ag

Згідно з четвертим втіленням даного винаходу, штами IPV, що використовуються в комбінованій вакцинній композиції, містять знижені дози інактивованих штамів Sabin, вибраних із групи типу 1, типу 2 та типу 3, або інактивованих штамів Salk, вибраних із групи Mahoney типу 1, MEF типу 2 і Saukett типу 3.

Згідно з п'ятим втіленням даного розкриття, IPV (штами Sabin або Salk) не може бути адсорбований індивідуально на будь-якому ад'юванті та потім доданий до кінцевої комбінованої вакцинної композиції. Згідно кращого аспекту п'ятого втілення даного винаходу, IPV (штами Sabin або Salk) може адсорбуватися на ад'юванті, більш переважно солі фосфату або гідроксиду алюмінію, присутній у комбінованій вакцині, де відсоток адсорбції антигену IPV для IPV типу 1 може знаходитися у діапазоні 10-30 %, IPV типу 2 може знаходитися у діапазоні 60-100 %, а IPV типу 3 може знаходитися у діапазоні 0-25 %.

Відповідно до шостого втілення даного винаходу, компоненти (IPV) (штами Sabin або Salk) можуть бути індивідуально адсорбовані на ад'юванті, вибраному із групи солі алюмінію (Al³⁺), такої як гідроксид алюмінію (Al(OH)₃) або фосфат алюмінію (AlPO₄), галун, фосфат кальцію, MPLA, 3D-MPL, QS21, CpG-вмісний олігонуклеотидний ад'ювант, ліпосома, емульсія типу масло-у-воді або їх комбінація. (наприклад, до або після змішування з іншими компонентами, якщо вони наявні). Якщо адсорбується, один або декілька компонентів IPV можуть адсорбуватися індивідуально або разом у вигляді суміші на гідроксиді алюмінію (Al(OH)₃) або фосфаті алюмінію. Компоненти IPV (штами Sabin або Salk) можуть бути адсорбовані на солі алюмінію, додержуючись наступної процедури:

- взяти бажаний об'єм автоклавного Al(PO)₄ або Al(OH)₃, щоб одержати кінцеву концентрацію галунів (Al³⁺) від 0,1 до 0,8 мг/доза в контейнері на 50 мл

50 - додавання маси IPV з відрегульованою одиницею D-Ag та доповнення об'єму розчинником (10xM-199+0,5 % гліцину),

- регулювання рН фінальної композиції та одержання фінальної композиції з рН від 6 до 7,5.

В одному з аспектів шостого втілення даного винаходу адсорбцію інактивованої формаліном IPV можна здійснити на галунах (Al³⁺) з концентрацією, обраною з 0,1 мг/доза, 0,2 мг/доза, 0,3 мг/доза, 0,4 мг/доза, 0,5 мг/доза, 0,6 мг/доза, 0,7 мг/доза та 0,8 мг/доза, переважно від 0,1 мг/доза до 1,25 мг/доза на серотип і при рН, вибраному з 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7 та 6,8, переважно 6,5. Ще в одному аспекті шостого втілення даного винаходу відсоток відновлення D-Антигену після формалінової інактивації в присутності Тріс може становити 50 %, 60 %, 70 % або 80 %, а відсоток адсорбції після адсорбції на фосфаті алюмінію може становити від 70 % до 80 %, від 80 % до 90 % або від 90 % до 99 % або від 95 % до 99 %.

Відповідно до сьомого втілення даного винаходу, дифтерійний токсин (екзотоксин) та правцевий токсин (екзотоксин) були одержані з *Corynebacterium Diphtheria* та *Clostridium tetani* відповідно і потім детоксифіковані за допомогою відповідного методу інактивації. Одержані таким чином дифтерійний анатоксин (D) і правцевий анатоксин (T) можуть бути очищені за допомогою гель-фільтраційної хроматографії. Одержаний таким чином очищений DT додатково використовували для створення комбінованої вакцини.

В одному з аспектів сьомого втілення даного винаходу, дифтерійний токсин виробляється вирощуванням *Corynebacterium Diphtheriae* в напівсинтетичному середовищі, що складається з таких інгредієнтів в оптимальних концентраціях в будь-якій з таких комбінацій:

Комбінація 1:

Гідролізат казеїну, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, сульфат магнію, β-аланін, пімелінова кислота, нікотинова кислота, сульфат міді, сульфат цинку, хлорид марганцю, L-цистин, дигідрат хлориду кальцію, дигідрофосфат калію, гідрофосфат дикалію, сульфат заліза та WFI.

Комбінація 2:

Гідролізат казеїну, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, сульфат магнію, β-аланін, пімелінова кислота, нікотинова кислота, хлорид марганцю, L - цистин, дигідрат хлориду кальцію, дигідрофосфат калію, гідрофосфат дикалію, сульфат заліза та WFI.

Комбінація 3:

Гідролізат казеїну, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, β-аланін, пімелінова кислота, нікотинова кислота, сульфат міді, сульфат цинку, хлорид марганцю, L - цистин, дигідрат хлориду кальцію, дигідрофосфат калію, гідрофосфат дикалію та WFI.

Комбінація 4:

Дріжджовий екстракт, моногідрат мальтози, льодовикова оцтова кислота, лактат натрію, сульфат магнію, β-аланін, пімелінова кислота, нікотинова кислота, сульфат міді, сульфат цинку, хлорид марганцю, L - цистин, дигідрат хлориду кальцію, дигідрофосфат калію, гідрофосфат дикалію, сульфат заліза та WFI.

Згідно з другим аспектом сьомого втілення даного винаходу, правцевий токсин виробляється вирощуванням *Clostridium tetanus* в напівсинтетичному середовищі, що складається з таких інгредієнтів в оптимальних концентраціях в будь-якій з таких комбінацій:

Комбінація 1:

Гідролізат казеїна, хлорид кальцію, гідрофосфат дикалію, безводна декстроза, хлорид натрію, сульфат магнію, рибофлавін, гідрохлорид тіамін, піридоксин гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B12, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та WFI.

Комбінація 2:

Гідролізат казеїна, хлорид кальцію, β-аланін, гідрофосфат дикалію, безводна декстроза, хлорид натрію, сульфат магнію, сульфат заліза, рибофлавін, тіамін гідрохлорид, піридоксин гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, розчин вітаміну B12, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та WFI.

Комбінація 3:

Гідролізат казеїна, хлорид кальцію, гідрофосфат дикалію, безводна декстроза, хлорид натрію, сульфат цинку, рибофлавін, тіамін гідрохлорид, піридоксин гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B12, біотин, HCl, NaOH, абсолютний етанол та WFI.

Комбінація 4:

Гідролізат казеїну, хлорид кальцію, гідрофосфат дикалію, безводна декстроза, хлорид натрію, сульфат магнію, хлорид марганцю, рибофлавін, тіамін гідрохлорид, піридоксин гідрохлорид, пантотенат кальцію, нікотинова кислота, L-цистин, хлорид заліза, розчин вітаміну B, біотин, конц. HCl, NaOH, абсолютний етанол та WFI.

Ще в одному аспекті сьомого втілення даного винаходу дифтерійний токсин та правцевий токсин детоксифікували за допомогою одного або комбінації таких методів інактивації, які включають нагрівання, УФ, формалін/формальдегід, ацетилетиленімін тощо.

Згідно з восьмим втіленням даного винаходу, антиген гепатиту (Нер), що використовується в комбінованій вакцинній композиції, включає антигени гепатиту, одержані з поверхні штаму гепатиту В (HBsAg).

В одному з аспектів дев'ятого втілення даного винаходу HBsAg може бути одержаний одним із таких способів:

- шляхом очищення антигену у вигляді в твердих частинок від плазми хронічних носіїв гепатиту В, оскільки велика кількість HBsAg синтезується в печінці та виділяється в кровоток під час інфекції HBV

- експресії білка методами рекомбінантної ДНК.

5 Згідно з дев'ятим втіленням даного винаходу, дифтерійний анатоксин (D), правцевий анатоксин (T), поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) індивідуально адсорбуються на ад'ювант, вибраний із групи солі алюмінію (Al^{3+}), такої як гідроксид алюмінію ($Al(OH)_3$) або фосфат алюмінію ($AlPO_4$), галун, фосфат кальцію, MPLA, 3D-MPL, QS21, CpG-вмісний олігонуклеотидний ад'ювант, ліпосома або емульсія типу масло-у-воді або їх комбінація.

10 Проте переважно дифтерійний анатоксин (D), правцевий анатоксин (T) та поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) індивідуально адсорбуються на фосфаті алюмінію.

В одному з аспектів дев'ятого втілення даного винаходу антиген дифтерійного анатоксину (D), адсорбований на фосфаті алюмінію, має відсоток адсорбції щонайменш ніж 50 %. В іншому аспекті дев'ятого втілення даного винаходу антиген правцевого анатоксину (T), адсорбований на фосфаті алюмінію, має відсоток адсорбції щонайменш ніж 40 %. Ще в одному аспекті дев'ятого втілення даного винаходу поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) адсорбується на фосфаті алюмінію, маючи відсоток адсорбції щонайменш ніж 70 %.

Згідно з десятим втіленням даного винаходу, антиген Hib, що використовується в комбінованій вакцині за даним винаходом, походить від капсульного полісахариду штаму *Haemophilus influenzae* типу В (Hib) 760705. Згідно з одним аспектом десятого втілення даного винаходу, антиген Hib PRP кон'югований з білком-носієм, вибраним із групи білка-носія, що складається, але не обмежується наведеним, з CRM197, анатоксину дифтерії, комплексу зовнішньої мембрани *Neisseria meningitidis*, фрагменту С правцевого анатоксину, анатоксину кашлюка, білку D *H. influenzae*, *E. coli* LT, *E. coli* ST та екзотоксину А із синьогнійної палички (*Pseudomonas aeruginosa*), комплексу зовнішньої мембрани с (OMP), поринів, білків, що зв'язують трансферин, пневмолизину, поверхневого пневмококового білка А (PspA), пневмококового поверхневого адгезину А (PsaA), пневмококового PhDD, поверхневих пневмококових білків BVH-3 та BVH-11, захисного антигену (PA) *Bacillus anthracis* та детоксифікованого набрякового фактору (EF) та летального фактору (LF) *Bacillus anthracis*, овальбуміну, гемоціаніну фісурелла (KLH), сироваткового альбуміну людини, бичачого сироваткового альбуміну (BSA) та очищеного білкового похідного туберкуліну (PPD), синтетичних пептидів, білки теплового шоку, білків кашлюку, цитокінів, лімфокінів, гормонів, факторів росту, штучних білків, що містять декілька епітопів CD4 + Т-клітин людини з різних антигенів, що походять від патогенів, таких як N 19, білків, що поглинають залізо, токсинів А або В з білків *C. difficile* та *S. agalactiae*.

Однак переважно Hib PRP кон'югується з правцевим анатоксином (TT) за допомогою хімії CNBr, хімії відновного амінування, хімії ціанілювання або будь-якої іншої хімії, яку вже розкрито у Kniskern et al., "Conjugation: design, chemistry та analysis" in Ellis et al., Development and clinical uses of *Haemophilus influenzae* тип В conjugate vaccines. New York: Marcel Dekker, 1994: 37-69

40 Згідно з другим аспектом десятого втілення даного винаходу, білок-носії присутній як у вільній, так і в кон'югованій формі в композиції за даним винаходом, некон'югована форма переважно становить не більш ніж 20 % від загальної кількості білка-носія в композиції, як в цілому, і більш переважно, присутній у кількості менш ніж 5 мас. %.

Згідно з третім аспектом десятого втілення даного винаходу, антиген Hib по суті не адсорбується на жодному з ад'ювантів. Згідно з четвертим аспектом десятого втілення даного винаходу, антиген Hib не може піддаватися навмисній або навмисній адсорбції на будь-якому з ад'ювантів. Згідно з п'ятим аспектом десятого втілення даного винаходу, відсоток адсорбції антигену Hib на будь-якому ад'юванті становить менш ніж 20 %.

