

Винахід стосується нових комбінованих вакцинних препаратів. Комбіновані вакцини (які забезпечують захист від декількох патогенів) дуже бажані для зменшення числа імунізацій, необхідних для забезпечення захисту від декількох патогенів, для зниження витрат на введення і для збільшення прийняття і ступенів охоплення. Добре відоме явище антигенної конкуренції (або інтерференції) ускладнює розробку багатокомпонентних вакцин. Антигенна інтерференція відноситься до спостереження того факту, що введення декількох антигенів часто призводить до ослабленої відповіді на деякі антигени в порівнянні з імунною відповіддю, яка спостерігається, коли такі антигени вводять окремо.

Відомі комбіновані вакцини, які можуть запобігати *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae* і, можливо, вірус гепатиту В та/або *Haemophilus influenzae* типу b [див., наприклад, WO 93/24148 і WO 97/00697].

Винахід стосується виробництва найбільш активних на сьогодні полівалентних вакцин, введення яких може запобігати або лікувати інфекцію *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, вірусу гепатиту В, *Haemophilus influenzae* і *N. meningitidis*, і переважно також вірусу гепатиту А та/або вірусу поліомієліту, причому компоненти вакцини не перешкоджають у значній мірі імунологічній дії кожного з компонентів вакцини.

Відповідно, в одному аспекті винаходу запропонована полівалентна імунотенна композиція для забезпечення захисту в організмі хазяїна проти захворювання, викликаного *Bordetella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, вірусом гепатиту В, *Haemophilus influenzae* і *N. meningitidis*, яка містить:

(а) або вбіту цільноклітинну *Bordetella pertussis* (Pw), або два або більш ніж два безкліткових коклюшних компоненти (Pa) (переважно, перше),

(б) правцевий анатоксин (ТТ),

(в) дифтерійний анатоксин (DT),

(г) поверхневий антиген вірусу гепатиту В (НерВ),

(д) кон'югат білка-носія та капсульного полісахариду *H. influenzae* типу В (Hib), і

(е) один або більш ніж один кон'югат білка-носія і капсульного полісахариду бактерії, вибраної з групи *N. meningitidis* типу А (Men А) і *N. meningitidis* типу С (Men С).

Способи отримання правцевого анатоксину (ТТ) добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, ТТ переважно отримують шляхом очищення токсину з культури *Clostridium tetani* з наступною хімічною детоксифікацією, однак альтернативно отримують шляхом очищення рекомбінантного, або генетично детоксифікованого аналога токсину [наприклад, як описано в EP 209281]. "Правцевий анатоксин" також містить імунотенні фрагменти повнорозмірного білку [наприклад Фрагмент С - див. EP 478602].

Способи отримання дифтерійного анатоксину (DT) також добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, DT переважно отримують шляхом очищення токсину з культури *Corynebacterium diphtheriae* з наступною хімічною детоксифікацією, однак альтернативно отримують шляхом очищення рекомбінантного, або генетично детоксифікованого аналога токсину [наприклад, CRM197 або інші мутанти, як описано в US 4709017, US 5843711, US 5601827 і US 5917017].

Безклітинні коклюшні компоненти (Pa) добре відомі в даній галузі техніки. Приклади містять коклюшний анатоксин (PT), філаментний гемаглютинин (FHA), пертактин (PRN) та аглютиногени 2 і 3. Ці антигени є частково очищеними або високоочищеними. Переважно 2 або більш ніж два безклітинних коклюшних компоненти використовують у вакцині. Найбільш переважно 2, 3, 4 або всі 5 з вищевказаних прикладів безклітинних коклюшних компонентів включені у вакцину. Найпереважніше включені PT, FHA і PRN. PT можна отримувати різними способами, наприклад шляхом очищення токсину з культури *B. pertussis* з наступною хімічною детоксифікацією, або, альтернативно, шляхом очищення генетично детоксифікованого аналога PT (наприклад, як описано в US 5085862).

Способи отримання вбітої цільноклітинної *Bordetella pertussis* (Pw), яка придатна для даного винаходу, розкриті в [WO 93/24148], що є придатними способами приготування лікарського засобу для отримання DT-ТТ-Рw-НерВ і DT-ТТ-РА-НерВ вакцин.

Кон'югати бактеріального капсульного полісахариду можуть містити будь-який пептид-, поліпептид- або білок-носії, який містить щонайменше один Т-хелперний епітоп. Переважно, використовуваний(і) білок-носії(білки-носії) вибраний(і) із групи, яка містить: правцевий анатоксин, дифтерійний анатоксин, CRM197, рекомбінантний дифтерійний токсин [як описаний у будь-якому з US 4709017, WO 93/25210, WO 95/33481 або WO 00/48638], пневмолізін (переважно хімічно детоксифікований, або детоксифікований мутант) з *S. pneumoniae*, ОМРС з *N. meningitidis* і білок D (PD) з *H. influenzae* (EP 594610). Внаслідок відомого ефекту індукованого носієм супресії, є переважним, якщо в кожній з композицій за винаходом полісахаридні антигени, які містяться в ній ("п" антигени), кон'юговані з більш ніж одним носієм. Таким чином, (п-1) полісахаридів може бути нанесено (окремо) на один тип носія і 1 - на інший носій, або (п-2) - на один і 2 - на два інших носія, і так далі. Наприклад, у вакцині, що містить 4 бактеріальних полісахаридних кон'югата, 1, 2 або всі чотири можуть бути кон'юговані з різними носіями). Білок D, однак, переважно використовують як носій в композиціях за винаходом, тому що він може бути використаний для різних (2, 3, 4 або більш) полісахаридів у композиції без помітного ефекту індукованої носієм супресії. Найпереважніше, Hib присутній у виді ТТ-кон'югату, а MenA, MenC, MenY і MenW є або ТТ-, або PD-кон'югати. Білок D також є корисним носієм, оскільки він забезпечує додатковий антиген, який може забезпечити захист від *H. influenzae*.

Полісахарид може бути зв'язаний з білком-носієм за допомогою будь-якого відомого способу [наприклад, Likhite, патент США 4372945 і Armor et al., патент США 4474757]. Переважно здійснюють CDAP-кон'югацію [WO 95/08348].

При CDAP ціануючий реагент 1-ціано-диметиламінопіридинію тетрафторборат (CDAP) переважно використовують для синтезу полісахарид-білкових кон'югатів. Реакцію ціанування можна здійснювати у відносно м'яких умовах, щоб уникнути гідролізу полісахаридів, чутливих до лугу. Цей синтез дає можливість прямого зв'язування з білком-носієм.

