



(51) МПК
A61K 39/112 (2006.01)
A61K 39/165 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/114 (2019.02); *A61K 39/165* (2019.02); *A61K 31/715* (2019.02); *A61P 31/04* (2019.02); *A61P 31/12* (2019.02); *A61K 2300/00* (2019.02); *A61K 2123/00* (2019.02)

(21) (22) Заявка: 2016110576, 19.08.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 19.08.2014

Дата регистрации:
 10.04.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 24.08.2013 IN 3750/CHE/2013

(43) Дата публикации заявки: 28.09.2017 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 10.04.2019 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 24.03.2016

(86) Заявка РСТ:
 IN 2014/000530 (19.08.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2015/029056 (05.03.2015)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
 "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭЛЛА Кришна Муртхи (IN),
 РАМАСАМИ Венкатесан (IN),
 НАИДУ Мандалапу Гангадхара (IN)

(73) Патентообладатель(и):

БХАРАТ БАЙОТЕК ИНТЕРНЭШНЛ
 ЛИМИТЕД (IN)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CN 1404873 A, 26.03.2003. WO 00/33882 A1, 15.06.2000. JANG H. et al. Optimization of VI capsular polysaccharide production during growth of Salmonella enterica serotype Typhi Ty2 in a bioreactor. J.Biotechnol. 2008 May 20; 135(1): 71-7 [онлайн] [найдено 26.04.2018] (найдено из интернет: [www:nabi.nlm.nih.gov/pubmed/18400326](http://www.nabi.nlm.nih.gov/pubmed/18400326)) реферат, разделы (см. прод.)

(54) БАКТЕРИАЛЬНАЯ ВАКЦИНА И СПОСОБЫ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений касается стабильных составов вакцин. Предложены: вакцина для предотвращения брюшного тифа, вызванного Salmonella typhi, включающая частично де-О-ацетилированный капсулярный Vi-полисахарид (ViPs) Salmonella typhi, конъюгированный с белком-носителем с формированием конъюгированного вакцинального антигена, причем ViPs дериватизированы с линекером, представляющим собой дигидразид адипиновой кислоты (ADH), или без него, причем указанный

антиген присутствует в концентрации от 5 до 25 мкг на дозу, предпочтительно 25 мкг на дозу; предложены способы её получения (варианты), способ профилактики брюшного тифа и комбинированный состав вакцины, содержащий антиген, представляющей собой конъюгат Vi-полисахарида S. typhi со столбнячным токсином (ViPs-ТТ) и антиген кори, где отсутствует антигенная интерференция между ViPs-ТТ и антигеном кори. Технический результат: вакцины изобретения способны индуцировать развитие

иммунитета против брюшного тифа, включая детей младше 2 лет посредством всего одной

инъекции для проведения полного курса вакцинации. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 13 ил., 15 табл.

(56) (продолжение):

3.2.-3.3. ALDER M.D. et al. Transport of antibiotica and metabolite analogs by systems under cyclic AMP control: positive selection of *Salmonella typhimurium* *cya* and *crp* mutants. *Journal of Bacteriology* Jan 1978 133(1): 149-152. CA 2674345 A1, 10.07.2008. WO 2012/164480 A1, 06.12.2012. RU 2428991 C9, 27.12.2011.

R U 2 6 8 4 6 1 5 C 2

R U 2 6 8 4 6 1 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(19) **RU** (11) **2 684 615⁽¹³⁾ C2**

(51) Int. Cl.
A61K 39/112 (2006.01)
A61K 39/165 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(52) CPC

A61K 39/114 (2019.02); *A61K 39/165* (2019.02); *A61K 31/715* (2019.02); *A61P 31/04* (2019.02); *A61P 31/12* (2019.02); *A61K 2300/00* (2019.02); *A61K 2123/00* (2019.02)

(21) (22) Application: **2016110576, 19.08.2014**

(24) Effective date for property rights:
19.08.2014

Registration date:
10.04.2019

Priority:

(30) Convention priority:
24.08.2013 IN 3750/CHE/2013

(43) Application published: **28.09.2017 Bull. № 28**

(45) Date of publication: **10.04.2019 Bull. № 10**

(85) Commencement of national phase: **24.03.2016**

(86) PCT application:
IN 2014/000530 (19.08.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/029056 (05.03.2015)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ELLA Krishna Murtkhi (IN),
RAMASAMI Venkatesan (IN),
NAIDU Mandalapu Gangadkhara (IN)**

(73) Proprietor(s):