Згідно з одинадцятим втіленням даного винаходу, препарат цільноклітинного кашлюку (wP), що використовується в комбінованій вакцинній композиції за даним винаходом, переважно одержують зі штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, змішаних у певному співвідношенні і після цього інактивованих за допомогою вдосконалених методів інактивації, у відсутності тіомерсалу, таким чином призводячи до зниження реактогенності та підвищення специфічної активності, і антиген wP може адсорбуватися або не адсорбуватися на ад'ювантах на основі алюмінію.

Відповідно до одного аспекту одинадцятого втілення даного винаходу, препарат антигену цільноклітинного кашлюку (wP), що використовується в комбінованій вакцинній композиції за даним винаходом, переважно одержують із штамів *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229, змішаних у співвідношенні 1:1:0,25:0,25. Згідно з другим аспектом одинадцятого втілення даного винаходу, препарат антигену цільноклітинного кашлюку (wP), що використовується у

комбінованій вакцинній композиції, був інактивований, використовуючи одну або декілька таких інактиваційних обробок, які включають нагрівання, УФ, формалін/формальдегід, ацетилетиленімін та ін.

5 Ще більш переважно, антигенний препарат цільноклітинного кашлюку (wP), що використовується у комбінованій вакцинній композиції, інактивується за допомогою поєднання термічної та хімічної обробки. Ще більш бажаним є інактивування нагріванням при 56 ± 2 °C, 10-15 хв у присутності формальдегіду, причому основна маса wP залишається такою, що не містить комків, і легко гомогенізується, що призводить до зниженої реактогенності та забезпечує кращу ефективність wP протягом тривалого часу.

10 Відповідно до третього аспекту одинадцятого втілення даного винаходу, препарат антигену цільноклітинного кашлюку (wP), що використовується у комбінованій вакцинній композиції, може або не може адсорбуватися на ад'юванті на основі алюмінію, такому як гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію або їх комбінація (наприклад, до або після змішування з іншими компонентами, якщо вони наявні). Якщо адсорбується, один або більше штамів wP (тобто 134, 15 509, 25525 та 6229) можуть адсорбуватися індивідуально або разом у вигляді суміші.

Згідно з дванадцятим втіленням винаходу даного розкриття, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 1

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. pertussis (wP)	12-16 KYO	Переважно один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 8 або 4 або 16 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважно один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважно один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
10	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважно один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

20 Згідно з тринадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 2

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. pertussis (wP)	12-16 KYO	Переважно один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	MEF-1 Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 1,5 або 2 або 4 або 8 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63

Таблиця 2 (продовження)

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
10	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з чотирнадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 3

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
10	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з п'ятнадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 4

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
10	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

10

Згідно з шістнадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 5

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген B. pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 8 або 4 або 16 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг

Згідно з сімнадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 6

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген B. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	MEF-1 Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 1,5 або 2 або 4 або 8 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг

Згідно з вісімнадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 7

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць/0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген B. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU

10

Таблиця 7 (продовження)

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць/0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг

Згідно з дев'ятнадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 8

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. Pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг

Згідно з двадцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 9

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. Pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 8 або 4 або 16 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

10

Згідно з двадцять першим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 10

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. Pertussis (wP)	12-16 KYO	Переважно один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	MEF-1 Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 1,5 або 2 або 4 або 8 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважно один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважно один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з двадцять другим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 11

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. pertussis(wP)	12-16 KYO	Переважно один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважно один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважно один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з двадцять третім втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 12

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. pertussis(wP)	12-16 KYO	Переважно один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP

10

Таблиця 12 (продовження)

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
6	Інактивований поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з двадцять четвертим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 13

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивований антиген В. Pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивований поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 8 або 4 або 16 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з двадцять п'ятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 14

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивований антиген В. Pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивований поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	MEF-1 Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 1,5 або 2 або 4 або 8 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

Згідно з двадцять шостим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 15

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. Pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

5

Згідно з двадцять сьомим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 16

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Maoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	Метилпарабен	0,1 – 1,5 мг	Переважає один з 0,7 або 0,9 або 1 мг
9	Пропілпарабен	0,05 – 0,2 мг	Переважає один з 0,05 або 0,1 або 0,15 мг

10

Згідно з двадцять восьмим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 17

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP

Таблиця 17 (продовження)

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 8 або 4 або 16 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважно один з 2 або 2,5 або 3 мг

Згідно з двадцять дев'ятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 18

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважно один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	MEF-1 Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 1,5 або 2 або 4 або 8 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважно один з 2 або 2,5 або 3 мг

Згідно з тридцятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 19

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважно один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважно один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважно один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважно один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважно один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважно один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважно NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважно один з 2 або 2,5 або 3 мг

10

Згідно з тридцять першим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 20

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. Pertussis (wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63
8	2-Феноксіетанол	1-6 мг	Переважає один з 2 або 2,5 або 3 мг

Згідно з тридцять другим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 21

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 8 або 4 або 16 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63

5

Згідно з тридцять третім втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 22

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивовані антиген В. pertussis(wP)	12-16 КУО	Переважає один з 12 або 14 або 16 КУО
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP

Таблиця 22 (продовження)

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	MEF-1 Тип 2 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 1,5 або 2 або 4 або 8 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63

Згідно з тридцять четвертим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

5

Таблиця 23

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. Pertussis (wP)	12-16 KYO	Переважає один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Sabin		
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 5 або 10 або 20 DU
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63

Згідно з тридцять п'ятим втіленням даного винаходу, багатодозова комбінована вакцинна композиція/склад містить:

Таблиця 24

Сер. №	Компоненти композиції	Антигенних одиниць / 0,5 мл доза	Бажаних антигенних одиниць / 0,5 мл доза (у будь-якій з комбінацій)
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10-25 Lf	Переважає один з 10 або 20 або 25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02-10 Lf	Переважає один з 2 або 4 або 10 Lf
3	Інактивованій антиген В. Pertussis (wP)	12-16 KYO	Переважає один з 12 або 14 або 16 KYO
4	HBs антиген	7-15 мкг	Переважає один з 8 або 10 або 15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	7-13 мкг PRP	Переважає один з 8 або 10 або 13 мкг PRP
6	Інактивованій поліовірус (IPV) серотип Salk		
	Mahoney Тип 1 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 7,5 або 10 або 20 або 40 DU
	Saukett Тип 3 (D антигенних одиниць)	1 – 50 DU	Переважає один з 6 або 10 або 16 або 32 DU
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	0,1 – 0,6 мг	Переважає NMT 0,3 або NMT 0,55 або NMT 0,63

NMT - не більше ніж

10

Відповідно до тридцять шостого втілення даного винаходу, один або більше антигенів фінальної комбінованої вакцинної композиції не можуть істотно адсорбуватися на будь-якому ад'юванті. Згідно тридцять сьомого втілення даного винаходу, рН імуногенної композиції може

знаходиться в діапазоні від pH 6,0 до pH 8,0; більш переважно в діапазоні від pH 6,0 до pH 7,5; ще більш переважно в діапазоні від pH 6,2 до pH 7,2; і найбільш переважно в діапазоні від pH 6,3 до pH 6,8.

Відповідно до тридцять восьмого втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити буферний агент, вибраний із групи, що складається з карбонату, фосфату, ацетату, сукцинату, борату, цитрату, лактату, глюконату і тартрату, а також більш складних органічних буферних агентів, включаючи фосфатний буферний агент, який містить фосфат натрію та/або фосфат калію у співвідношенні, вибраному для досягнення бажаного pH. В іншому прикладі буферний агент містить трис(гідроксиметил) амінометан або "трис", розроблений для досягнення бажаного pH. Ще в іншому прикладі буферний агент може бути мінімальним необхідним середовищем із солями Хенкса. Інші буфери, такі як HEPES, піперазин-N, N'-біс (PIPES) та 2-етансульфонова кислота (MES), також передбачені цим розкриттям. Буфер допомагає стабілізувати імуногенний склад даного винаходу. Кількість буфера може бути в діапазоні від 0,1 mM до 100 mM, переважно вибирають з 5 mM, 6 mM, 7 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM і 30 mM. Ще одним аспектом втілення імуногенна композиція може додатково містити фармацевтично прийнятні експциенти, обрані із групи, що складається з поверхнево-активних речовин, полімерів та солей. Приклади поверхнево-активних речовин можуть включати неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбат 20, полісорбат 80 тощо. Приклади полімерів можуть включати декстран, карбоксиметилцелюлозу, гіалуронову кислоту, циклодекстрин тощо. Приклади солей можуть включати NaCl, 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 бути в діапазоні від 100 mM до 200 mM. Для стабілізації імуногенної композиції можуть бути додані амінокислоти, такі як гістидин, гліцин, аргінін та лізин.

Згідно з тридцять дев'ятим втіленням даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити один або кілька ад'ювантів, вибраних із групи солі алюмінію (Al^{3+}), такої як гідроксид алюмінію ($\text{Al}(\text{OH})_3$) або фосфат алюмінію (AlPO_4), галун, фосфат кальцію, MPLA, 3D-MPL, QS21, CpG-вмісний олігодезоксинуклеотидний ад'ювант, ліпосома або емульсія масло-у-воді. Однак переважно композиція містить фосфат алюмінію (AlPO_4) як ад'ювант. Однак переважно композиція містить гідроксид алюмінію ($\text{Al}(\text{OH})_3$) як ад'ювант. В одному з аспектів тридцять дев'ятого втілення антигени кінцевої композиції можуть адсорбуватися на інсуліновому фосфатному гелі алюмінію або готовому гелі фосфатного алюмінію або їх комбінації. В одному з кращих аспектів тридцять дев'ятого втілення композиція за даним винаходом може містити ад'ювант у кількості 2,5 мг/0,5 мл або менш ніж, а конкретніше, у кількості 1,5 мг/0,5 мл до 0,1 мг/0,5 мл.

Згідно з сороковим втіленням даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити імуностимулюючий компонент, вибраний із групи, що складається з олійно-водної емульсії, MF-59, ліпосоми, ліпополісахариду, сапоніну, ліпиду А, похідних ліпиду А, монофосфориліпиду А, 3-деацильованого монофосфорил ліпиду А, AS01, AS03, олігонуклеотиду, олігонуклеотиду, що включає щонайменше один неметильований CpG та/або ліпосому, ад'ювант Фройнда, повний ад'ювант Фройнда, неповний ад'ювант Фройнда, поліуретанів, поліуретанів, таких як поліоксетилен-поліоксипропіленові кополімери, включаючи блок-кополімери, полімер р 1005, ад'ювант CRL-8300, мураміддипептид, агоністи TLR-4, флагелін, флагеліни, одержані з грамнегативних бактерій, агоністи TLR-5, фрагменти флагелінів, здатні зв'язуватися до рецепторів TLR-5, альфа-С-галактозилцерамід, хітозан, інтерлейкін-2, QS-21, ISCOMS, суміші сквалену (SAF-1), Quil A, субодиницю холерного токсину B, поліфосфазен та похідні, препарати клітинної стінки мікобактерії, похідні міколевої кислоти, неіонні поверхнево-активні речовини блок-сополімерів, OMV, fHbp, комбінація сапоніну зі стеринами та ліпідами.

Відповідно до сорока першого втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити консервант, вибраний із групи, що складається з бензетонію хлориду (фемерол), фенолу, м-крезолу, тіомерсалу, формальдегіду, бензалконію хлориду, бензилового спирту, хлорбутанолу, п-хлор-м-крезолу, або бензилового спирту, або їх комбінації. Композиція вакцини може містити консервант для одноразової імунізації або може містити консервант для багатодозованої імунізації (тобто набір "багатодозова"). Включення консерванту є кращим у багатодозових композиціях. Як альтернатива (або додатково) включенню консерванту в багатодозові композиції, композиції можуть міститися в контейнері, що має асептичний адаптер для видалення матеріалу. Зазвичай кількість консерванту може знаходитися в діапазоні від 0,1 мг до 50 мг.

Відповідно до сорок другого втілення даного винаходу, імуногенна композиція може додатково містити допоміжні речовини, такі як змочувальні або емульгуючі агенти, pH буферні

речовини, добавки, що підвищують гелеутворення або в'язкість, ароматизатори, барвники тощо, залежно від маршруту введення та бажаного препарату.

Згідно з сорок третім втіленням даного винаходу, імуногенна композиція може бути повністю рідкою, але не обмежуватися цим. Відповідні форми рідкого препарату можуть включати розчини, суспензії, емульсії, сиропи, ізотонічні водні розчини, в'язкі композиції та еліксири, які забуферені до бажаного pH.