Вищевказана імунотенна композиція може додатково містити один, два, три, чотири, п'ять, шість або сім

компонентів, вибраних з наступного списку: полісахарид N. meningitidis типу Y [Men Y] (переважно кон'югований), полісахарид N. meningitidis типу W [Men W] (переважно кон'югований), VI полісахарид Salmonella typhi, везикули зовнішньої мембрани N. meningitidis (переважно серотипу B), один або більш ніж один білок (поверхнево-експонований) зовнішньої мембрани N. meningitidis (переважно серотипу B), вбитий атенуований вірус гепатиту A (HepA - переважно продукт, відомий як «Havrix™» [SmithKline Beecham Biologicals]), та інактивовані вірус поліомієліту (IPV - який переважно містить типи 1, 2 і 3, які є стандартними в технології вакцин, найпереважніше вакцина Солка від поліомієліту), без суттєвих проблем інтерференції для будь-якого з антигенів даної композиції.

Імуногенні композиції за винаходом переважно готують у виді вакцини для введення *in vivo* в організм хазяїна, так що індивідуальні компоненти композиції включені в препарат таким чином, щоб імуногенність індивідуальних компонентів не була суттєво знижена іншими індивідуальними компонентами цієї композиції. «Не суттєво знижена» означає, що при імунізації отримують титр антитіл проти кожного компонента, який складає більш ніж 60%, переважно більш ніж 70%, більш переважно більш ніж 80%, ще більш переважно більш ніж 90%, і найпереважніше більш ніж 95-100% титру, отриманого, коли антиген вводять окремо.

Імуногенні композиції за винаходом переважно готують у виді вакцини для введення *in vivo* в організм хазяїна, так що вони забезпечують титр антитіл, який перевищує критерій для серологічного захисту для кожного антигенного компонента для прийнятного відсотка суб'єктів людей. Це є важливим тестом при оцінці ефективності вакцини в популяції. Антигени з титром зв'язаних антитіл, вище якого вважається, що в організмі хазяїна спостерігається сероконверсія проти антигену, добре відомі, і такі титри опубліковані організаціями, такими як Всесвітня Організація Охорони здоров'я (ВООЗ). Переважно у більш ніж 80% статистично значимої вибірки суб'єктів спостерігається сероконверсія, більш переважно у більш ніж 90%, ще більш переважно у більш ніж 93%, і найпереважніше у 96-100%.

Імуногенна композиція за винаходом переважно містить ад'юванти. Підходящі ад'юванти містять сіллю алюмінію, таку як гелі гідроксиду алюмінію (галуни) або фосфат алюмінію, але можуть також бути сіллю кальцію, заліза або цинку, або можуть бути нерозчинною суспензією ацильованого тирозину або ацильованих цукрів, катіонні або аніонні похідні полісахаридів, або поліфосфазени.

Ад'ювант може також бути вибраний таким чином, щоб бути кращим індуктором відповіді Th1-типу, для того щоб сприяти розвиткові клітинно-опосередкованій гілці імунної відповіді.

4 Високі рівні цитокінів Th1-типу сприяють індукції клітинно-опосередкованих імунних відповідей на даний антиген, у той час як високі рівні цитокінів Th2-типу сприяють індукції гуморальних імунних відповідей на даний антиген.

Придатні системи ад'ювантів, які стимулюють переважно ТМ-відповідь, містять монофосфорил ліпід А або його похідне, зокрема 3-дез-О-ацильований монофосфорил ліпід А, і комбінацію монофосфорил ліпід А, переважно 3-дез-О-ацильованого монофосфорил ліпід А (3D-MPL), разом із сіллю алюмінію. Посилена система містить комбінацію монофосфорил ліпід А та похідного сапоніну, зокрема комбінацію QS21 і 3D-MPL, як розкрито в WO 94/00153, або менш реактогенну композицію, де QS21 блокований холестеринном, як розкрито в WO 96/33739. Особливо сильнодіючий ад'ювантний препарат, який містить QS21, 3D-MPL і токоферол в емульсії типу «олія у воді», описаний у WO 95/17210. Вакцина може додатково містити сапонін, більш переважно QS21. Препарат може також містити емульсію типу «олія у воді» та токоферол (WO 95/17210). Неметиловані CpG-вмісні олігонуклеотиди (WO 96/02555) також є кращими індукторами Th1-відповіді і є придатними для застосування за винаходом.

Солі алюмінію є кращими ад'ювантами у вищевказаних імуногенних композиціях. Зокрема, НерВ слід переважно адсорбувати на фосфаті алюмінію перед змішуванням з іншими компонентами. Для того щоб зменшити рівні ад'юванту (зокрема солей алюмінію) у композиціях за винаходом, полісахаридні кон'югати можуть бути без ад'ювантів.

За винаходом також запропонований спосіб приготування вакцинного препарату, який містить стадію, на якій компоненти вакцини змішують разом з фармацевтично прийнятним ексципієнтом.

Особливо краща DTPw композиція за винаходом містить: TT, DT, Pw, Нер (переважно адсорбований на фосфаті алюмінію), Hib (переважно кон'югований з TT та/або не адсорбований), MenA (переважно кон'югований з білком D) і MenC (переважно кон'югований з білком D). Переважно вакцину можна поставляти в двох контейнерах, причому перший містить DTPw-Нер у рідкій формі, а другий містить Hib-MenA-MenC у ліофілізованій формі. Вміст контейнерів можна змішувати безпосередньо перед введенням в організм хазяїна у виді однієї ін'єкції.

У додатковому аспекті винаходу запропонована імуногенна композиція або вакцина, як вона описана тут, для застосування як ліки.

У ще одному додатковому аспекті даного винаходу запропоноване використання імуногенних композицій за винаходом у виробництві ліків для лікування або попередження захворювань, викликаних інфекцією Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, вірусу гепатиту B, Haemophilus influenzae і N. meningitidis.

Крім того, також запропонований спосіб імунізації людини-хазяїна від захворювання, викликаного Bordetella pertussis, Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, вірусом гепатиту B, Haemophilus influenzae і N. meningitidis, при якому в організм хазяїна вводять імунопротективну дозу імуногенної композиції за винаходом.

Вакцинні препарати за винаходом можна застосовувати для захисту або лікування ссавця, підданого інфекції, за допомогою введення зазначеної вакцини системним шляхом введення або через слизові оболонки. Такі введення можуть містити ін'єкцію за допомогою внутрішньом'язового, внутрішньочеревного, інтрадермального або підшкірного шляхів введення; або за допомогою введення через слизові оболонки в пероральний/травний, дихальний, сечостатевиї тракт.

Кількість антигену в кожній вакцинній дозі вибрано як кількість, яка індукує імунопротективну відповідь без значних несприятливих побічних ефектів при типових вакцинах.

Така кількість буде варіювати в залежності від того, який конкретно імуноген використовують і як він представлений. Звичайно очікується, що кожна доза буде містити 0,1-100мкг полісахариду, переважно 0,1-50мкг, переважно 0,1-10мкг, з яких 1-5мкг є найбільш кращим діапазоном.