**BKHARAT BAJOTEK INTERNESHNL
LIMITED (IN)**

(54) **BACTERIAL VACCINE AND METHODS FOR PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions concerns stable compositions of vaccines. Disclosed are: a vaccine for preventing typhoid caused by Salmonella typhi, comprising a partially de-O-acetylated capsular Vi-polysaccharide (ViPs) Salmonella typhi, conjugated with a carrier protein to form a conjugated vaccine antigen, wherein ViPs are derivatized with a line which is an adipic acid dihydrazide (ADH), or without it, wherein said antigen is present in concentration of 5 to 25 mcg per dose, preferably 25 mcg per dose; disclosed are methods for production thereof (embodiments),

method for preventing typhoid fever and a combined composition of a vaccine containing an antigen which is a conjugate of Vi-polysaccharide S. typhi with tetanus toxin (ViPs-TT) and a measles antigen, where there is no antigenic interference between ViPs-TT and the measles antigen.

EFFECT: technical result: vaccines of the invention are capable of inducing the development of immunity against typhoid, including children under 2 years old by means of only one injection for the full course of vaccination.

15 cl, 13 dwg, 15 tbl

RU 2 684 615 C 2

RU 2 684 615 C 2

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области бактериальных вакцин, которые характеризуются способностью вызывать соответствующий иммунный ответ против брюшного тифа у младенцев (до 2 лет), детей и взрослых. В частности, настоящее изобретение относится к конъюгированным вакцинам и способам их получения, в которых нативные полисахариды *Salmonella typhi* конъюгируют с белками-носителями и выпускают в составе профилактической конъюгированной вакцины. Более того, настоящее изобретение также относится к области комбинированных составов вакцин для защиты от *Salmonella typhi* и вируса кори.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Salmonella typhi представляет собой бактерию, вызывающую брюшной тиф у людей, который является основным эндемичным заболеванием в Африке, Азии и Ближнем Востоке. Установлено, что заболевание чаще всего передается через зараженные *S. typhi* продукты питания или воду. В ходе различных исследований показали, что глобальное бремя брюшного тифа различается в разных частях света. Более 100 случаев на 100000 населения в год отмечали в Южной Центральной Азии и Юго-Восточной Азии; заболеваемость брюшным тифом в Азии, Африке, Латинской Америке и странах Карибского бассейна оценивают как среднюю, т.е. от 10 до 100 случаев на 100000 человек в год; в Новой Зеландии, Австралии и Европе заболеваемость низкая или очень низкая (Crump et al., 2004). Это указывает на то, что брюшной тиф строго эндемичен для ряда регионов земного шара, в частности для развивающихся стран и стран с низким уровнем ресурсообеспеченности.

Сальмонелла (лат. *Salmonella*) принадлежит к семейству Энтеробактерий (лат. *Enterobacteriaceae*), которое включает также роды Шигелла (лат. *Shigella*), Эшерихия (лат. *Escherichia*) и Вибрио (лат. *Vibrio*). Род Сальмонелла содержит два разных вида *S. enterica* и *S. bongori*. *S. enterica* также подразделяют на шесть подвидов (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* и *indica*), содержащих 2443 серовара. Возбудителем брюшного тифа является *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *typhi* (принятое название *S. enterica* серовар *typhi*) и серовары *Paratyphi* А, В и С. Серовар или серотип может быть определен как штамм, имеющий уникальную поверхностную молекулу, отвечающую за образование специфичного антитела. Каждый серотип имеет небольшие химические отличия в антигенной области (Brenner et al., 2000).

Salmonella typhi обладает набором характеристик, делающих ее эффективным патогеном. Этот вид содержит эндотоксин, типичный для грамотрицательных микроорганизмов, а также Vi-полисахаридный антиген, который, как считается, повышает вирулентность. Он также образует и выделяет белок известный как «инвазин», который способствует захвату бактерий нефагоцитирующими клетками и позволяет бактериям жить внутриклеточно. Также он способен ингибировать окислительный взрыв в лейкоцитах, делая врожденный иммунный ответ неэффективным. На протяжении последнего десятилетия у видов *Salmonella* обнаруживали все большее и большее расширение устойчивости к антибиотикам. Причиной этого, видимо, является частое и неразборчивое применение антибиотиков для лечения сальмонеллеза у человека и животных и добавление ускоряющих рост антибиотиков в корма домашних животных. Передающаяся через плазмиды устойчивость к антибиотикам часто встречается среди штаммов *Salmonella*, вызывающих детские эпидемии. Устойчивость к ампициллину, стрептомицину, канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, цефтриаксону, цефотаксину, цефоперазону и сульфонидами встречается часто. Устойчивости к колистину на данный момент не отмечали. Штаммы *Salmonella* необходимо