Імуногенна композиція за даним винаходом може бути у формі трансдермальних препаратів, що включають лосьйони, гелі, спреї, мазі або інші відповідні методи. Якщо потрібне назальне або респіраторне (мукозальне) введення (наприклад, аерозольна інгаляція або інсуфляція), композиції можуть бути у формі та розподілятися за допомогою спреї дозатора нажимного типу, дозатора насосного типу або аерозольного дозатора. Аерозолі зазвичай знаходяться під тиском за допомогою вуглеводню. Дозатори насосного типу можуть переважно видавати дозовану дозу або дозу, що має певний розмір частинок. Коли вони знаходяться у вигляді розчинів, суспензій та гелів, у деяких варіантах втілення, імуногенні композиції містять велику кількість води (переважно очищеної води) на додаток до діючої речовини (речовин).

Згідно з сорок четвертим втіленням даного винаходу зазначена комбінована вакцина може бути стабільною при 2-8° C протягом 12-36 місяців; при 25° C протягом 2-6 місяців; при 37° C протягом від 1 тижня до 4 тижнів.

Відповідно до сорок п'ятого втілення даного винаходу, імуногенна композиція може бути складена для використання в способі зменшення настання або запобігання стану здоров'я, що включає дифтерію, правець, кашлюк, вірус гепатиту В, гемофільну паличку (*Haemophilus influenzae*) типу b, інфекцію поліовірусом, що включає введення імунологічно ефективної кількості імуногенної композиції людині через парентеральне або підшкірне або внутрішньошкірне, внутрішньом'язове або внутрішньочеревне або внутрішньовенне введення або ін'єкційне введення, або тривале вивільнення з імплантатів або введення за допомогою очних крапель, або назальне, ректальне, буккальне або вагінальне, пероральне або внутрішньошлункове або слизове або підязичне, альвеолярне або гінгівальне, обоняльне або дихальне мукозальне введення або будь-які інші маршрути імунізації.

Відповідно до сорок шостого втілення даного винаходу, імуногенна композиція може бути складена у вигляді однократних колбав або багатодозових колбав (колби на 2 дози або 5 доз або 10 доз) або багатодозового набору, або у вигляді попередньо заповнених шприців, де зазначена імуногенна композиція може бути надана у схемі введення однократної дози, або бажано схемі багатократного прийому, де за первинним курсом вакцинації слідують 1-3 окремі дози, що надають через наступні інтервали часу через 1-3 роки, якщо це необхідно. Режим дозування також, щонайменше частково, визначатиметься залежно від необхідності в бустерній дозі, необхідній для надання захисного імунітету.

І все ж переважно імуногенна композиція може бути складена для введення людині або дітям віком від 2 років згідно з двома режимами дозування, що складаються з першої дози та другої дози через наступні інтервали часу через 1-3 роки. Однак переважно імуногенну композицію можна вводити одночасно з іншими лікарськими засобами або будь-якою іншою вакциною.

Відповідно до сорок сьомого втілення даного винаходу, авторами даного винаходу було виявлено, що багатодозова повністю рідка комбінована вакцина з покращеною імуногенністю та зниженою реактогенністю може бути одержана, коли вакцину одержують способом, розкритим нижче, з урахуванням i) способу одержання окремих антигенів ii) послідовності додавання антигенів; iii) використання специфічних ад'ювантів у певній кількості для певних антигенів; iv) індивідуальної адсорбції або комбінованої адсорбції антигенів на ад'ювантах; v) ступеню адсорбції антигену на ад'ювантах vi) використання мінімальної концентрації галунів vii) використання оптимальної концентрації та типу консерванту та viii) використання різних параметрів, включаючи перемішування, температуру та pH.

Біологічне джерело штамів, використаних у комбінованій вакцині SIPL:

ДИФТЕРІЙНИЙ АНАТОКСИН:

Штам *Corynebacterium diphtheriae* PW8 CN2000 одержували від Wellcome Research Laboratory, London, United Kingdom, National Control Authority Central Research Institute (C.R.I.) Kasauli, Himachal Pradesh, India у ліофілізованій формі у 1973 р. Штам реактивували та додатково ліофілізували в умовах головного посівного матеріалу - *C. diphtheriae* CN2000 A1 при C.R.I. Kasauli.

ПРАВЦЕВИЙ АНАТОКСИН:

Штам *Clostridium tetani*, штам Harvard № 49205, одержували від The Rijks Institute Voor de Volksgezondheid (Netherlands), National Control Authority C.R.I. Kasauli, у ліофілізованій формі.

КАШЛЮК:

Одержання нефасованої вакцини кашлюку SIPL включає застосування чотирьох штамів *Bordetella pertussis*, а саме штамми 134, 509, 6229 та 25525. Головний посівний матеріал штамів 134 та 509, що походив з Rijks Institute, The Netherlands, одержували від National Control Authority, Central Research Institute, Kasauli, Himachal Pradesh, India. Головний посівний матеріал штамів 6229 та 25525 походив з Lister Institute, England.

ГЕПАТИТ В:

Rhein Biotech (Germany) було сконструйовано рекомбінантний штам *Hansenulapolyomorpha*, що містив HBsAg ген поверхневого антигена. Rhein Biotech також одержував з Головного клітинного банку (MCB *Hansenulapolyomorpha* K3/8-1 штам ADW, 12/94) та виконували усі характеристичні тести на цьому банку.

НАЕМОФИЛУС ИНФЛУЕНЗАЕ ТИП b:

Донорний організм для генерування клітинного субстрату являє собою *Haemophilus influenzae* тип b, штам 760705. Штам спочатку виділяли з хлопчика віком 2 роки та 2 місяці (народженого 14-8-74) у листопаді 1976 р. Три переноса штамів проводили перед зберіганням при -70 °C в Academic Medical Centre (AMC), University of Amsterdam. Цей штам переносили у SIPL у ході співробітництва між SIPL та Netherlands Vaccines Institute (NVI, The Netherlands).

IPV:

Штам та джерело поліовірусу Salk наведено нижче.

Поліовірус тип 1:

Штам: Mahoney

Джерело: Bilthoven Biologicals, Netherlands

Поліовірус тип 2:

Штам: MEF1

Джерело: Bilthoven Biologicals, Netherlands

Поліовірус тип 3:

Штам: Saukett

Джерело: Bilthoven Biologicals, Netherlands

У цій заявці під словом "містити" або такими варіантами, як "містить" або "що містить" мається на увазі включення зазначеного елемента, цілого чи стадії або групи елементів, цілих чи стадій, але не виключення будь-якого іншого елемента, цілого чи стадії, або групи елементів, цілих чи стадій.

Використання виразу "щонайменше " або "щонайменше один" передбачає використання одного або декількох елементів або інгредієнтів або кількостей, оскільки використання може бути у втіленні винаходу для досягнення одного або декількох бажаних об'єктів або результатів. Хоча були описані певні втілення винаходів, ці втілення були представлені лише як приклади і не призначені для обмеження обсягу даних винаходів. Варіації або модифікації композиції за даним винаходом, що входять до обсягу даного винаходу, можуть виникнути у фахівців в даній області при перегляді розкриття у цій заявці. Такі варіації або модифікації цілком відповідають суті даного винаходу.

Числові значення, наведені для різних фізичних параметрів, розмірів і величин, є лише приблизними значеннями, і передбачається, що значення, вищі за числові значення, присвоєні фізичним параметрам, розмірам і величинам, входять до обсягу даного винаходу, якщо в заявці відсутня заява про протилежне. Незважаючи на те, що у цій заявці було зроблено значний акцент на специфічних особливостях кращого втілення даного винаходу, буде зрозуміло, що можна додати декілька додаткових ознак і що можна зробити велику кількість змін у кращому втіленні, не відступаючи від принципів розкриття даного винаходу. Ці та інші зміни у кращому варіанті розкриття даного винаходу стануть очевидними для фахівців у даній галузі, при цьому слід чітко розуміти, що вищезазначений опис слід тлумачити лише як ілюстрацію розкриття даного винаходу, а не як його обмеження.

ПЕРВАГИ ДАНОГО ВИНАХОДУ

Даний винахід, описаний у цій заявці вище, має низку технічних вдосконалень та переваг, включаючи, але не обмежуючись наведеним, реалізацію комбінованої вакцинної композиції, що містить D, T, wP, HBsAg, Hib PRP-TT кон'югат та IPV, а також спосіб її одержання. У порівнянні з іншими комбінованими композиціями вакцин, даний опис забезпечує такі переваги:

1. Повністю рідка комбінована вакцина

2. Знижена доза антигену IPV порівняно зі стандартною дозою, що демонструє порівнянну ефективність порівняно зі стандартною дозою (40-8-32 DU)

3. Покращена імуногенність D, T, wP, HepB, Hib, IPV антигену

4. Покращена стабільність при температурі 2-8 °C та кімнатній температурі, яку випробовували протягом 12 місяців

5. Високоочищені дифтерійні анатоксини (D) і правцеві анатоксини (T), вироблені із використанням напівсинтетичного середовища, вільного від трансмісивної губчастої енцефалопатії (TSE) або бичачої губчастої енцефалопатії (BSE).

6. Цілісноклітинний антиген *B. pertussis* (wP) містить штами *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229 у співвідношенні 1:1:0,25:0,25, тим самим покращуючи специфічну активність та імуногенність відносно *B. pertussis*.

10. Удосконалений метод інактивації цільноклітинного компонента *B. pertussis* (wP) із використанням комбінації нагрівання та формальдегідної інактивації. Спосіб не використовує тіомерсалу та інактивованого цільноклітинного антигена кашлюку, залишається таким, що не утворює комків, та однорідним, що призводить до зниження реактогенності та надання кращої специфічної активності протягом тривалого часу.

15. 8. Низький вміст вільних PRP (менш ніж 7 %) в балку кон'югатів PRP-TT гемофільної палички типу b

9. Відсоток адсорбції антигену Hib на будь-якому ад'юванті становить менш ніж 20 %.

20. 10. Покращений профіль адсорбції антигену дифтерійного анатоксину (D), антигену правцевого анатоксину (T) та поверхневого антигену гепатиту В (HepB), адсорбованого індивідуально на ад'юванті фосфату алюмінію, тим самим покращуючи специфічну активність та імуногенність.

11. Мінімальний загальний вміст галунів (Al^{3+}), тим самим забезпечуючи знижену реактогенність.

25. 12. Оптимізована концентрація 2-феноксіетанолу (2-PE) та, щонайменше, одного парабенowego естеру (метилпарабену або пропілпарабену) як консерванту, завдяки чому ефективно підтримується антимікробна здатність багатодозованої повністю рідкої комбінованої вакцини.

ПРИКЛАДИ

30. Наведені нижче приклади включені для демонстрації кращих втілень даного винаходу. Фахівці в даній галузі повинні оцінити, що композиції та методи, розкриті в таких прикладах, являють собою методи, відкриті авторами даного винаходу, що добре функціонують при реалізації даного винаходу, і, отже, можуть вважатись кращими режимами при реалізації даного винаходу. Однак фахівці в даній галузі повинні, в контексті даного розкриття, розуміти, що до конкретних втілень даного винаходу, які розкриваються, може бути внесено багато змін, але буде все одно одержано подібний або такий самий результат, не відступаючи від суті та обсягу даного винаходу.