Вміст білкових антигенів у вакцині буде звичайно знаходитися в діапазоні 1-100мкг, переважно 5-50мкг, найбільш типово в діапазоні 5-25мкг.

Після первинної вакцинації суб'єкти можуть отримувати одну або декілька бустерних імунізацій з достатніми проміжками часу.

Отримання вакцини в цілому описано в Vaccine Design [«The subunit and adjuvant approach» (eds Powell M.F. & Newman M.J. (1995) Plenum Press New York). Інкапсуляція у ліпосоми описана Fullerton, патент США 4235877].

Цікаво, що автори винаходу крім того знайшли, що для вакцин, які містять TT, DT, Pw і Hib, несподіваним є той факт, що по суті більш низька доза Hib може бути використана в комбінованій вакцині (у порівнянні зі стандартною дозою, що складає 10мкг на 0,5мл дози) для отримання щонайменше еквівалентних титрів антитіл від капсульного полісахаридного антигену *H. influenzae* типу b. Це протилежно тому, що можна було очікувати.

Відповідно, у додатковому втіленні даного винаходу запропонована полівалентна імуногенна композиція, яка містить вбиту цілиноклітинну *Bordetella pertussis* (Pw), правцевий анатоксин (TT), дифтерійний анатоксин (DT) і кон'югат білка-носія і капсульного полісахариду *H. influenzae* типу B (Hib - переважно кон'югований з TT, DT або CRM197), де кількість кон'югату на 0,5мл дози від маси вакцини складає 1-8мкг, а імуногенність кон'югату є еквівалентною або - поліпшеною в порівнянні з такими композиціями, що містять великі кількості кон'югату. Можливо, поверхневий антиген гепатиту B також може бути включений.

Краща кількість кон'югату на 0,5мл дози від маси вакцини складає менш ніж 10мкг (полісахариду в кон'югаті), більш переважно 1-7 або 2-6мкг, і найпереважніше приблизно 2,5, 3, 4 або 5мкг. Найпереважніше Hib-кон'югат не адсорбований на ад'ювантній солі алюмінію перед змішуванням з DTPw вакциною.

Ще одне спостереження, яке зробили автори винаходу, є той факт, що комбіновані вакцини, що містять Hib-кон'югат, викликають значно більш високі титри анти-Hib антитіл в організмі хазяїна (у порівнянні з моновалентною вакциною на основі неадсорбованого Hib-кон'югату), якщо Hib-кон'югат вводять у виді вакцини, яка додатково містить 1, але особливо 2 або більш ніж два додаткових бактеріальних полісахаридів, і Hib-полісахарид (і переважно всі полісахариди) вакцини не адсорбовані на ад'юванті (зокрема солях алюмінію).

Додатковий, незалежний аспект даного винаходу, таким чином, полягає в тім, що запропоновано полівалентну імуногенну композицію, яка містить кон'югат білка-носія і капсульного полісахариду *H. influenzae* типу B (Hib), причому зазначена композиція додатково містить 1, але особливо 2 або більш ніж два додаткових бактеріальних полісахаридів (переважно більш ніж 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 або 13), здатних забезпечити захист для організму хазяїна проти інфікування бактеріями, від яких вони отримані, і причому Hib-полісахарид (і переважно жоден із зазначених полісахаридів) у композиції не адсорбований на ад'ювантній солі алюмінію. Найпереважніше, щоб ад'ювантна сіль алюмінію не була присутня в композиції.

Під антигеном, що не «адсорбований на ад'ювантній солі алюмінію» мають на увазі, що ніяка особлива або спеціальна стадія адсорбції для антигену на додатковій ад'ювантній солі алюмінію, не входить у процес приготування даної композиції.

Hib може бути кон'югований з будь-яким носієм, який може забезпечити щонайменше один Т-хелперний епітоп (приклади яких описані вище), і переважно правцевим анатоксином.

Переважає, додаткові бактеріальні полісахариди також кон'юговані з білком-носієм (приклади яких описані вище). У конкретних втіленнях капсульний полісахарид *H. influenzae* типу B та додаткові полісахариди не кон'юговані з тим самим носієм (Hib і жоден з додаткових полісахаридів не використовують спільно той самий носій), особливо коли носієм є CRM197. У кращих втіленнях прикладів щонайменше один з полісахаридів даної композиції кон'югований з білком D, однак це не суттєво для здійснення винаходу - у дійсності, ні Hib, ні будь-який інший полісахарид, не обов'язково повинний бути кон'югований з білком D.

У конкретному втіленні винаходу, тільки Hib і додаткові бактеріальні полісахариди (та їх кон'югати) є антигенами, які присутні у композиції.

Кількість полісахариду, що здатна забезпечити захист для організму хазяїна (ефективна кількість) може легко визначити фахівець у даній галузі техніки. Звичайно очікується, що кожна доза буде містити 0,1-100мкг полісахариду, переважно 0,1-50мкг, переважно 0,1-10мкг, з яких 1-5мкг є найбільш кращим діапазоном. Hib-кон'югат переважно є присутнім у кількості 3-16мкг (полісахариду в кон'югаті), більш переважно 4-12 мкг, і найпереважніше 5-10 мкг. У кращому втіленні сумарно не менш ніж 2 мкг додаткового полісахариду (особливо, коли він кон'югований) присутні у композиції на 0,5 мл дози, і, переважно, включено не менш ніж 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45 або 50мкг. Переважно не більш ніж 100 мкг додаткового полісахариду включено на 0,5мл дози.

Переважає додаткові бактеріальні полісахариди вибрані з групи, що складає з: капсульного полісахариду *N. meningitidis* серогрупи A (Men A), капсульного полісахариду *N. meningitidis* серогрупи C (Men C), капсульного полісахариду *N. meningitidis* серогрупи Y (Men Y), капсульного полісахариду *N. meningitidis* серогрупи W (Men W), капсульного полісахариду групи I стрептокока групи B, капсульного полісахариду групи II стрептокока групи B, капсульного полісахариду групи III стрептокока групи B, капсульного полісахариду групи IV стрептокока групи B, капсульного полісахариду групи V стрептокока групи B, капсульного полісахариду *Staphylococcus aureus* типу 5, капсульного полісахариду *Staphylococcus aureus* типу 8, VI полісахариду з *Salmonella typhi*, ліпополісахариду (LPS) *N. meningitidis*, LPS *M. catarrhalis* і LPS *H. influenzae*. Під LPS розуміють або нативний ліпополісахарид (або ліпоолігосахарид), або ліпополісахарид, де ділянка ліпідів A детоксифікована будь-яким з більшості відомих способів [див. наприклад, WO 97/18837 або WO 98/33923], або будь-яку молекулу, що містить O-полісахарид, отриманий із зазначеного LPS. Під LPS *N. meningitidis* мають на увазі один або більш ніж один з 12 відомих імунотипів (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11 або L12).