систематически проверять на предмет устойчивости к антибиотикам с целью обеспечения при необходимости выбора эффективного лекарственного средства и выявления любых изменений в чувствительности штаммов (происходящих как из человека, так и из животных) к антибиотикам. До 1972, штаммы *Salmonella typhi* сохраняли чувствительность к антибиотикам, в том числе к хлорамфениколу (антибиотик, чаще всего применяемый против брюшного тифа); но в 1972 обширная эпидемия в Мексике была вызвана устойчивым к хлорамфениколу штаммом *Salmonella typhi*. С тех пор выделили другие устойчивые к хлорамфениколу линии в Индии, Таиланде и Вьетнаме.

Вакцинация против брюшного тифа, вызванного *Salmonella Typhi*, необходима для защиты от этого заболевания, угрожающего жизни в связи с нарастающей устойчивостью к антибиотикам. Она также является важным защитным средством для людей, путешествующих в регионы, где брюшной тиф является эндемичным заболеванием. Так как бактерия может приобретать множественную лекарственную устойчивость, антибиотики не могут обеспечить полной защиты от заболевания. На данный момент для использования доступны три типа брюшнотифозных вакцин: (1) парентеральная инактивированная цельноклеточная вакцина; (2) пероральная живая аттенуированная вакцина и (3) вакцина, содержащая брюшнотифозный капсулярный Vi-полисахарид для парентерального применения. Вакцины против брюшного тифа создавали в те далекие времена, когда сложное устройство организма на клеточном и молекулярном уровнях было четко изучено. Изначально в качестве вакцины использовали вводимые парентерально цельноклеточные *S.typhi*, инактивированные разогретым фенолом, которые необходимо было вводить в виде двух доз. Так как цельноклеточные инактивированные вакцины содержат «О» антиген (эндотоксин), они могут вызывать местные и общие реакции у вакцинированных индивидов, и эти типы вакцин требуют введения бустерной дозы каждые два года. Пероральные живые аттенуированные вакцины Ty21a являются представителем второго поколения вакцин, которые получают с помощью мутантного штамма *S.typhi*, лишённого аденилатциклазы и АМФ рецепторного белка, и мутантов, ауксотрофных по п-аминобензоату и аденину. Показали, что эти живые аттенуированные вакцины обладают низкой эффективностью и не подходят для введения детям младше 6 лет. Кроме того, каждые 5 лет также необходимо вводить бустерную дозу вакцины. Впоследствии, капсулярный Vi-полисахарид *S.typhi* идентифицировали в качестве защитного иммуногена, способного вызывать адекватный иммунный ответ у людей, и с тех пор применяли в качестве потенциального кандидата в вакцины для стандартной схемы вакцинации. В дозе 25 мкг/0,5 мл инъекция очищенного капсулярного Vi-полисахарида (ViPs, Vi-polysaccharide) может вызвать максимальную сероконверсию, т.е. 4-кратное увеличение уровня антител. Однако во многих клинических исследованиях сообщалось об ограничениях применения Vi-полисахаридных вакцин, так как нативные полисахаридные вакцины не способны вызывать или не вызывают вторичный иммунный ответ. Этот феномен объясняется тем, что бактериальные полисахариды являются независимыми от Т-клеток по своей природе, и поэтому не способны вызывать клеточноопосредованные иммунные ответы. Таким образом, чтобы преодолеть изложенную проблему, полисахариды *S.typhi* в дальнейшем конъюгировали с белками-носителями для создания молекул «полисахарид-белок» и превращения их в зависимые от Т-клеток антигены. На связывание полисахаридов и белков оказывает влияние множество факторов, зависящих от молекулярного веса выбранных ViPs и белков-носителей и активации функциональных групп. Полисахариды с низким молекулярным весом могут эффективно связываться с белками-носителями. Различные белки-носители, такие как столбнячный токсин, белок

дифтерийного токсина CRM 197, В-субъединица термолabile токсина (В subunit heat-labile toxin (LT-B)) *Escherichia coli*, рекомбинантный экзобелок А (rЕРА) *Pseudomonas aeruginosa* и гемоцианин мечехвоста (Horseshoe crab Наемосуанин (НСН)), чаще всего применяли для конъюгации.