35. Приклад 1: Різні комбінації композицій вакцини відповідно до даного винаходу

Таблиця 25

Комбінована вакцина, що містить IPV (штам Salk тип 1 (Mahoney) або тип 2 (MEF) або тип 3 (Saukett))

S. No.	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного винаходу [на 0,5 мл доза]											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf
3	Інактивованний антиген B, Pertussis (wP)	12 КУО	12 КУО	12 КУО	12 КУО	12 КУО	12 КУО	12 КУО	12 КУО	14 КУО	14 КУО	14 КУО	14 КУО
4	HBs антиген	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг
5	Hib PRP-TT кон'югований антиген	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP

Таблиця 25 (продовження)

S. No.	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного винаходу [на 0,5 мл доза]											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6	Інактивовані поліовірус (IPV)												
	Тип 1 (D антиген-них одиниць)	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40
	Тип 2 (D антиген-них одиниць)	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--
	Тип 3 (D антиген-них одиниць)	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг
8	2-Феноксі-етанол	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг
9	Метил-парабен	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	--	--	--	--	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг
10	Пропіл-Парабен	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--

Таблиця 25 (продовження)

S. No.	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного винаходу [на 0,5 мл дозу]											
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Дифтерій-ний анатоксин (D)	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf
3	Інактивовані антиген B. Pertussis (wP)	14 КУО	14 КУО	14 КУО	14 КУО	16 КУО	16 КУО	16 КУО	16 КУО	16 КУО	16 КУО	16 КУО	16 КУО
4	HBs антиген	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгова-ний антиген	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV)												
	Тип 1 (D антигенних одиниць)	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40	7,5або 10 або 20 або 40
	Тип 2 (D антигенних одиниць)	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--	1,5 або 2 або 4 або 8	--
	Тип 3 (D антигенних одиниць)	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32	6 або 10 або 16 або 32
7	Загальний вміст алюмінію (Al^{3+}) (як фосфат алюмінію)	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг
8	2-Феноксіетанол	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг
9	Метилпарабен	--	--	--	--	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	--	--	--	--
10	Пропілпарабен	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--

Додатково регулюють рН композиції, як описано вище, до приблизно від 6,0 до 7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію, та доповнюють об'єм, додаючи звичайний фізіологічний розчин (0,9 %). Вакцина може містити сліди глутаральдегіду, формальдегіду, неоміцину, стрептоміцину та поліміксину В, які використовуються в спосіб виробництва.

Таблиця 26

Комбінована вакцина, що містить IPV (штам Sabin: Тип 1, тип 2 та тип 3)

S. No.	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного винаходу [на 0,5 мл доза]											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Дифтерійний анатоксин (D)	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf
3	Інактивовані антиген B. Pertussis (wP)	12 KYO	12 KYO	12 KYO	12 KYO	12 KYO	12 KYO	12 KYO	12 KYO	14 KYO	14 KYO	14 KYO	14 KYO
4	HBs антиген	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	8 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	8 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV)												
	Тип 1 (D антиген-них одиниць)	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20
	Тип 2 (D антиген-них одиниць)	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--
	Тип 3 (D антиген-них одиниць)	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг
8	2-Фенокси-етанол	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг
9	Метил-парабен	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	--	--	--	--	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг
10	Пропіл-парабен	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--

Таблиця 26 (продовження)

S. No.	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного винаходу [на 0,5 мл доза]											
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Дифтерійний анатоксин (D)	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf	25 Lf
2	Правцевий анатоксин (T)	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf
3	Інактивовані антиген B. Pertussis (wP)	14 KYO	14 KYO	14 KYO	14 KYO	16 KYO	16 KYO	16 KYO	16 KYO	16 KYO	16 KYO	16 KYO	16 KYO
4	HBs антиген	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг	15 мкг
5	Hib PRP-ТТ конюгований антиген	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	10 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP	13 мкг PRP
6	Інактивовані поліовірус (IPV)												
	Тип 1 (D антиген-них одиниць)	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20	5 або 10 або 20
	Тип 2 (D антиген-них одиниць)	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--	4 або 8 або 16	--
	Тип 3 (D антиген-них одиниць)	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32	10 або 16 або 32
7	Загальний вміст алюмінію (Al ³⁺) (як фосфат алюмінію)	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг	Не більше ніж 0,55 мг

Таблиця 26 (продовження)

S. No.	Компоненти композиції	Комбінована композиція відповідно до даного винаходу [на 0,5 мл доза]											
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
8	2-Феноксі-етанол	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг	2,5 мг
9	Метил-парабен	--	--	--	--	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	0,9 мг	--	--	--	--
10	Пропіл-парабен	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--	0,1 мг	0,1 мг	--	--

Додатково регулюють рН композиції, як описано вище, до приблизно від 6,0 до 7,0 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію та доповнюють об'єм, додаючи звичайний фізіологічний розчин (0,9 %). Вакцина може містити сліди глутаральдегіду, формальдегіду, неоміцину, стрептоміцину та поліміксину В, які використовуються в спосібі виробництва.

Приклад 2: спосіб виробництва кон'югатного балку *Haemophilus influenzae* Тип b
Загальний огляд стадій одержання наведено на Фігурі 1 у вигляді блок-схеми. Кожна зі 53 стадій способу стисло описана нижче:

Стадія 1: колба для струшування інокуляту на Стадії I (S1):

Колба з робочим матеріалом насіння використовується для висівання струшувальної колби на стадії інокуляту, що містить відфільтроване насіннєве середовище 0,22 мкм. Використовується одноразова колба PETG 125 мл з робочим об'ємом 25 мл. Ця стадія проводиться в шейкері-інкубаторі з контрольованим перемішуванням (200 ± 50 об/хв) і температурою (36 ± 2 °C). Після досягнення відповідного росту бактерій ($OD_{590} \geq 1,0$) культуру переносять на наступну стадію інокуляту (стадія S2), яка описана на Стадії 2. Забарвлення за Грамом проводиться в якості контролю в спосібі для забезпечення чистоти культури (Грамнегативні *cocobacilli*).

Стадія 2: колба для струшування інокуляту на Стадії II (S2):

Стадія інокуляту S2 складається з 2-літрових колб Фернбаха (S2A та S2B) об'ємом 800 мл. Для вимірювання OD_{590} використовується колба S2A, поки OD_{590} не відповідатиме критеріям прийнятності, а колба S2B використовується для стадії S3 інокуляції. В обидві колби дозують стерилізоване фільтром середовище, що ідентично стадії інокуляції S1. Колба стадії S1 використовується для посіву обох струшувальних колб II стадії. Ця стадія проводиться в шейкері-інкубаторі з контрольованим перемішуванням (200 ± 50 об/хв) і температурою (36 ± 2 °C). Після досягнення відповідного росту бактерій ($OD_{590} \geq 1,0$) культуру переносять на наступну стадію інокуляту (стадія S3), яка описана на стадії 3. Забарвлення за Грамом проводиться в якості контролю в спосібі для забезпечення чистоти культури (Грамнегативний *cocobacilli*).

Стадія 3: ферментатор інокуляту на Стадії III:

Стадія S3 інокуляту складається з ферментатора 120 л з робочим об'ємом 35 л. Ферментатор дозують із середовищем, ідентичним попереднім стадіям інокуляту. Колба на стадії S2 використовується для засівання ферментатора інокулятом. Зростання проводять при температурі (36 ± 2 °C), DO (10 % заданого значення), перемішуванні (300-600 об/хв), аерації (1-5 LPM) і зворотному тиску (0,2 бар) у ферментаторі інокуляту. Після досягнення відповідного росту бактерій ($OD_{590} \geq 1,0$) культуру переносять на наступну стадію одержання (стадія S4), яка описана на стадії 4. Забарвлення за Грамом проводиться в якості контролю в спосібі, щоб забезпечити чистоту культури (грамнегативний *cocobacilli*).

Стадія 4: 1200 л ферментація масового виробництва:

Виробничий ферментер об'ємом 1200 л має робочий об'єм 800 л. В нього дозують компоненти базальних середовищ та стерилізують парою *in-situ*. Потім через фільтр 0,22 мкм до середовища додають різні добавки. Ферментатор інокулюють культурою стадії S3, одержаною на стадії 3. Ферментацію проводять під контролем розчиненого кисню (20 % - задана температура), температури (36 ± 2 °C), рН (7,1-7,4), перемішування (40-400 об/хв), аерації (50-300 LPM) і протитиску (0,2 бар). Під час бродіння додаються два дискретні поживні добавки (спайки). Зростання контролюють вимірюванням OD_{590} ($OD_{590} \geq 3,5$) і бродіння вважають завершеним після досягнення стаціонарної стадії. Під час зростання та стаціонарної фази полісахаридний продукт виділяється і накопичується в культуральному бульйоні. Забарвлення за Грамом проводиться як контроль в спосібі, щоб забезпечити чистоту культури (грамнегативні *cocobacilli*).

Стадія 5: обробка формаліном:

Зменшення біонавантаження на цій стадії досягається за допомогою хімічного агента (формалін). Додають 0,1 % формаліну і ферментований бульйон інкубують протягом не менш

ніж 2 годин при 37 °С. Після обробки формаліном посудину швидко охолоджують до <15 °С. Додавання формаліну перевіряється для досягнення зменшення біонавантаження. Це підтверджують культуральні планшети після інкубаційного періоду. Поживне середовище зі зменшеним біонавантаженням готовий до збирання, як описано на стадії 6.

5 Стадія 6: збір клітин за допомогою центрифуги безперервної дії:

Центрифугування безперервної дії застосовується як основний етап збирання. Цей етап виконується для відділення полісахариду, що містить неочищений бульйон від інактивованої біомаси. Використовується центрифугування безперервної дії з метою видалення >90 % біомаси, що вимірюють за допомогою зменшення OD₅₉₀. Центрифуга функціонує приблизно при 10 15000 g і при швидкості потоку рідини 200-500 л/год. Центрифугований супернатант додатково обробляють, як описано на стадії 7.

Стадія 7: 50LP глибинна фільтрація:

15 Центрифугований супернатант пропускають через глибинний фільтр 50LP для видалення грубих матеріалів, таких як клітинний дебрис. Стадія дозволяє продукту проходити крізь фільтрат і знаходиться в одній лінії з додатковим глибинним фільтром, як описано на стадії 8.

Стадія 8: 90LP глибинна фільтрація:

20 Фільтрат із глибинного фільтра 50LP додатково пропускають через глибинний фільтр 90LP (номінальне навантаження 0,22 мкм) для подальшого видалення будь-якого нерозчинного матеріалу, який, можливо, не був утриманий попереднім глибинним фільтром. Ця стадія гарантує, що фільтрат по суті не містить клітинного дебрису і може надійно проходити крізь фільтр 0,22 мкм. Подальший етап фільтрації описаний на стадії 9.

Стадія 9 та 10: 0,22 мкм фільтрація:

Фільтрат від 90LP глибинного фільтра додатково пропускають через 0,22 мкм фільтр та фільтрат збирають у накопичувальному резервуарі.

25 Стадія 11 та 12: 100kD концентрування та діафільтрація:

Цю стадію проводять для видалення компонентів середовища та невеликих молекулярно-масових домішок. Додатково, проводиться концентрування для зменшення робочого об'єму. Вибірають граничне значення молекулярної маси 100 кД, оскільки молекулярна маса полісахариду Hib (PRP) становить ≥ 500 кД. Поживний розчин концентрують приблизно в 10 30 разів і потім діафільтрують для не менш ніж 5 об'ємів, використовуючи 0,01 М буфер PBS (pH 7,2). Одержаний у результаті продукт в ультраконцентраті називають "неочищеним PRP" і додатково обробляють, як описано на стадії 13. Концентрований поживний розчин переносять у зону DSP через порт для перенесення за допомогою фільтра 0,22 мкм, щоб гарантувати, що жодна бактерія не переноситься на DSP ділянку.

35 Стадія 13: осадження STAB:

40 STAB (цетил-триметил-амоній-бромід) являє собою катіонний детергент, який використовується для осадження полісахаридів. STAB складається з гідрофільної частини, а також гідрофобної частини і осаджує білок, нуклеїнову кислоту та полісахарид. Неочищений PRP, одержаний на стадії 12, осаджують при 1 % концентрації STAB і інкубують протягом >2 годин. Збирання гранул STAB описано на стадії 14.

Стадія 14, 15 та 16: центрифугування, збір та зберігання гранул STAB:

У SEZ-3, FF, гранула STAB центрифугується за допомогою безперервної центрифуги при 15000 об/хв. Гранулу STAB збирають, зважують, розподіляють на аліквоти та зберігають при ≤ 20 °С для подальшої обробки. Це перша стадія зберігання у процесі.

45 Стадія 17 та 18: розморожування та розчинення пасти STAB:

50 Заморожену пасту STAB розморожують до кімнатної температури. Розморожену гранулу розчиняють у 5,85 % розчині NaCl. Розчинення проводять у змішувальному чані, а полісахаридний продукт розчиняють у водній фазі. Чан містить нерозчинений матеріал, який надходить з осаджених білків та нуклеїнової кислоти. Ця суспензія додатково обробляється, як описано на стадії 19.