Особливо кращими комбінаціями є композиції, які містять: 1) кон'югований Hib, кон'югований MenA і кон'югований MenC; 2) кон'югований Hib, кон'югований MenY і кон'югований MenC; і 3) кон'югований Hib і кон'югований MenC. Кількість PS у кожнім з вищевказаних кон'югатів може складати 5 або 10мкг кожного на 0,5мл дози для людини. Можливо, вищевказані композиції можуть також містити везикули зовнішніх мембран *N. meningitidis* серотипу B, або один або більш ніж один білок (поверхностно-експонированный) зовнішньої мембрани *N. meningitidis* серотипа B, або один або більш ніж один LPS (як він визначений вище) *N. meningitidis* для створення загальної вакцини проти менінгіту. Переважно MenA, MenC і MenY є або TT-, або PD-кон'югати.

Додаткові бактеріальні полісахариди можуть також бути вибрані з будь-якого з капсульних пневмококових полісахаридів (переважно більш ніж 7, більш переважно 11 або більш, і найпереважніше 13 або більш), таких як від серотипу: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11 A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F або 33F. Переважно пневмококові полісахариди кон'юговані (найпереважніше PD-кон'югати).

Наприклад, пневмококові полісахариди, отримані від щонайменше чотирьох серотипів (включаючи 6B, 14, 19F і 23F, наприклад), або від щонайменше 7 серотипів (включаючи 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F і 23F, наприклад) можуть бути вибрані зі списку, зазначеного вище. Більш переважно, полісахариди від більш ніж 7 серотипів включені в композицію, наприклад, щонайменше 11 серотипів. Наприклад, композиція в одному втіленні містить 11 капсульних полісахаридів, отриманих від серотипів 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F і 23F (переважно кон'югованих). У кращому втіленні даного винаходу щонайменше 13 полісахаридних антигенів (переважно кон'югованих) включені, хоча додаткові полісахаридні антигени, наприклад 23-валентні (такі як серотипи 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F і 33F) також включені у винахід.

Для вакцинації людей похилого віку (наприклад для попередження пневмонії) краще включити серотипи 8 і 12F (і найпереважніше 15 і 22 також) у кращу 11-валентну антигенну композицію, описану вище, з утворенням 13/15-валентної вакцини, тоді як для немовлят або дітей раннього віку (коли велике значення має отит середнього вуха) серотипи 6A та 19A переважно включені з отриманням 13-валентної вакцини.

Пневмококові полісахариди можуть бути адсорбовані або можуть не бути адсорбовані на ад'ювантних солях алюмінію.

Hib (переважно ліофілізований) і пневмококові полісахариди (переважно в рідкій формі) можна змішувати безпосередньо перед введенням в організм хазяїна в одному введенні/ін'єкції. За допомогою такого препарату можливо, при імунізації, отримати титри антитіл проти Hib капсульного полісахариду понад 100% титру, отриманого, коли Hib-кон'югат вводять окремо. У кращих втіленнях ніякого (значного) несприятливого ефекту не виникає по відношенню до пневмококових полісахаридних кон'югатів (як захисної ефективності) у комбінації, у порівнянні з їхнім введенням окремо. Це можна оцінити в одиницях виміру пост-первинних геометричних середніх концентрацій (GMC) антитіла проти полісахариду через 1 місяць після останньої праймінг-дози (праймінг-дози є первинними введеннями - звичайно 3-у перший рік життя). GMC (у мкг/мл) для вакцини за даним винаходом повинна бути переважно вище 55% (більш переважно вище 60, 70, 80 або 90%) від GMC, коли пневмококові полісахариди вводять без Hib-кон'югату. Іншим зазначенням на те, що ніякого несприятливого ефекту не виникає, є те, що % суб'єктів з концентраціями антитіла не менш ніж 0,5мкг/мл відрізняється не більш, ніж на 10% (переважно менш ніж 9, 7, 5, 3 або 1%), при порівнянні 1-місячних пост-первинних введень вакцини за винаходом проти вакцини без Hib-кон'югату.

Хоча вищевказане відноситься до Hib і додатковим бактеріальним «полісахаридам» (краще втілення), передбачено, що даний винахід може бути розширений до Hib і додаткових бактеріальних «олігосахаридів» (які в природі мають низьке число повторюваних одиниць, або які є полісахаридами, зменшені в розмірі для здійснення, але які усе ще здатні до індукції захисної імунної відповіді в організмі хазяїна), які добре відомі в технології вакцин.

Переважно, полівалентну імуногенну композицію за цим аспектом винаходу, готують у виді вакцини для введення *in vivo* в організм хазяїна, причому індивідуальні компоненти композиції готують таким чином, щоб імуногенність індивідуальних компонентів не була знижена іншими індивідуальними компонентами цієї композиції (див. вищевказане визначення). Таким чином, у кращих втіленнях ніякого (значного) несприятливого ефекту не виникає у відношенні до додаткових бактеріальних полісахаридів (як захисної ефективності) у комбінації, у порівнянні з їхнім введенням окремо.

Переважно, полівалентну імуногенну композицію за цим аспектом винаходу готують у виді вакцини для введення *in vivo* в організм хазяїна, що забезпечує титр антитіл, перевищуючий критерій для серологічного захисту для кожного антигенного компонента для прийнятного відсотка суб'єктів-людей (див. вищевказане визначення).

Композиції за даним аспектом винаходу переважно готують у виді вакцини. Використання полівалентної імуногенної композиції за даним аспектом винаходу у виробництві ліків для лікування або попередження захворювань, викликаних інфекцією *Haemophilus influenzae* (і переважно також тими організмами, від яких отримані додаткові бактеріальні полісахариди), також передбачено, як і спосіб імунізації людини-хазяїна від захворювання, викликаного *Haemophilus influenzae* (і переважно також тих організмів, від яких отримані додаткові бактеріальні полісахариди), при якому в організм хазяїна вводять імунопротективну дозу полівалентної імуногенної композиції за даним аспектом винаходу.

Також запропонований спосіб готування полівалентної імуногенної композиції за даним аспектом винаходу, що включає в себе стадію, на якій змішують разом індивідуальні компоненти. Якщо додаткові бактеріальні полісахариди повинні бути адсорбовані на ад'ювантній солі алюмінію, це повинно бути зроблене перед додаванням Hib до препарату. Переважно надлишок ад'ювантної солі алюмінію не повинний бути використаний. Найпереважніше Hib повинний бути доданий до додаткового полісахариду, який містить ад'ювантний алюміній, безпосередньо до композиції, яку вводять в організм хазяїна.

Усі цитовані посилання і публікації включені тут як посилання.