5 В WO1996/011709 раскрыт О-ацетилованный олигонуклеотид или полигалактоуронатпектин, в основном идентичный структуре субъединицы Vi-полисахарида, конъюгированный с белком-носителем столбнячным токсином, где белок-носитель модифицирован цистамином. В этой конкретной заявке на патент описано конъюгирование идентичного полисахарида, но не Vi-полисахарида, с белком-носителем и отличным от цистамина модифицирующим веществом. Впоследствии в
10 WO1998/026799 раскрыт изолированный липополисахарид из *Salmonella Paratyphi A* с удаленным посредством детоксификации липидом А, сохраняющим О-ацетил на уровне от 70 до 80%, а затем конъюгированный с белком-носителем столбнячным токсином с помощью дигидразида адипиновой кислоты (ADH, adipic acid dihydrazide). В WO2000/
15 033882 раскрыт конъюгат Vi-полисахарида *Salmonella typhi*, ковалентно связанного с белком *Pseudomonas aeruginosa* (Vi-rЕРА) через дигидразид адипиновой кислоты. WO2007/039917 раскрывает экзогенный антиген *Salmonella typhi*, который ковалентно/нековалентно связан с белком теплового шока.

В WO2009/150543 описан конъюгированный Vi-полисахарид для применения в
20 качестве вакцинальной композиции против *Salmonella typhi*, вызывающей брюшной тиф, где Vi-полисахарид ковалентно конъюгирован с белком, выбираемым из CRM197 или столбнячного токсина. Способ конъюгации, как раскрыто в WO2009/150543, включает сначала одновременное добавление белка-носителя, который предпочтительно является CRM197 или столбнячным токсином, к линкеру, такому как дигидразид
25 адипиновой кислоты (ADH), и карбодиимида, такому как 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDAC, 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide), для получения производного белка-носителя в присутствии 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (буфера MES, 2-(N-morpholino) ethane sulphonie acid). Отношение массы карбодиимида EDAC к белку-носителю составляет от 0,1 до 0,15.
30 WO2009/150543 также раскрывает, что более высокие величины отношения карбодиимид/белок могут вызывать образование агрегатов. За получением производных белка-носителя также следует активация Vi-полисахарида (ViPs). Vi-полисахарид также активируют с помощью карбодиимида, при этом различные соотношения ViPs и карбодиимида (EDAC) смешивают для получения активированного Vi-полисахарида.
35 Упомянут, что активация Vi-полисахарида может происходить при комнатной температуре в течение 2 минут, при этом можно применять более высокие соотношения от 1,5:1 до 200:1. Производные белка-носителя, CRM197 или столбнячного токсина, и активированный Vi-полисахарид *Salmonella typhi* затем реагируют друг с другом, с образованием конъюгированного ViPs-CRM197 или ViPs-ТТ конъюгата, после чего
40 отмывают избыток линкера.

Безопасность и иммуногенность вакцин, содержащих конъюгат ViPs, у взрослых, подростков и детей от 2 до 4 лет из Вьетнама оценивали Zuzana Kossaczka et al в 1999. В этом исследовании уровень среднего геометрического анти-Vi-rЕРА (конъюгированная вакцина) у детей от 2 до 4 лет был выше, того, что удавалось получить с помощью Vi-капсулярной полисахаридной вакцины у детей в возрасте от 5 до 14 лет. Повторная
45 инъекция конъюгированной вакцины вызывала повышение титров антител у детей от 2 до 4 лет (зависимое от Т-клеток). Konadu et al. (2000) получили О-специфичный полисахарид *S. paratyphi A* (O-SP) и соединили его со столбнячным токсином. Эти