Стадія 19: центрифугування:

Матеріал, одержаний на стадії 18, центрифугують при 2-8 °С, 5000-6500 об/хв протягом 20-30 хвилин для видалення нерозчиненого матеріалу. Центрифугований супернатант збирають і додатково обробляють, як описано на стадії 20,

55 Стадія 20: 72 % осадження етанолом:

72 % етанол використовується для осадження PRP. 96 % етанол використовують для одержання кінцевої концентрації 72 % етанолу відносно надосадової рідини, одержаної на стадії 19. Це осадження проводять при 2-8 °С протягом ночі. Одержаний осад збирають, як описано на стадії 21.

60 Стадія 21 та 22: центрифугування та розчинення гранул:

72 % етанольний осад збирають центрифугуванням при 2-8 °С, 5000-6500 об/хв протягом 20-30 хвилин. Одержану гранулу розчиняють у W.F.I. до візуальної прозорості. Подальша обробка солюбілізованої гранули описана на стадії 23.

Стадія 23: осадження DOC та 32 % етанолом:

5 До матеріалу, одержаного на стадії 22, додають 6 % ацетату натрію та 1 % дезоксихолату натрію (DOC). 96 % етанол використовується для одержання кінцевої концентрації 32 % етанолу. Як DOC, так і 32 % спирт сприяють осадженню білкових домішок, дозволяючи при цьому полісахариду знаходитися в рідкій фазі. Таке осадження проводять при 2-8 °С протягом ночі (щонайменше 8 годин).

10 Стадія 24: центрифугування:

Матеріал, одержаний на стадії 23, центрифугують при 2-8 °С, 5000-6500 об/хв протягом 20-30 хвилин для видалення осаду. Центрифугований супернатант збирають і додатково обробляють, як описано на стадії 25.

Стадія 25: глибинне фільтрування та фільтрування через шар активованого вугілля:

15 Розчин надосадової рідини, одержаний на стадії 24, містить розчинний PRP і його піддають глибинній фільтрації з подальшою фільтрацією через шар активованого вугілля для видалення нуклеїнових кислот та барвників. Видалення нуклеїнових кислот контролюється шляхом періодичного вимірювання поглинання при 260 нм (A_{260}). Після досягнення цільового A_{260} розчин фільтрують через 0,22 мкм фільтр і цей відфільтрований розчин додатково обробляють, як описано на стадії 26.

20 Стадія 26: осадження 64 % етанолом:

Відфільтрований матеріал, одержаний на стадії 25, додатково осаджують 96 % етанолом з кінцевою концентрацією 64 % етанолу. Таке осадження проводять при 2-8 °С протягом ночі. Одержаний осад збирають шляхом центрифугування та подальшої обробки, як описано на стадії 27.

25 Стадія 27: збирання та розчинення гранул:

Надосадову рідину зливають та відкидають для збору гранул. Гранула розчиняється в W.F.I. при кімнатній температурі.

Стадія 28: концентрування та діафільтрація 300 кД:

30 Розчин розчинених гранул концентрують із використанням мембрани NMWCO 300 кД. Його додатково діафільтрують щонайменше 8X за допомогою W.F.I. Одержаний ультраконцентрат додатково обробляють, як описано на стадії 29.

Стадія 29 та 30: 0,22 мкм фільтрування та зберігання очищеного PRP:

35 UF ультраконцентрат 300 кД пропускають через фільтр 0,22 мкм як стадію освітлення для мінімізації біонавантажень. Одержаний очищений PRP розподіляють на аліквоти і зберігають при ≤ -20 °С до подальшого використання, як описано на стадії 31. Зразок очищеного PRP направляють на аналіз контролю якості (Q.C).

Стадія 31: розморожування та об'єднання:

40 На основі розміру кон'югованої партії розморожують відповідну кількість природного полісахариду, одержаного на стадії 30. Об'єднаний матеріал аналізують на вміст PRP, який необхідний для подальшої обробки, як описано на стадії 32.

Стадія 32: концентрування 100 кД:

45 Для подальшої обробки б'єднаний очищений полісахарид повинен мати мінімальну концентрацію (8-12 мг/мл). Якщо концентрація полісахариду в пулі нижче цільової, об'єднаний розчин полісахариду концентрують за допомогою мембрани 100 кД UF NMWCO. Зразок відбирають після концентрування, щоб забезпечити досягнення мінімальної концентрації для таких стадій (стадія 33).

Стадія 33: лужна деполімерізація:

50 Концентрований полісахарид (еквівалентний 74 г/110 г), одержаний на стадії 32, деполімеризується в м'яких лужних умовах із використанням карбонатно-бікарбонатного буфера. Після досягнення цільового розміру полісахариду деполімеризований полісахарид активують, як описано на стадії 34.

Стадія 34: активіція полісахариду:

55 Деполімеризований полісахарид, одержаний на стадії 33, активують за допомогою бромістого ціаногену. Ця активація здійснюється в азотному середовищі. Бромістий ціаноген є високотоксичною хімічною речовиною, і під час роботи з цією хімічною речовиною додержуються належних заходів безпеки.

Стадія 35: приєднання лінкера:

60 Свіжоодержаний розчин дигідрозиду адипінової кислоти (DH) додають протягом 6-10 хвилин до реакційної суміші, одержаної на стадії 34. Реакцію проводять протягом щонайменше

16 годин при 2-10 °C. Роль лінкера ADH полягає у забезпеченні амінових груп у полісахариді, необхідних для реакції кон'югації.

Стадія 36: концентрування та діалізація:

5 Реакційну суміш, одержану на стадії 35, концентрують і діалізують об'єм за об'ємом з фосфатним буферним розчином (PBS), використовуючи 10 кД NMWCO UF мембрану для видалення вільного ADH. Видалення ADH контролюють за допомогою BEX і продовжують діалізацію, поки рівень вільного ADH не досягне нижче 5 %. Одержаний ультраконцентрат додатково діалізують за допомогою буфера NLT 5X MES-NaCl. Далі його концентрують для досягнення концентрації щонайменше 20 мг/мл. Цей концентрований оброблений PRP

10 витримують при 2-8 °C до подальшого використання, як описано на стадії 37.

Стадія 37 та 38: фільтрування 0,22 мкм та зберігання обробленого PRP:

Ультраконцентрат зі стадії 36 пропускають через фільтр 0,22 мкм, що являє собою стадію освітлення. Це також гарантує, що рівень біонавантажень контролюється під час способу, який виконується в зоні ступеню C. Відфільтрований активований полісахарид збирають, відбирають

15 проби, розподіляють на аликвоти і зберігають при 2-8 °C до подальшої обробки. Проби відбирають із обробленого полісахаридного пулу для аналізу, який включає молекулярний розмір PRP (кД), вміст PRP та ступінь активації PRP. Подальша обробка обробленого PRP описана на стадії 40,

Стадія 39: концентрування та діалізація TT 10 кД:

20 Реакція кон'югації потребує двох компонентів, а саме, обробленого полісахариду і біка-носія (TT). Білок-носії концентрують і діалізують за допомогою буфера MES-NaCl, використовуючи мембрану 10 кД UF NMWCO. Потім цей діалізований білок-носії додатково концентрують до щонайменше 20 мг/мл за допомогою тієї самої мембрани.

Стадія 40: кон'югація:

25 Реакція кон'югації потребує двох компонентів, а саме, обробленого полісахариду і білка-носія (TT). Активований полісахаридний компонент одержують на стадії 38. Білок-носії одержують на стадії 39. Два компоненти змішують у відповідних кількостях у співвідношенні PRP:TT=1:1 (мас./мас.) у присутності EDC при перемішуванні. Реакцію кон'югації контролюють за допомогою BEX і продовжують до досягнення $\geq 85\%$ перетворення білка (на основі перетворення вільного білка на кон'югат).

Стадія 41: гасіння:

Після того, як реакція кон'югації пройшла до критеріїв прийнятності для конверсії (стадія 40), реакцію припиняють гасінням. Реакцію кон'югації гасять за допомогою фосфатного буфера EDTA. Ця реакція кон'югації потім обробляється, як описано на стадії 42.

35 Стадія 42: 30 SP та 0,22 мікронна фільтрація:

Кон'югат, одержаний на стадії 41, фільтрують через 30 SP фільтр з подальшою фільтрацією 0,22 мкм. Це забезпечує видалення будь-яких великих конгломератів. Відфільтрований кон'югат обробляють, як описано на стадії 43.

Стадія 43: 300 кД ультрафільтрація та діалізація:

40 Реакційну суміш кон'югації, одержану на стадії 42, діалізують з 0,05 % сольовим розчином, використовуючи мембрану 300 кД UF NMWCO. Діалізацію проводять для видалення реагентів кон'югації та непрореагованого TT. Одержаний ультраконцентрат додатково обробляють, як описано на стадії 44.

Стадія 44 та 45: 0,22 мкм фільтрація та зберігання неочищеного кон'югату:

45 Ультраконцентрат зі стадії 43 пропускають через фільтр 0,22 мкм, що являє собою стадію освітлення. Це також гарантує, що рівень біонавантажень контролюється під час способу, який виконується в зоні ступеню C. Відфільтрований неочищений кон'югат збирають, відбирають проби і зберігають при температурі 2-8 °C до подальшої обробки. Подальша обробка неочищеного кон'югату описана на стадії 46.

50 Стадія 46: розведення неочищеного кон'югату:

Неочищений кон'югат зі стадії 45 розбавляють W.F.I. до цільової концентрації 4 ± 1 мг/мл, якщо потрібно, і додатково обробляють на стадіях осадження, описаних на стадії 47.

Стадія 47: осадження сульфату амонію:

55 Розведену реакційну суміш кон'югату додатково обробляють для видалення незв'язаного PRP із застосуванням сульфату амонію (50 % мас./об. стокового розчину). Стадію осадження проводять при температурі менш ніж 15 °C при перемішуванні. Стадія осадження осаджує кон'югат і залишає вільний PRP в надосадковій рідині. Після додавання сульфату амонію одержану суспензію зберігають при температурі менш ніж 15 °C без перемішування протягом щонайменше 12 годин.

60 Стадія 48: збирання та розчинення гранул:

Суспензію, одержану на стадії 47, центрифугують при ~7000 g при 2-8 °C протягом 40±10 хвилин. Надосадову рідину відкидають декантацією, а одержану гранулу розчиняють у трис-буферному розчині.

Стадія 49: 300 кД діафільтрація:

5 Одержаний розчин зі стадії 48 фільтрують через глибинний фільтр 30 SP і діафільтрують за допомогою 20 мМ трис-буферного розчину, використовуючи мембрану NMWCO 300 кД.

Стадія 50: очищення за допомогою гель-фільтраційної хроматографії (GPC):

10 Одержаний на стадії 49 розчин завантажують у колонку GPC на приблизно 70 л, що містить гранули гідроксильованою метакрилового полімерного геля toyopearl HW-65F для гель-фільтраційної хроматографії. Застосування GPC-хроматографії для обробленого кон'югату (після сульфату амонію) знижує рівень вільного PRP в одержаному матеріалі. Колонку елюють 20 мМ трис 0,9 % NaCl і фракції збирають на основі A₂₈₀. Відповідні фракції, засновані на критеріях прийнятності щодо вільного PRP, співвідношення та молекулярного розміру, об'єднують, і пул додатково обробляють, як описано на стадії 51.

15 Стадія 51: 300 кД діафільтрація:

Одержаний об'єднаний кон'югат елюату зі стадії 50 діафільтрують за допомогою 20 мМ трис, використовуючи мембрану 300 кД UF NMWCO. Цей об'єм ультраконцентрату заплановано таким чином, що вміст PRP у ньому становить приблизно 1 мг/мл.

Стадія 52 та 53: 0,22 мкм фільтрація:

20 Балк кон'югат, одержаний на стадії 51, фільтрують через 0,22 мкм фільтр в середовищі ступеню А для забезпечення стерильності. Фільтр 0,22 мкм перевіряють на цілісність. Зразок відфільтрованого балк кон'югату направляють на контроль якості для повного аналізу. Відфільтрований кон'югат позначають як "Стерильний об'ємний кон'югат Hib" і зберігають при 2-8 °C. Об'ємний кон'югат буде зберігатися при 2-8 °C максимум до 3 місяців, а потім, якщо він не використовується, він може зберігатися при -70 °C загалом тривалістю до 1 року.