Приклади запропоновані тільки для цілей ілюстрації і не призначені для обмеження об'єму даного винаходу.

Приклад 1: Отримання DT-TT-Pw-HepB (DTPw-HepB) вакцини  
 Це отримання здійснювали, як описано в WO 93/24148. Ця вакцина є у продажу під назвою Tritanrix-HepB™ (SmithKline Beecham Biologicals).

Приклад 2: Отримання MenA-MenC-Hib (MenAC-Hib) вакцин

1) MenC-Hib або MenA-MenC-Hib без ад'ювантів

MenAC-Hib: капсульний полісахарид *N. meningitidis* типу A, кон'югований з білком D (з використанням CDAP-методики), капсульний полісахарид *N. meningitidis* типу C, кон'югований з білком D, і капсульний полісахарид *H. influenzae* типу b, кон'югований з TT, змішували разом у кількості 5 мкг кожного полісахариду в кожному кон'югаті на 0,5мл дози для людини. Значення pH доводили до 6,1, і ліофілізували в присутності сахарози.

MenC-Hib: капсульний полісахарид *N. meningitidis* типу C, кон'югований з білком D (з використанням CDAP-методики) і капсульний полісахарид *H. influenzae* типу b, кон'югований з TT, змішували разом у кількості 5 мкг полісахариду в кожному кон'югаті на 0,5мл дози для людини. Значення pH доводили до 6,1, і ліофілізували в присутності сахарози.

2) MenA-MenC-Hib з ад'ювантами

Капсульний полісахарид *N. meningitidis* типу A, кон'югований з білком D (з використанням CDAP-методики), капсульний полісахарид *N. meningitidis* типу C, кон'югований з білком D, і капсульний полісахарид *H. influenzae* типу b, кон'югований з TT, адсорбували кожний окремо в сольовому розчині на фосфаті алюмінію (5мкг кожного кон'югату на 100мкг, 100мкг і 60мкг Al, відповідно, на дозу). Адсорбовані вакцини змішували разом при pH 6,1 і ліофілізували в присутності сахарози.

Приклад 3: Клінічне випробування

У дослідженні MenAC-Hib 001 оцінюється імуногенність, реактогенність і безпека, індукована MenC-Hib і MenAC-Hib (адсорбованої і не адсорбованої), виготовленими відповідно до вищевказаного приклада, які давали немовлям у виді трьох-дозової первинної вакцинації.

Дане дослідження є фазою II, рандомізоване дослідження, і містило п'ять досліджуваних груп. Препарати, що оцінювали, були ліофілізований простий і адсорбований препарат MenAC-Hib і простий препарат MenC-Hib. Ці три препарати вводили немовлям у віці 3, 4 і 5 місяців у трьох перших досліджуваних групах; Tritanrix-HepB™ давали відповідним чином (у виді окремої ін'єкції) у цих трьох групах. Простий препарат MenAC-Hib також розводили в рідкій комбінованій дифтерійно-правцевій, щільно-клітинній коклюшній, гепатит В - вакцині (Tritanrix-HepB™) і вводили у виді єдиної ін'єкції немовлям у віці 3, 4 і 5 місяців у четвертій досліджуваній групі. У п'ятій групі (контроль) вводили Tritanrix-HepB™-Hib вакцину немовлям у віці 3, 4, 5 місяців. Дослідження було відкритим, але в двох перших групах, що отримують два різних препарати MenAC-Hib, було подвійним сліпим, також як і в двох останніх групах, які отримують Tritanrix-HepB™-MenAC-Hib і Tritanrix-HepB™-Hib вакцини. У результаті, досліджуваними групами були:

Група А	MenA <sub>5мкг</sub> C <sub>5мкг</sub> -Hib <sub>5мкг</sub> +DTPw-HepB	N=80
Група В	MenA <sub>5мкг</sub> C <sub>5мкг</sub> -Hib <sub>5мкг</sub> адсорбована+DTPw-HepB	N=80
Група С	MenC <sub>5мкг</sub> -Hib <sub>5мкг</sub> +DTPw-HepB	N=80
Група D	DTPw-HepB/MenA <sub>5мкг</sub> C <sub>5мкг</sub> -Hib <sub>5мкг</sub>	N=80
Група Е	DTPw-HepB/MenA <sub>5мкг</sub> C <sub>5мкг</sub> -Hiberix	N=80

Результати показали, що кожен препарат, що оцінювали, індукував гарну імунну відповідь проти кожного антигену (визначали антитіла проти менингококових груп А та С, Полі-Рібозил-Фосфата (капсульного полісахариду *H. influenzae* типу b), дифтерійного анатоксину, правцевого т анатоксину, Bordetella pertussis і гепатиту В). Кожний вакцинний препарат добре переносився.

#### Пост-III Анти-Полі-Рібозил-Фосфат (PRP)

Група	>0,15мкг/мл % [LL-U.L]	>1,0мкг/мл % [LL-U.L]	GMC (мкг/мл) [LL-U.L]
MenAC-Hib N=67	98,5 [92,0-100,0]	98,5 [92,0-100,0]	19,0 [13,7-26,3]
MenAC-Hib_ads N=71	100,0 [94,9-100,0]	90,1 [80,7-95,9]	7,6 [5,6-10,7]
MenC-Hib N=66	100,0 [94,6-100,0]	95,5 [87,3-99,1]	12,6 [9,2-17,2]
DTPw-HepB/MenAC-Hib N=67	98,5 [92,0-100,0]	94,0 [85,4-98,3]	8,7 [6,2-12,2]
DTPw-HepB/Hiberix N=69	98,6 [92,2-100,0]	92,8 [83,9-97,6]	7,5 [5,5-11,3]

0,15 і 1,0мкг/мл є типовими порогами титрів, які спостерігають для оцінки серологічного захисту. У випадку DTPw-HepB/MenAC-Hib вакцини Hib-інтерференція відсутня. Це також можна бачити на Фіг. 1, що показує зворотну кумулятивну криву (RCC) даних. Крім того, є несподіваним, те, що не адсорбована MenAC-Hib вакцина показала значно більш високий анти-PRP титр у порівнянні з адсорбованим препаратом.

#### Пост-III анти-білок D IgG

Група	>100ЕШ/мл %	GMC (ELU/мл)
-------	----------------	-----------------

	[LL-U.L]	[LL-U.L]
MenAC-Hib N=64	96,9 [89,2-99,6]	842 [662-1072]
MenAC-Hib_ads N=66	100,0 [94,6-100,0]	1480 [1195-1831]
MenC-Hib N=63	95,2 [86,7-99,0]	550 [426-709]
DTPw-HepB/MenAC-Hib N=63	100 [94,3-100,0]	1815 [1411-2335]
DTPw-HepB/Hiberix N=64	14,1 [6,6-25,0]	62,1 [54-72]

Дивися також Фіг.2 для відповідних RCC анти-PD IgG кривих. Як можна бачити, усі препарати індукували імунну відповідь до білка-носія (білок D).