конъюгаты вызывали образование IgG антител у мышей, а безопасность и иммуногенность этих конъюгатов оценивали у взрослых, подростков и детей 2-4 лет из Вьетнама. В исследовании сделали выводы, что данные экспериментальные конъюгаты были более безопасными и доказано вызывали образование IgG антител у взрослых, подростков и детей в возрасте 2-4 лет. Эффективность вакцины, содержащий конъюгированный ViPs *Salmonella typhi*, у детей от двух до пяти лет оценивали Feng Ying C et al. В этом исследовании конъюгированная брюшнотифозная вакцина оказалась безопасной и иммуногенной, и ее эффективность у детей от 2 до 5 лет составляла более чем 90%. Уровни сывороточных IgG антител к Vi через 6 недель после введения второй дозы увеличились в 10 раз у 36 детей, участвовавших в оценке. Эти случаи отслеживали на протяжении 27 месяцев. Серьезных нежелательных явлений, связанных с вакцинацией, в исследовании не отмечали. Дозозависимость иммуногенности ViPs конъюгированной вакцины, вводимой дважды, у вьетнамских детей в возрасте от 2 до 5 лет исследовали Do Gia Canh et al. В этом исследовании оценивали дозозависимость иммуногенности 5 мкг, 12,5 мкг и 25 мкг конъюгированной вакцины, которую инъецировали дважды с интервалом в 6 недель. Это исследование также подтвердило безопасность и стойкую иммуногенность четырех партий конъюгированной вакцины в этом и в предыдущих исследованиях. В Институте вакцин компании Новартис по всемирной охране здоровья (Novartis vaccine institute for global health) разработали три различных состава вакцин, содержащих разные дозы ViPs-CRM197. Исследованные дозы составляли 25 мкг, 12,5 мкг, 5 мкг и 1,25 мкг/доза. Среднее геометрическое титров для этих концентраций в день 28 составляло 304 ед. (единицы), 192 ед., 111 ед. и 63 ед., соответственно. В день 28 среднее геометрическое титров при дозе 25 мкг/доза вызывало наибольший подъем уровня антител после однократной инъекции (304 ед.).

Несмотря на то, что современный уровень техники включает конъюгированные вакцины, содержащие Vi-полисахарид и белок-носитель, существующие вакцины, содержащие нативный Vi-полисахаридный конъюгат, при исследовании в рамках многочисленных клинических исследований человека демонстрируют безопасность и иммуногенность у взрослых, но не способны вызвать какой-либо защитный иммунный ответ у детей младше 2 лет. Таким образом, эта вакцина, содержащая нативный полисахарид *S.typhi*, не решает проблему защиты от смертельных инфекций, вызываемых *S.typhi*, у детей младше 2 лет, и требуется новая вакцина, которая обладала бы способностью иммунизировать детей младше 2 лет против заражения *S.typhi*, вызывающих развитие брюшного тифа. Возрастная группа младше 2 лет является наиболее подверженной инфицированию *Salmonella typhi*, но, судя по всему, на сегодняшний день человечеству не известно доступных вакцин для защиты от *S.typhi* для детей младше 2 лет. Как обсуждалось выше, различные белки-носители, такие как CRM-197, r-ERA, конъюгировали с Vi-полисахаридом, при этом Vi-полисахарид не обязательно выделяли из *S.typhi*, или получали из любых других источников. Таким образом, производство брюшнотифозных конъюгированных вакцин специфично для конкретного используемого белка-носителя и нативного полисахарида, участвующих в процессе конъюгации, и для получившейся конъюгированной вакцины. Каждая реакция конъюгации белка-носителя с полисахаридом сама по себе дает новую разновидность конъюгированной вакцины. Известный уровень техники в области брюшнотифозных конъюгированных вакцин, методология, а также то, что используется в настоящее время, имеют свои недостатки, что может быть возможной причиной, объясняющей отсутствие в настоящий момент конъюгированной вакцины, способной защитить детей младше 2 лет.

Также в современном уровне техники очевидно и хорошо известно, что для проведения полного курса вакцинации имеющимися брюшнотифозными конъюгированными вакцинами требуется введение по меньшей мере 2 или более доз с интервалом в 6-8 недель. Вакцину, содержащую Vi-капсулярный полисахарид, конъюгированный со столбнячным токсином (ViPs-TT), которую вывела на рынок компания BioMed, необходимо вводить в виде 2 инъекций по 5 мкг каждая с интервалом в 6-8 недель для проведения полного курса вакцинации. Однако данной ViPs-TT вакциной также не удалось иммунизировать детей младше 2 лет против *Salmonella typhi*.