Отримані характеристики якості Hib PRP-ТТ кон'югованого антигена, були такими:

Вміст PRP (мкг/0,5мл): 8.1

Співвідношення (PRP:ТТ): 0,5

Вільний PRP (%): 4,8 %

30 PMW (кД): 983

Сер MW (кД): 752

Приклад 3: спосіб одержання інактивованого wP антигену

Спосіб інактивації цільноклітинного антигену кашлюку (wP):

35 Оптимізація способу інактивації проводиться після проведення різних експериментів, які включають інактивацію при 56 °C протягом 10 хвилин у присутності формальдегіду, 56 °C протягом 15 хвилин у присутності формальдегіду, 56 °C протягом 10 хвилин у присутності гіаміну, 56 °C протягом 15 хвилин у присутності гіаміну і тільки нагрівання при 56 °C протягом 30 хв. При використанні цих способів не спостерігається суттєвої різниці в специфічній активності. З цих способів, вибирають такий, що проводять при 56 °C протягом 10 хвилин у присутності формальдегіду, оскільки клітинна маса кашлюку, одержана цим методом, є більш однорідною порівняно з іншими зазначеними вище способами.

Спосіб одержання інактивованого wP антигену включає такі стадії:

а). інактивація при 56 °C протягом 10 – 15 хвилин у присутності формальдегіду Bordetella pertussis штамів 134

45 б). інактивація при 56 °C протягом 10 – 15 хвилин у присутності формальдегіду Bordetella pertussis штамів 509

с). інактивація при 56 °C протягом 10 – 15 хвилин у присутності формальдегіду Bordetella pertussis штамів 25525 та 6229

50 с). інактивація при 56 °C протягом 10 – 15 хвилин у присутності формальдегіду Bordetella pertussis штамів 6229

д). наступне змішування інактивованих Bordetella pertussis штамів 134, 509, 25525 та 6229 у співвідношенні 1:1:0,25:0,25.

е). необов'язково адсорбують на адювант на основі алюмінію.

55 Спосіб позбавлений тіомерсального та інактивованого цільноклітинного антигена кашлюку, не викликає утворення комків та призводить до однорідності, що призводить до зниження реактогенності та надання кращої специфічної активності протягом тривалого часу.

Приклад 4: Спосіб одержання інактивованого поліовірусу (IPV)

1. Поліовірус може бути вирощений таким способом:

60 а) Клітинна лінія CCL81-VERO (нирка мавпи) використовувалась як клітина-хазяїн для вирощування вірусів поліомієліту, тобто штамів sabin та salk.

б) Після зараження клітин-хазяїв необхідним штамом поліовірусу та інкубації протягом 72 годин, середовище, що містить вірус та клітинний дебрис, об'єднували та збирали в одному контейнері.

5 с) Фільтрат піддавали фільтруванню тангенціальним потоком за допомогою касети 100 кДа; діафільтрували за допомогою фосфатного буфера і очищали за допомогою аніонообмінної хроматографії.

д) Перед введенням пацієнтам віруси повинні бути інактивовані, використовуючи відповідні методи інактивації.

2. Інактивація формаліном включає такі стадії:

10 а) Очищений пул вірусів піддавали буферному обміну з фосфатного буфера на буфер Тріс в діапазоні (30-50 мМ), що має рН від 7 до 7,5,

б) До зазначеної вище суміші додавали середовище М-199, що містить гліцин (5 г/л)

с) додавали 0,025 % формальдегіду з наступним перемішуванням,

15 д) Потім суміш інкубували при 37 °С протягом 5-13 днів при безперервному перемішуванні вірусного балку на магнітній мішалці,

е) Постінкубаційну суміш піддавали дії проміжної системи TFF (100 кДа, 0,1 м²) на 7 день та остаточній фільтрації після інактивації

ф) Потім відфільтровану основну масу зберігали при 2-8 °С,

г) Виконували D-Ag ELISA для визначення одиниці D-Ag

20 h) Потім змішували балк одновалентного пулу IPV типу 1, типу 2 і типу 3 з подальшим утворенням тривалентного або двовалентного IPV (серотип Salk або Sabin)

і) Регулювали рН кінцевої композиції та рН одержували кінцеву композицію з рН від 6 до 6,8.

25 j) Антиген IPV (штами Sabin або Salk) потім додавали до кінцевої комбінованої вакцинної композиції, адсорбованої на ад'юванті (алюмінієвій солі фосфату), присутній у комбінованій вакцині, де відсоток адсорбції IPV антигену для IPV типу 1 знаходився в межах 10-30 %, IPV типу 2 в діапазоні 60-100 % та IPV типу 3 в діапазоні 0-25 %.

3. Процедура одержання композиції IPV (штамів Sabin та Salk) при індивідуальній адсорбції на сіль алюмінію:

30 а) Відбирали бажаний об'єм автоклавного AlPO₄, щоб одержати кінцеву концентрацію галунів (Al³⁺) від 0,1 до 0,8 мг/доза в контейнері на 50 мл

б) Додавали масу IPV з відрегульованою одиницею D-Ag та доповнювали об'єм розчинником (10х М-199+0,5 % гліцину),

с) Коригували рН кінцевої композиції та одержували кінцеву композицію з рН від 6 до 6,8.

35 4) Адсорбований на галуні моновалентний пул, складений відповідно у тривалентний або двовалентний IPV (серотип Salk або Sabin)

Результати:

Було виявлено, що відсоток адсорбції IPV типу 1, 2 та 3 (Sabin та Salk) на сіль фосфату алюмінію (AlPO₄) становить щонайменше 90 %.

40 Авторам даного винаходу вдалося досягти зменшення дози в 2 рази для антигенів поліовірусу (тоді як стандартна доза антигенів поліовірусу становить Тип 1-40 DU, тип 2-8DU, тип 3-32DU).

Таблиця 27

Дослідження адсорбції Sabin IPV на фосфаті алюмінію

	Зразок	Титр (на дозу)	Частинки вірусу (у К)	% незв'язаних у SUP	% адсорбованих на гелі
Тип 1, AlPO ₄	Контроль	5,84	691	NA	
	Al ³⁺ 125 мкг/доза	3,49	3	0,43	99,57
	Al ³⁺ 250 мкг/доза	3,09	1,2	0,17	99,83
	Al ³⁺ 500 мкг/доза	2,94	0,87	0,12	99,87
Тип 2, AlPO ₄	Контроль	5,49	309		
	Al ³⁺ 125 мкг/доза	3,15	1,41	0,45	99,5
	Al ³⁺ 250 мкг/доза	3,09	1,23	0,39	99,6
	Al ³⁺ 500 мкг/доза	3,09	1,23	0,39	99,6
Тип 3, AlPO ₄	Контроль	5,59	389	NA	
	Al ³⁺ 125 мкг/доза	5,34	218	56,04	43,94
	Al ³⁺ 250 мкг/доза	5,24	173	44,47	55,53
	Al ³⁺ 500 мкг/доза	5,16	144	37,01	63,9

Приклад 5: Спосіб одержання комбінованої вакцини

Цей приклад надає стислий опис способу одержання комбінованої вакцинної композиції, що містить D, T, wP, HBsAg, Hib PRP-TT кон'югат, IPV та консервант:

Компонент I - адсорбований на галунах дифтерійний анатоксин

Компонент II - адсорбований на галунах правцевий анатоксин

Компонент III –wP антиген (як описано у Прикладі 3)

Компонент IV - адсорбований на галунах поверхневий антиген гепатиту В

Компонент V-Hib PRP кон'югат (як описано у Прикладі 2)

Компонент VI-IPV антиген (як описано у Прикладі 4)

1. Одержання компоненту I, що містить адсорбований на галунах дифтерійний анатоксин:

а). Перенесення фосфату алюмінію в контейнер/посудину

б). Додавання дифтерійного анатоксину

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

д). Зачекайте стабілізації

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

ф). Зачекайте стабілізації

2. Одержання компоненту II, що містить адсорбований на галунах правцевий анатоксин:

а). Перенесення фосфату алюмінію в контейнер/посудину

б). Додавання правцевого токсину

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

д). Зачекайте стабілізації

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

ф). Зачекайте стабілізації

3. Одержання компоненту IV, що містить адсорбований на галунах поверхневий антиген гепатиту В:

а). Перенесення фосфату алюмінію в контейнер/посудину

б). Додавання поверхневого антигену гепатиту В

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

д). Зачекайте стабілізації

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

ф). Зачекайте стабілізації

4. Спосіб одержання комбінованої вакцинної композиції, що містить D, T, wP, HBsAg, Hib PRP-TT кон'югат, IPV та консервант

1. Додавання ізотонічного розчину хлориду натрію в посудину/контейнер для змішування;

2. Додавання компонента I

3. Змішування компонента II з Компонентом I і перемішування при RT протягом 30-45 хвилин.

4. Додавання компонента III у вищезазначену суміш з подальшим перемішуванням при КТ протягом 30-60 хв.

5. Компонент IV додавали до суміші, одержаної на стадії 4, з подальшим перемішуванням при КТ протягом 30-60 хв.

6. Компонент V додавали до суміші, одержаної на стадії 5, з подальшим перемішуванням при 6-16 °C протягом 30-60 хвилин.

7. Компонент VI додавали до суміші, одержаної на стадії 6, з подальшим перемішуванням при 6-16 °C.

8. Додавання однієї з комбінацій консервантів, описаних нижче, до суміші, одержаної на стадії 7 при 6-16 °C.

а) 2-Феноксіетанол у кількості приблизно від 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.); або

б) 2-Феноксіетанол у кількості приблизно від 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.) і метилпарабен, що використовуються в концентрації 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

с) 2-Феноксіетанол у кількості приблизно від 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.) і пропілпарабен, що використовуються в концентрації 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (об./об.); або

д) 2-Феноксіетанол у кількості приблизно від 1 мг на 0,5 мл до 6 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабен, що використовується в концентрації 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.), і

пропілпарабен, що використовується в концентрації 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.).

9. Перевірте рН, якщо потрібно, відрегулюйте рН від 6,0 до 7,5 за допомогою гідроксиду натрію/карбонату натрію

10. Відрегулюйте об'єм сольовим розчином (0,9 %), одержаним на стадії 9, з подальшим перемішуванням протягом 3 годин.

Приклад 6: адсорбція, специфічна активність та профіль стабільності антигену

Таблиця 28

Ця таблиця надає стислий опис відсотку адсорбції окремих антигенів, специфічної активності та профілю стабільності окремих антигенів у SIPL комбінованій вакцині при 2-8 °C протягом періоду у 12 місяців.

Тест	Ліміти / Специфікація	0 день	6 місяців	12 місяців
Гепатит В Специфічна активність In-Vivo R.P (95 % CL)	(0,61-1,12)	0,83	NA	відповідає
Вміст Hib PRP (мкг/0,5 мл) (усього PRP)	Фактичне значення.	9,3мкг/0,5мл	8,46 мкг / 0,5мл	10,03
незв'язаного PRP (%)		8	NA	NA
Специфічна активність дифтерійного компоненту (МО/доза)	Не менш ніж 30 МО/доза.	98,5120 МО/доза (69,9650- 137,247)	NA	95,8463 МО/доза
Специфічна активність компоненту правцю (МО/доза)	Не менш ніж 40 МО/доза	139,030 МО/доза (88,2850- 208,688)	NA	382,079 МО/доза
Специфічна активність компоненту кашлюку (МО/доза)	Не менш ніж 4 МО/доза	4,6749 МО / доза (2,6492- 8,2763)	4,8410 МО/доза (2,7331- 8,6081)	5,131
Адсорбція гепатиту В (%)	Фактичне значення.	89,44	82,65	75,52
Адсорбція: компонент правцю (%)	Фактичне значення.	63,0	59,0	NA
Адсорбція: дифтерійний компонент (%)	Фактичне значення.	81,0	72,0	NA
D Антиген (DU/0,5 мл) (= 75 % номінального значення є прийнятним)	Тип 1=20 DU / 0,5 мл	22,414	Відповідає	Відповідає
	Тип 2=4 DU / 0,5 мл	4,692	Відповідає	Відповідає
	Тип 3=16 DU / 0,5 мл	22,084	Відповідає	Відповідає
Загальний вміст алюмінію	Не більше ніж 0,6 мг / 0,5 мл	0,2768	NA	NA

NA – Не наявно

Таблиця 29

Стислий опис відсотку адсорбції окремих антигенів, специфічної активності та профілю стабільності окремих антигенів у комбінованій вакцині при 25±2 °C протягом періоду у 12 місяців.