Пост-III анти-PSA (капсульний полісахарид  
менінгококу A) IgG

Група	>0,3мкг/мл % [LL-U.L]	GMC (мкг/мл) [L.L.-U.L]
MenAC-Hib N=52	100,0 [93,2-100,0]	7,4 [6,0-9,1]
MenAC-Hib_ads N=55	100,0 [93,5-100,0]	9,8 [7,9-12,2]
MenC-Hib N=39	17,9 [7,5-33,5]	0,22 [0,16-0,29]
DTPw-HepB/MenAC-Hib N=61	98,4 [91,2-100,0]	15,1 [11,5-19,9]
DTPw-HepB/Hiberix N=57	3,5 [0,4-12,1]	0,16 [0,14-0,18]

Цей тест є тестом ELISA, в якому визначають вміст IgG проти менінгокового полісахариду A. На Фіг.3 показані RCC графіки даних. Відсутня інтерференція МепА полісахаридного антигену, з індукцією щонайменше тієї ж кількості антитіл, які є у випадку DTPw-HepB/MenAC-Hib вакцини.

Пост-III анти-SBA проти менінгококу серогрупи A

Група	>1:8 % [LL-U.L]	GMT [LL-U.L]
MenAC-Hib N=52	92,5 [79,6-98,4]	40,1 [26,2-61,4]
MenAC-Hib_ads N=44	90,9 [78,3-97,5]	40,6 [24,5-67,0]
MenC-Hib N=0	Не робили	Не робили
DTPw-HepB/MenAC-Hib N=50	92,5 [79,6-98,4]	67,7 [45,3-101,1]
DTPw-HepB/Hiberix N=57	0,0 [0,0-8,0]	0,16 [0,14-0,18]

Цей тест є бактерицидним тестом, в якому визначають антитіла з бактерицидними властивостями проти менінгококу серогрупи A. Відсутня інтерференція МепА полісахаридного антигену, з індукцією щонайменше тієї ж кількості антитіл, які є у випадку DTPw-HepB/MenAC-Hib вакцини.

Пост III анти-PSC (капсульний полісахарид менінгококу C) IgG та SBA-MenC

Група	Анти-PSC IgG		SBA-MenC	
	%>0,3мкг/мл [LL-U.L]	GMC [LL-U.L]	%>1:8 [LL-U.L]	GMT [LL-U.L]
MenAC-Hib N=52/51	100,0 [93,2-100,0]	6,9 [5,7-8,2]	96,1 [86,5-99,5]	322,5 [208,7-498,5]
MenAC-Hib_ads N=55/57	100,0 [93,5-100,0]	10,4 [8,6-12,7]	86,0 [74,2-93,7]	144,6 [87,1-239,8]
MenC-Hib N=40/37	100,0 [91,2-100,0]	6,4 [5,2-7,9]	97,3 [85,8-99,9]	270,8 [167,7-437,3]
DTPw-HepB/MenAC-Hib N=61/61	100,0 [94,1-100,0]	12,1 [10,2-14,4]	91,8 [81,9-97,3]	394,2 [244,8-634,9]

DTPw-НерВ/Hiberix N=57/59	3,5 [0,4-12,1]	0,16 [0,14-0,18]	1,7 [0,0-9,1]	4,4 [3,6-5,3]
------------------------------	-------------------	---------------------	------------------	------------------

Цей тест є тестом ELISA, в якому визначають вміст IgG проти менингококового полісахариду С. На Фіг.4 показані RCC графіки даних. SBA-MenC є бактерицидним тестом, в якому визначають бактерицидну активність сироватки проти менингококу С. Це є одиницею виміру функціональних антитіл. На Фіг.5 показані RCC графіки даних. Відсутня інтерференція на MenC полісахаридний антиген, з індукцією такої ж кількості функціональних антитіл, як у випадку, коли він присутній у DTPw-НерВ/MenAC-Hib вакцині.

Пост-III SBA-MenC проти менингококу  
серогрупи С

Група	SBA-MenC	
	%>1:8 [L.L.-U.L.]	GMT [L.L.-U.L.]
MenAC-Hib N=61	95,1 [86,3-99,0]	293,4 [195,6-440,3]
MenAC-Hib_ads N=67	85,1 [74,3-92,6]	151,4 [94,2-242,4]
MenC-Hib N=55	96,4 [87,5-99,6]	297,8 [201,4-440,4]
DTPw-НерВ/MenAC-Hib N=61	93,4 [84,1-98,2]	426,9 [271,2-671,9]
DTPw-НерВ/Hiberix N=62	1,6 [0,0-8,7]	4,4 [3,7-5,2]

Цей тест є бактерицидним тестом, в якому визначають антитіла з бактерицидними властивостями проти менингококу серогрупи А. Це є одиницею виміру функціональних антитіл. Відсутня інтерференція на MenC полісахаридний антиген, з індукцією такої ж кількості функціональних антитіл, як у випадку, коли він присутній у DTPw-НерВ/MenAC-Hib вакцині.

Рівні сероконверсії антитіл до дифтерії, правцеві, клітин В. Pertussis і НерВ

Схема (3-4-5 місяців)	D	T	BP	НерВ
MenAC-Hib	98,5 [92,0-100]	98,5 [92,0-100]	95,5 [87,3-99,1]	92,5 [83,4-97,5]
DTPw-НерВ/MenAC-Hib	98,5 [92,0-100,0]	100 [94,6-100]	97,0 [89,5-99,6]	97,0 [89,6-99,6]
DTPw-НерВ/Hiberix	100 [94,8-100,0]	100 [94,7-100]	97,1 [89,8-99,6]	97,1 [89,9-99,6]

BP відноситься до В. pertussis. Тест ELISA був зроблений з визначенням IgG проти цільноклітинних бактерій.

Геометричний середній титр (GMT) антитіл до дифтерії, правцеві, кліткам В. pertussis і НерВ				
Схема(3-4-5 місяців)	D	T	BP	НерВ
MenAC-Hib	2,02 [1,62-2,51]	2,18 [1,69-282]	74,9 [61,9-90,8]	357,5 [236,2-541,2]
DTPw-НерВ/ MenAC-Hib	1,69 [1,36-2,09]	2,42 [1,96-3,00]	71,6 [59,7-85,9]	380,2 [265,1-545,2]
DTPw-НерВ/ Hiberix	1,26 [1,03-1,53]	2,08 [1,67-2,59]	69, [58,2-81,8]	379,1 [265,0-542,2]

З попередніх двох таблиць спостерігалось, що імунна відповідь на DT, TT, Pw і НерВ подібна до відповідей, отриманих за допомогою зареєстрованої Tritanrix-НерВ вакцини, з точки зору як сероконверсії, так і GMT.

Приклад 4: Отримання Hib- 11-валентної пневмококової вакцини на основі кон'югату (Hib/Strep11V)  
Капсульний полісахарид Н. influenzae типу b, кон'югований з TT (10мкг полісахариду в кон'югаті на дозу), що був ліофілізований при pH 6,1 у присутності лактози [Hiberix™ (SmithKline Beecham Biologicals)] розчиняли безпосередньо (у день використання) у рідкому розчині 11-валентного пневмококового капсульного полісахариду (серотипи 1, 3, 4, 5, 6В, 7F, 9V, 14, 18С, 19F і 23F), кон'югованого з PD (1 мкг полісахариду в кожній кон'югаті на дозу). Пневмококову вакцину попередньо адсорбували на 0,5 мг Al<sup>3+</sup> (у виді AlPO<sub>4</sub>).

Приклад 5: Клінічні випробування вакцини з Прикладу 4

Вакцину з Прикладу 4 і контрольну вакцину вводили в трьох-дозовому режимі (3-, А-, 5-місячний вік) німецьким немовлям.

Результати імунної відповіді (визначена через 1 місяць після останнього первинного введення) були наступними.

Анти-пневмококові IgG антитіла: GMC (мкг/мл) (за допомогою ELISA)

PS Антитіло	Тимін, г	Група А			Група D		
		N	S+[%]	GMC	N	S+[%]	GMC
Анти-1	PIП	30	100	1,23	33	100	0,99
Анти-3	PIП	30	100	2,04	33	97,0	1,20
Анти-4	PIП	30	100	0,98	33	100	1,03
Анти-5	PIП	30	100	1,33	33	100	1,34
Анти-6В	PIП	30	100	0,54	33	100	0,62
Ahth-7F	PIП	30	100	1,60	33	100	1,33
Ahth-9V	PIП	30	100	1,61	33	100	1,21
Анти-14	PIП	30	100	2,27	33	100	2,32
Анти-18С	PIП	30	100	1,06	33	100	1,04
Ahtm-19F	PIII	30	100	2,05	33	100	1,92
Ahth-23F	PHI	30	96,7	0,75	33	100	0,76

Група А = 11 Pn-PD + Infanrix-HeXa™ (Infanrix-Penta плюс доданий Hib-кон'югат);

Група D = 11Pn-PD/Hib + Infanrix-PeNTa™.

+ позначає супутнє (у різних частинах), а не комбіноване введення.

Відсоток суб'єктів з концентраціями антитіл не менш ніж 0,5мкг/мл

Група	PS1	3	4	5	6B	7F	7V	14	18C	19F	23F
D	84,8	87,9	87,9	90,9	51,5	90,9	93,9	97,0	81,8	97,0	72,7
A	86,7	96,7	76,7	90,0	50,0	93,3	90,0	90,0	80,0	96,7	66,7

Анти-PRP антитіла: GMC  
(мкг/мл) (за допомогою ELISA)

		Група D (N=34)		
		n≥1мкг/мл [%]	GMC [мкг/мл]	
Анти-PRP	PIII	33	100	10,75

100% суб'єктів мали концентрації анти-PRP (Hib-полісахарид) антитіл не менш ніж 1,0мкг/мл.

Hiberix (не адсорбований Hib-ТТ-кон'югат) мала GMC після подібної схеми введення приблизно 6мкг/мл.

Імунна відповідь, у показниках антитіл, визначених ELISA, у немовлят, що отримували 11Pn-PD/Hib вакцину, був подібний відповіді, що спостерігається в тих, хто отримував 11 Pn-PD вакцину, для всіх серотипів, за винятком серотипів 1, 3 і 9V, для яких тенденція до більш низьких геометричних середніх концентрацій спостерігалася для 11Pn-PD/Hib вакцини. Однак ці відмінності були незначні, як показано перекриванням 95% довірчих інтервалів.

11 Pn-PD/Hib вакцина індукувала функціональні (опсонофагоцитинні) антитіла до всіх 11 серотипів.

Комбінована Hib-вакцина з пневмококовою кон'югатною вакциною не перешкождала в значній мірі пневмококовій імунній відповіді і, на подив, підсилювала анти-PRP відповідь у порівнянні з обома зареєстрованими вакцинами Infanrix-HeXa і Hiberix.

Приклад 6: Клінічне випробування ефекту більш низьких кількостей Hib у DTPwHepB вакцині

Рандомізоване випробування для оцінки імуногеності вакцини на основі Hib-ТТ-кон'югату в різних дозах у SB Biologicals DTPwHepB (Tritanrix™-HB) вакцини здійснювали у виді первинної вакцинації у здорових немовлят у віці 6, 10 і 14 тижнів.

544 суб'єктам у чотирьох групах (по 136 кожна) вводили наступні вакцини:

Група 1: DTPwHepB безпосередньо змішували з повною дозою Hib-ТТ (PRP 10мкг; ТТ 10-20мкг; лактоза 12,6мкг; алюміній (у виді солей) 0,15мг);

Група 2: DTPwHepB безпосередньо змішували з половинною дозою Hib-ТТ (PRP 5мкг; ТТ 10-20мкг; лактоза 10мкг; алюміній (у виді солей) 0,0755мг);

Група 3: DTPwHepB безпосередньо змішували з четвертинною дозою Hib-ТТ (PRP 2,5 мкг; ТТ 5-10мкг; лактоза 10мкг; алюміній (у виді солей) 0,036 мг);

Група 4: DTPwHepB супутнім чином вводили (у різних частинах) з повною дозою Hib-ТТ.

:

Геометричні середні  
титри (GMTs) анти-PRP антитіл через один  
місяць після третьої дози були наступними

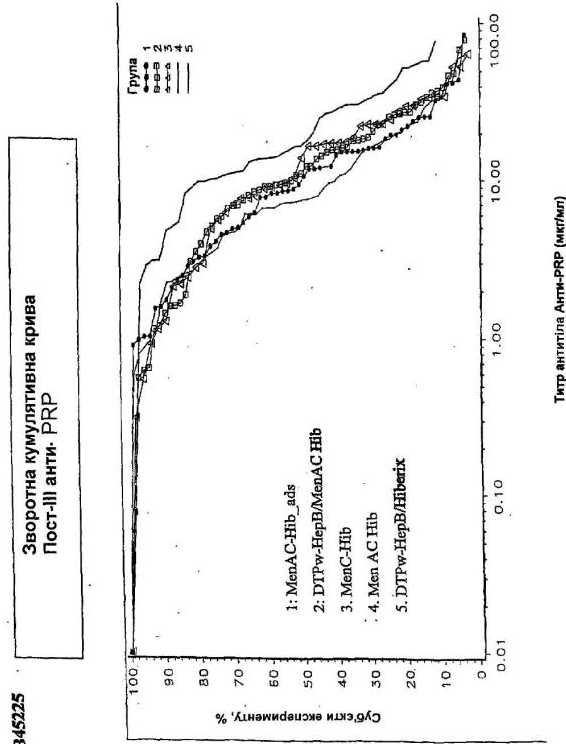
Група	N	GMT	95% довірчий інтервал	
1	130	14,766	11,835	18,423
2	124	17,304	14,209	21,074
3	124	21,010	16,950	26,044
4	126	22,954	18,463	28,538