Тест	Ліміти/Специфікація	0 день	6 місяців	12 місяців
Гепатит В Специфічна активність In-Vivo R.P (95 % CL)	NLT 1.0	Відповідає	N.A	Відповідає
Вміст Hib PRP (мкг/0,5 мл) (Усього PRP)	Фактичне значення.	8,6 мкг/0,5 мл	8,20 мкг/0,5 мл	NA
Специфічна активність дифтерійного компоненту (МО/доза)	Не менш ніж 30 МО/доза.	98,5120 МО/доза (69,9650- 137,247)	N.A	96,5482 МО/доза (65,9292- 137,687)
Специфічна активність компоненту правцю (МО/доза)	Не менш ніж 40 МО/доза	139,030 МО/доза (88,2850- 208,688)	N.A	N.A
Специфічна активність компоненту кашлюку (МО/доза)	Не менш ніж 4 МО/доза	4,6749 МО/доза (2,6492- 8,2763)	4,5170 МО/доза (2,4894- 8,2672)	3,4899 МО/доза (1,8699*- 6,4750)
Адсорбція гепатит В (%)	Фактичне значення.	89,44	83,92	83,00
Адсорбція: компонент правця (%)	Фактичне значення.	59,0	31,0	40,0
Адсорбція: компонент дифтерії (%)	Фактичне значення.	79,0	72,0	69,0

Таблиця 29 (продовження)

Тест	Ліміти/Специфікація	0 день	6 місяців	12 місяців
D Антиген (DU/0,5 мл) (= 75 % номінального значення є прийнятним)	Тип 1=20 DU / 0,5 мл	22,414	Відповідає	Відповідає
	Тип 2=4 DU / 0,5 мл	4,692	Відповідає	Відповідає
	Тип 3=16 DU / 0,5 мл	22,082	Відповідає	Відповідає
Загальний вміст алюмінію	Не більш ніж 0,6 мг/0,5 мл	0,2846	NA	NA

NA – Не наявний

Таблиця 30

Ефективність in-vivo комбінованої вакцини зі зниженою та стандартною дозою IPV

Сер. №	Опис	Поліовірус Тип 1			Поліовірус Тип 3			Результат
		Ефективність	Нижній ліміт	Верхній ліміт	Ефективність	Нижній ліміт	Верхній ліміт	
1	Шестива-лентна з 40-8-32 DU IPV	253,3 %	124,9 %	705,6 %	212,2 %	95,3 %	755,5 %	Відповідає
2	Шестива-лентна з 20-4-16 DU IPV	164,4 %	63,9 %	571,3 %	143,2 %	64,3 %	418,6 %	Відповідає
3	Шестива-лентна з 20-4-16 DU IPV	170,0 %	76,4 %	472,5 %	132,3 %	62,6 %	340,5 %	Відповідає
4	Poliovac з повною дозою IPV	98,5 %	30,9 %	279,4	122,8	57,3 %	269,8 %	Відповідає

Спостереження:

5 - Партії шестикомпонентних вакцин, виготовлені з концентрацією IPV у половину дози, показали багатообіцяючі результати випробувань.

- Ефективність IPV in vivo шестивалентної вакцини, виготовленої при половинній концентрації IPV, виявилася порівнянною з наявною в даний час вакциною (Poliovac на ринку, що виробляється SIIPL) із повною дозою IPV.

10 Приклад 7: ТЕСТУВАННЯ ПРОТИМІКРОБНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Автори даного винаходу, розробляючи багатодозові комбіновані вакцини, що містять D, T, wP, Hib, HBsAg та IPV, провели тести на їх антимікробні характеристики, додавши спочатку 2-феноксіетанол (2-PE), який зазвичай застосовували як консервант в даній галузі, в концентрації 2,5 мг/0,5 мл дози. Однак було виявлено, що 2-PE має слабшу антимікробну активність, ніж тіомерсал щодо дріжджів та грибів у комбінованій вакцині на основі DTP. Збільшення кількості 2-PE (консерванту) для задоволення необхідних критеріїв може викликати проблеми безпеки у маленьких дітей, які є суб'єктами, що одержують вакцину, а також може вплинути на стабільність кінцевих продуктів., кількість консервантів, які повинні міститися у вакцинах, повинні відповідати вимогам, визначеним у Фармакопеї США, Європейській Фармакопеї, Фармакопеї ВООЗ або їх комбінації щодо безпеки вакцин. У зв'язку з цим, автори даного винаходу провели експерименти, намагаючись розробити нову композицію, яка може задовольнити вимоги щодо антимікробної здатності, комбінуючи 2-PE з іншими консервантами, такими як парабен, у багатодозовій комбінованій вакцині, яка відповідає критеріям безпеки та антимікробних характеристик. У цьому розкритті тест на антимікробні характеристики проводили згідно з критеріями Європейської фармакопеї категорії B (EP-B) за запитом ВООЗ щодо вакцинних продуктів.

Таблиця 31

Детальний опис різних комбінацій та концентрацій консервантів, протестованих у комбінованій вакцині

Комбінації	1	2	3	4	5	6
Метилпарабен (MP)	--	0,18 %	0,18 %	0,18 %	--	0,18 %
Пропілпарабен (PP)	--	0,02 %	0,02 %	--	0,02 %	0,02 %
2-Феноксіетанол (PE)	0,5 %	0,5 %	0,4 %	0,5 %	0,5 %	--

Скринінг антимікробних характеристик:

Препарати комбінованої шестивалентної вакцини, як розкрито в Прикладі 1, були інокульовані шістьма мікроорганізмами, включаючи чотири різні види бактерій - золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) (ATCC NO. - 6538), синьогнійну паличку (*Pseudomonas aeruginosa*) (ATCC NO. - 9027), кишкову паличку (*Escherichia coli*) (ATCC NO. - 8739) та *Staphylococcus arlettae* (екологічний ізолят EMI); одні дріжджі - *Candida albicans* (ATCC NO.- 10231) та один гриб - *Asnagillus brasiliensis* (ATCC NO.- 16404) у кількості 10^5 - 10^6 КУО/мл у вакцинних препаратах відповідно через 0 годин. Потім зразки бактерій, грибів та дріжджів збирали через 0 годин, 24 години, день 7, день 14 і день 28, культивували у твердому середовищі, і кількість колоній підраховували між днем 3 та днем 5 та розраховували логарифмічне зменшення колоній. Результати наведено в Таблиці 38 нижче.

Таблиця 32

Результати тестування протимікробної ефективності

Сер. №	Культура	Відновлених КУО/мл позитивного контролю(0 год.)	№ відновлених КУО/мл				Результати
			24 год.	7 день	14 день	28 день	
Композиція 1 0,5 % 2PE	<i>S.aureus</i>	2×10^5 /мл	87000	900	0	-	Відповідає
	<i>P.aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$ /мл	28000	100	0	-	
	<i>E.coli</i>	10×10^5 /мл	9000	0	-	-	
	<i>S.arlettae</i> (EMI)	$2,8 \times 10^5$ /мл	114000	1600	100	0	
	<i>C.albicans</i>	$1,9 \times 10^5$ /мл	NA	400	0	-	
	<i>A.brasiliensis</i>	$2,4 \times 10^5$ /мл	NA	1600	100	0	
Композиція 2 0,5 % 2PE+0,18 %MP+0,02 %PP	<i>S.aureus</i>	2×10^5 /мл	0	-	-	-	Відповідає
	<i>P.aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$ /мл	0	-	-	-	
	<i>E.coli</i>	10×10^5 /мл	0	-	-	-	
	<i>S.arlettae</i> (EMI)	$2,8 \times 10^5$ /мл	0	0	-	-	
	<i>C.albicans</i>	$1,9 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
	<i>A.brasiliensis</i>	$2,4 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
Композиція 3 0,4 % 2PE+0,18 %MP+0,02 %PP	<i>S.aureus</i>	2×10^5 /мл	10	0	-	-	Відповідає
	<i>P.aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$ /мл	0	-	-	-	
	<i>E.coli</i>	10×10^5 /мл	0	-	-	-	
	<i>S.arlettae</i> (EMI)	$2,8 \times 10^5$ /мл	10	0	-	-	
	<i>C.albicans</i>	$1,9 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
	<i>A.brasiliensis</i>	$2,4 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
Композиція 4 0,5 % 2PE+0,18 %MP	<i>S.aureus</i>	2×10^5 /мл	10	0	-	-	Відповідає
	<i>P.aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$ /мл	170	10	0	-	
	<i>E.coli</i>	10×10^5 /мл	0	-	-	-	
	<i>S.arlettae</i> (EMI)	$2,8 \times 10^5$ /мл	20	0	-	-	
	<i>C.albicans</i>	$1,9 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
	<i>A.brasiliensis</i>	$2,4 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
Композиція 5 0,5 % 2PE+0,02 %PP	<i>S.aureus</i>	2×10^5 /мл	20	0	-	-	Відповідає
	<i>P.aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$ /мл	0	-	-	-	
	<i>E.coli</i>	10×10^5 /мл	10	0	-	-	
	<i>S.arlettae</i> (EMI)	$2,8 \times 10^5$ /мл	100	0	-	-	
	<i>C.albicans</i>	$1,9 \times 10^5$ /мл	NA	0	-	-	
	<i>A.brasiliensis</i>	$2,4 \times 10^5$ /мл	NA	10	0	-	
Композиція 6 0,18 %MP+0,02 %PP	<i>S.aureus</i>	2×10^5 /мл	70000	700	0	-	Відповідає
	<i>P.aeruginosa</i>	$1,8 \times 10^5$ /мл	21000	0	0	-	
	<i>E.coli</i>	10×10^5 /мл	6000	0	0	-	
	<i>S.arlettae</i> (EMI)	$2,8 \times 10^5$ /мл	101000	900	0	-	
	<i>C.albicans</i>	$1,9 \times 10^5$ /мл	NA	100	0	-	
	<i>A.brasiliensis</i>	$2,4 \times 10^5$ /мл	NA	700	0	-	

NA – Не наявний; 0,5 % 2PE – 2,5 мг/0,5 мл доза; 0,4 % 2PE – 2 мг/0,5 мл доза; 0,18 %MP – 0,9 мг/0,5 мл доза; 0,02 %PP – 0,1мг/0,5 мл доза; КУО- колонієутворюючі одиниці

Спостереження:

- Було відзначено, що всі шестивалентні вакцини, виготовлені в різних комбінаціях, відповідають ефективності консерванту згідно з Європейською фармакопеею категорії В. Однак, як було встановлено, ефективність варіюється при використанні різних комбінацій.
- Консервуюча ефективність шестивалентної вакцини, що містить 2PE, MP та PP, виявилась дуже ефективною порівняно з іншими комбінаціями консервантів, а саме. тільки 2PE, 2PE з PP, 2PE з MP та PP з MP.

- Також зазначається, що консервуюча ефективність шестивалентної вакцини, що містить 0,5 % 2PE з PP & MP, виявилася більш ефективною порівняно з тими ж комбінаціями, але з 0,4 % 2PE.

Приклад 8: Комбінована вакцина зниженої дози SIPL's порівняно з Easy Six (Panacea)

5

Таблиця 33

У цій таблиці наведено порівняння відсотку адсорбції окремих антигенів, специфічної активності, вмісту незв'язаного PRP між комбінованою вакциною SIPL із зменшеною дозою та Easy Six (Panacea):

Опис тестів	SIPL шестивалентна вакцина зі зменшеною дозою IPV	Panacea Easy-Six™ комбінована вакцина з повною дозою IPV
HB in vitro специфічна активність (мкг/мл)	46,969	23,167
HB адсорбція (%)	91,8	Більш ніж 90,0
HB In vivo специфічна активність	1,18	0,71 (0,42-1,13)
Усього PRP (мкг/0,5 мл)	9,18	13,20
Вільний PRP (%)	9,0	19,45
Вільний формальдегід (% МАС./ОБ.)	0,0011	0,0011
2-РЕ (% МАС./ОБ.)	0,499	0,660
Адсорбція дифтерії (%)	82	38
Адсорбція правця (%)	63	30
Тип 1 (DU/0,5 мл)	22,414	43,504
Тип 2 (DU/0,5 мл)	4,692	8,056
Тип 3 (DU/0,5 мл)	22,084	39,84
Алюміній (мг/доза)	0,2846	0,6034
In vivo ефективність IPV Тип-1	170,0 %	Не тестували
IPV Тип-3	132,3 %	
Специфічна активність дифтериту	98,5120 МО/доза (69,9650-137,247)	Більш ніж 40
Специфічна активність правцю	139,030 МО/доза (88,2850-208,688)	Більш ніж 50
Специфічна активність кашлюку	4,6749 МО/доза (2,6492-8,2763)	3,2221 (1,8032-5,7706)

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Повністю рідка багатодозова імуногенна композиція, що містить:
 - (i) дифтерійний анатоксин (D) у кількості від 10 до 25 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 50 %;
 - (ii) правцевий анатоксин (T) у кількості від 2 до 10 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 40 %;
 - (iii) інактивованний цілюноклітинний кашлюк (wP) або ацелюлярний кашлюк (aP), що має штами *Bordetella pertussis* 134, 509, 25525 та 6229 у співвідношенні 1:1:0,25:0,25, у кількості 12-16 КУО;
 - (iv) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) у кількості 7-15 мкг, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 50 %;
 - (v) антиген *Haemophilus influenzae* типу b (Hib) у кількості 7-13 мкг;
 - (vi) інактивованний антиген поліовірусу (IPV), в якому IPV типу 1 знаходиться у кількості 1-25 ОД, IPV типу 2 знаходиться у кількості 1-10 ОД; та IPV типу 3 знаходиться у кількості 1-20 ОД;
 - (vii) загальний вміст алюмінію (Al³⁺) у композиції становить від 0,1 до 0,6 мг, і
 - (viii) як консервант:
 - 2-феноксіетанол у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.); або
 - 2-феноксіетанол у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.) та метилпарабен у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або
 - 2-феноксіетанол у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.) та пропілпарабен у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); або
 - 2-феноксіетанол у кількості 1-6 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.);
2. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що антиген Hib являє собою Hib полісахарид полірибозилрибітолфосфат (PRP), кон'югований з білком-носієм за допомогою хімії кон'югації ціанілювання або хімії кон'югації відновного амінування, де зазначений реагент

ціанілювання вибирають з бромистого ціаногену, 1-ціано-4-диметиламінопіридинію тетрафторборату (CDAP), 1-ціано-4-піролідінопіридинію тетрафторборату (CPPT), 1-ціаноімідазолу, а саме (1-CI), 1-ціанобензотриазолу (1-CBT) або 2-ціанопіридазин-3(2H)ону (2-CPO); а білком-носієм є правцевий анатоксин.

5 3. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що IPV типу 1 являє собою штам Mahoney; та/або IPV типу 2 являє собою штам MEF-1; та/або IPV типу 3 являє собою штам Saukett.

4. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що D, T і HBsAg індивідуально адсорбуються на ад'юванті, яким є фосфат алюмінію (AlPO₄).

10 5. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що антигени IPV адсорбуються на фосфаті алюмінію (AlPO₄), що має відсоток адсорбції IPV типу 1 в діапазоні 10-100 %, IPV типу 2 - в діапазоні 60-100 %, а IPV типу 3 - в діапазоні 10-100 %.

6. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що відсоток адсорбції антигену Hib на будь-якому ад'юванті становить менш ніж 20 %.

15 7. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що композиція додатково містить буфер, вибраний з хлориду натрію або фосфатно-сольового буферного розчину.

8. Імуногенна композиція за п. 7, яка **відрізняється** тим, що композиція містить хлорид натрію як розчинник або буфер у концентрації від 0,5 до 1,5 %.

20 9. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що 0,5 мл композиції містить одне з наступного:

а) D антиген у кількості 10 Lf; T антиген у кількості 2 Lf; wP антиген у кількості 12 KYO; HBsAg у кількості 8 мкг; Hib антиген у кількості 8 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); метилпарабен у кількості 0,9 мг (мас./об.); або

25 б) D антиген у кількості 20 Lf; T антиген у кількості 4 Lf; wP антиген у кількості 14 KYO; HBsAg у кількості 15 мкг; Hib антиген у кількості 10 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); метилпарабен у кількості 0,9 мг (мас./об.); або

30 в) D антиген у кількості 25 Lf; T антиген у кількості 10 Lf; wP антиген у кількості 16 KYO; HBsAg у кількості 15 мкг; Hib антиген у кількості 13 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); метилпарабен у кількості 0,9 мг (мас./об.).

35 10. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що 0,5 мл композиції містить одне з наступного:

а) D антиген у кількості 10 Lf; T антиген у кількості 2 Lf; wP антиген у кількості 12 KYO; HBsAg у кількості 8 мкг; Hib антиген у кількості 8 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); пропілпарабен у кількості 0,1 мг (мас./об.); або

40 б) D антиген у кількості 20 Lf; T антиген у кількості 4 Lf; wP антиген у кількості 14 KYO; HBsAg у кількості 15 мкг; Hib антиген у кількості 10 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); пропілпарабен у кількості 0,1 мг (мас./об.); або

45 в) D антиген у кількості 25 Lf; T антиген у кількості 10 Lf; wP антиген у кількості 16 KYO; HBsAg у кількості 15 мкг; Hib антиген у кількості 13 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); пропілпарабен у кількості 0,1 мг (мас./об.).

50 11. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що 0,5 мл композиції містить одне з наступного:

55 а) D антиген у кількості 10 Lf; T антиген у кількості 2 Lf; wP антиген у кількості 12 KYO; HBsAg у кількості 8 мкг; Hib антиген у кількості 8 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 20 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 4 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 16 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); метилпарабен у кількості 0,9 мг (мас./об.); пропілпарабен у кількості 0,1 мг (мас./об.); або

60

с) D антиген у кількості 25 Lf; Т антиген у кількості 10 Lf; wP антиген у кількості 16 КУО; HBsAg у кількості 15 мкг; Hib антиген у кількості 13 мкг; IPV антиген, тип 1 (штам Mahoney) у кількості 7,5 DU, тип 2 (штам MEF-1) у кількості 1,5 DU та тип 3 (штам Saukett) у кількості 6 DU, відповідно; загальний вміст алюмінію (Al³⁺) не більш ніж 0,55 мг; 2-феноксіетанол у кількості 2,5 мг (об./об.); метилпарабен у кількості 0,9 мг (мас./об.); пропілпарабен у кількості 0,1 мг (мас./об.).

15. Спосіб одержання повністю рідкої багатодозової імуногенної композиції за п. 1, який включає стадії:

а) додавання у посудину або контейнер для змішування фізіологічного розчину хлориду натрію;

б) додавання у посудину або контейнер для змішування Компонента I, що містить дифтерійний анатоксин у кількості від 10 до 25 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 50 %;

в) додавання Компонента II, що містить правцевий анатоксин у кількості від 2 до 10 Lf, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 40 %, до Компонента I з етапу (б) при перемішуванні при кімнатній температурі;

г) додавання Компонента III, що містить антиген інактивованого цільноклітинного кашлюку у кількості 12-16 КУО, до суміші, отриманої на етапі (в), при перемішуванні при кімнатній температурі;

д) додавання Компонента IV, що містить поверхневий антиген гепатиту В у кількості 7-15 мкг, адсорбований на солі алюмінію, що має відсоткову адсорбцію щонайменше 50 %, до суміші, отриманої на етапі (г), при перемішуванні при кімнатній температурі;

е) додавання Компонента V, що містить антиген Hib у кількості 7-13 мкг, до суміші, отриманої на етапі (д), при перемішуванні при кімнатній температурі;

ж) додавання Компонента VI, що містить IPV антиген в якому IPV типу 1 знаходиться у кількості 1-25 ОД, IPV типу 2 знаходиться у кількості 1-10 ОД; та IPV типу 3 знаходиться у кількості 1-20 ОД, до суміші, отриманої на етапі (е), при перемішуванні при кімнатній температурі;

з) додавання до суміші, отриманої на етапі (ж), при перемішуванні при температурі 6-16 °С як консерванту:

2-феноксіетанолу у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.); або

2-феноксіетанолу у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.) та метилпарабену у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

2-феноксіетанолу у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.) та пропілпарабену у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.); або

2-феноксіетанолу у кількості 1-6 мг на 0,5 мл (об./об.), метилпарабену у кількості 0,1-1,5 мг на 0,5 мл (мас./об.) та пропілпарабену у кількості 0,05-0,2 мг на 0,5 мл (мас./об.);

и) регулювання рН до 6,0-7,0 суміші, отриманої на етапі (з), при перемішуванні при кімнатній температурі, гідроксидом натрію/карбонатом натрію; та

й) додавання з помішуванням фізіологічного розчину хлориду натрію для доведення до бажаного об'єму.

16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що одержання Компонента I включає такі стадії:

а) перенесення фосфату алюмінію у контейнер/посудину;

б) додавання дифтерійного анатоксину;

в) регулювання рН до 4,5-5,5 оцтовою кислотою/гідроксидом натрію;

г) стабілізація;

д) регулювання рН до 5,5-6,5 гідроксидом натрію/карбонатом натрію; та

е) стабілізація гістидиновим буфером.

17. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що одержання Компонента II включає такі стадії:

а) перенесення фосфату алюмінію у контейнер/посудину;

б) додавання правцевого анатоксину;

в) регулювання рН до 4,5-5,5 оцтовою кислотою/гідроксидом натрію;

г) стабілізація;

д) регулювання рН до 5,5-6,5 гідроксидом натрію/карбонатом натрію; та

е) стабілізація гістидиновим буфером.

18. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що одержання Компонента III включає такі стадії:

а) інактивація *Bordetella pertussis* штамів 134 при 56 °С протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду;

б) інактивація *Bordetella pertussis* штамів 509 при 56 °С протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду;

в) інактивація *Bordetella pertussis* штамів 25525 та 6229 при 56 °С протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду;

- с) інактивація *Bordetella pertussis* штамів 6229 при 56 °С протягом 10-15 хвилин у присутності формальдегіду;
- d) наступне змішування інактивованих *Bordetella pertussis* штамів 134, 509, 25525 та 6229 у співвідношенні 1:1:0,25:0,25; та, необов'язково,
- 5 е) адсорбція, на ад'ювант на основі алюмінію;
- при цьому не використовується тіомерсал та інактивований цілюноклітинний антиген кашлюка, компонент залишається таким, що не утворює грудок та є однорідним, що приводить до зниження реактогенності та надання кращої специфічної активності протягом тривалого часу.
19. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що одержання Компонента IV включає такі стадії:
- 10 а) перенесення фосфату алюмінію у контейнер/посудину;
- b) додавання Hepatitis B поверхневий антиген;
- с) регулювання рН - 4,5-5,5 оцтовою кислотою/гідроксидом натрію;
- d) стабілізація;
- е) регулювання рН - 5,8-6,8 гідроксидом натрію/карбонатом натрію; та
- 15 f) стабілізація.
20. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що одержання Компонента V включає такі стадії:
- а) ферментація *Haemophilus influenzae* типу b;
- b) інактивація при 37 °С протягом 2 годин у присутності 0,1 % формальдегіду;
- с) очищення Hib полірибозилрибітолфосфатного (PRP) полісахариду;
- 20 d) кон'югація очищеного продукту зі стадії с) - правцевого анатоксину (ТТ), з використанням хімії ціанілювання за допомогою ціаногенброміду у присутності лінкеру дигідрозиду адипінової кислоти (ADH);
- е) очищення кон'югата зі стадії d); та
- f) фільтрування очищеного кон'югата переважно через 0,22-мкм фільтр;
- 25 де відсоток незв'язаного PRP становить не більш ніж 5 % у повністю очищеному Hib кон'югаті.