Препарат з низькою дозою, несподівано, виявляв самі високі величини GMT. Цей ефект повинний бути

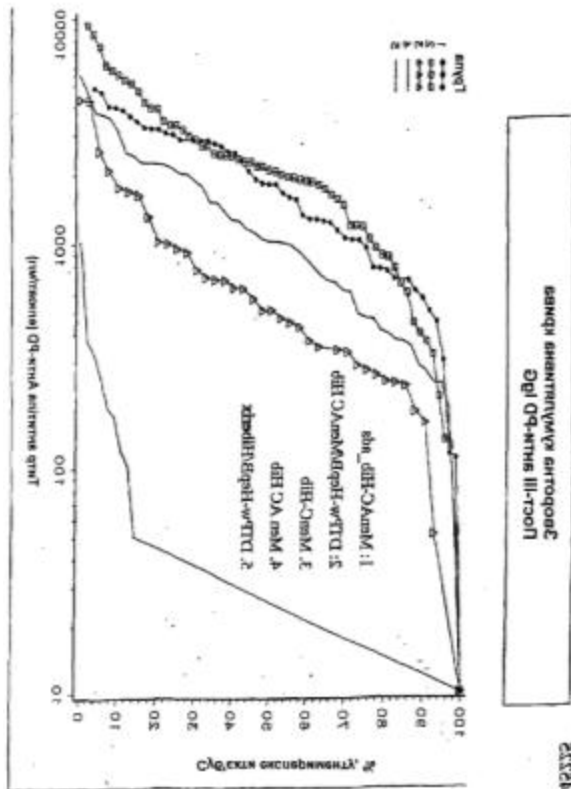


навіть більше, якщо Hib-ТТ вакцина не адсорбована.

В45225

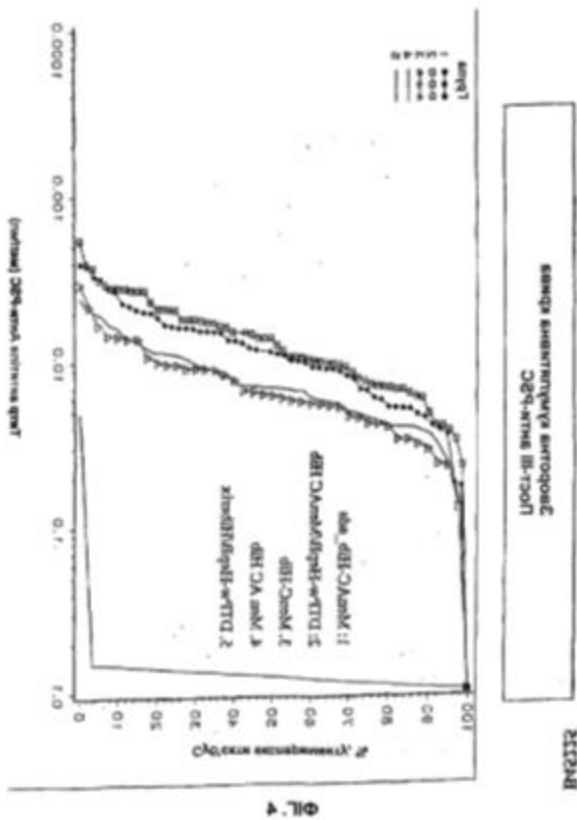


Фіг. 1

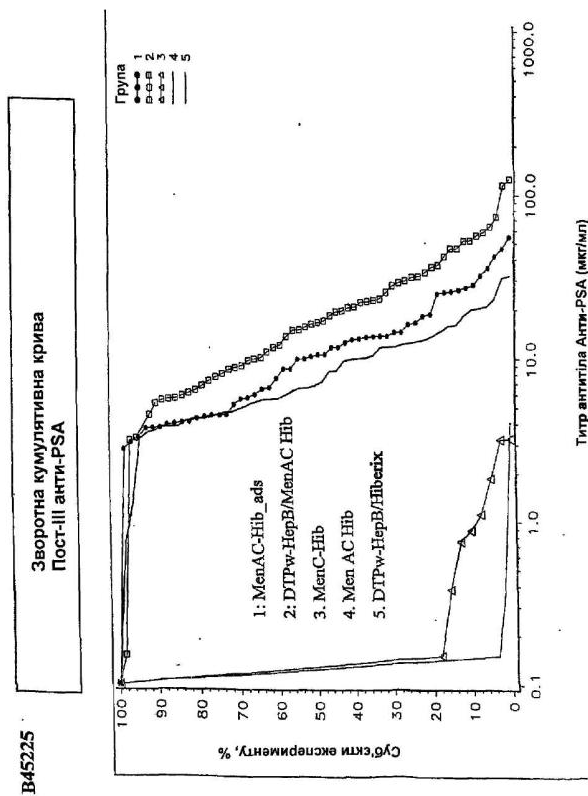


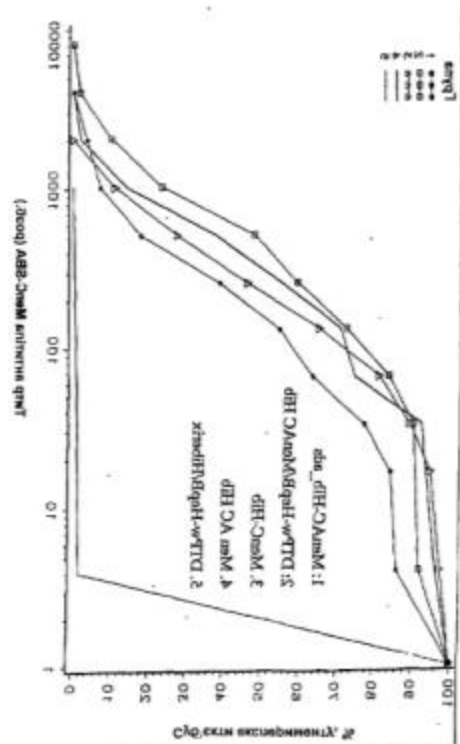
Фіг. 2

В45232



ФІГ. 3





Цост-III 28У-Менс  
Звонилна кълмилена кълма

В42332