Следовательно, существует потребность в изменении методологий

конъюгации конъюгации, которое позволит уменьшить затраты и количество инъекций до всего одной инъекции, способной вызвать достаточный иммунный ответ, и других связанных с этим технических вопросов в области химической конъюгации, которая стала бы более простой, менее затратной, более рентабельной и безопасной. Эффективная вакцина должна обладать способностью вызывать хороший иммунный ответ и иметь возможность применения у детей младше 2 лет. Раскрытие, как изложено в настоящем изобретении, относится к новым альтернативным способам конъюгации Vi-полисахарида вместе со специфичным белком-носителем столбнячным токсином (TT, tetanus toxoid) по способу изобретения, изложенному в настоящей заявке, который может преодолеть недостатки нативных полисахаридных вакцин, а также проблемы современных методологий конъюгации, в том числе других ViPs вакцин конъюгированных с белками-носителями. Вакцина, содержащая Vi-полисахарид-белковый конъюгат, производимая посредством данной конкретной методологии, изложенной в настоящей заявке, лучше подходит для иммунизации детей и младенцев, в том числе младше 2 лет, при этом при вторичном иммунном ответе образуются высокоаффинные антитела к *S. typhi*, в том числе у людей всех возрастных групп. Также другим преимуществом изобретения, изложенного в настоящей заявке, является то, что количество инъекций брюшнотифозной конъюгированной вакцины, необходимых для проведения полного курса вакцинации, было уменьшено до всего ОДНОЙ инъекции, которая в тоже время вызывает лучший иммунный ответ по сравнению с иммунным ответом, вызванным вакцинацией по применяемым ранее схемам, предусматривающим 2 или 3 инъекции брюшнотифозной конъюгированной вакцины. Однократное введение брюшнотифозной конъюгированной вакцины всегда является предпочтительным у младенцев (до 2 лет) и детей, так как позволяет уменьшить число дополнительных визитов в клинику, боль, испытываемую ребенком или младенцем (до 2 лет) во время повторных инъекций в рамках вакцинации. Существуют сообщения о том, что 40% инъекций в мире производят нестерилизованными многократными шприцами и иглами, а особенно в целевых развивающихся странах доля таких инъекций превышает 70%, подвергая миллионы людей инфекциям, при которых патогены проникают в ткани тела в процессе инъекции. Более того, ненадлежащее обращение с загрязненным оборудованием для инъекций в процессе его сбора и утилизации подвергает работников здравоохранения и местное население риску ранения иглами от шприцов. К сожалению, в некоторых странах небезопасная утилизация также приводит к перепродаже использованного оборудования на черном рынке. По мнению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), открытое сжигание шприцов является небезопасным, однако половина промышленно неразвитых стран пользуется этой практикой. ("Injection safety", Health Topics A to Z. World Health Organization. Retrieved 2011-05-09.). По оценкам, небезопасные инъекции являются причиной 1,3 миллиона ранних смертей ежегодно. (M.A. Miller & E. Pisani. "The cost of unsafe injections". Bulletin of the World Health Organization

77 (10): 1808–811). Хотя для повышения безопасности инъекций ВОЗ рекомендует определенные альтернативы инъекциям при условии их доступности или другие способы контроля и регламентирования деятельности работников здравоохранения и пациентов, вакцинированных пациентов, обеспечивая доступность оборудования и вспомогательных материалов и надлежащее безопасное обращение с использованными материалами, эти меры не всегда принимают в полном объеме. В таких условиях комбинация брюшнотифозной конъюгированной вакцины с вакциной против кори в одной **ОДНОКРАТНОЙ** инъекции определенно сыграет значимую роль в уменьшении опасений, связанных с безопасностью инъекций в рамках национальной программы иммунизации. Во многих странах существуют законы или процедуры, обязывающие работников здравоохранения пользоваться безопасными шприцами (безопасно сконструированными иглами) или альтернативными способами введения лекарственных средств там, где это возможно, однако уменьшение количества инъекций, гарантирующих защиту от брюшного тифа и кори, до одной единственной инъекции для младенцев (до 2 лет), несомненно, указывает на высокий уровень соблюдения режима с точки зрения общественного здравоохранения, поскольку ранее требовалось проведение по меньшей мере 3 инъекций для введения брюшнотифозной вакцины (минимум 2 инъекции) и вакцины против кори (одна инъекция), а теперь то же самое осуществляют посредством лишь **ОДНОЙ** инъекции.

20 **ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Первичной целью изобретения является разработка состава вакцины для профилактики и лечения инфекций человека вызываемых *Salmonella typhi*, так чтобы сделать независимые от Т-клеток полисахариды зависимыми от Т-клеток, таким образом облегчив выработку эффективного иммунного ответа у детей всех возрастных групп, в особенности младше 2 лет, а также у взрослых.

Другой целью изобретения является получение композиции вакцины против брюшного тифа, вызываемого *S.typhi*, с подходящими конъюгированными полисахаридами в качестве вакцинального антигена, который обеспечил бы защиту детей младше 2 лет.

30 Первой задачей изобретения является разработка способа периодического культивирования с подпиткой для получения капсулярного Vi-полисахарида.

Еще одной задачей настоящего изобретения является разработка способов конъюгации капсулярного Vi-полисахарида с белком-носителем с уменьшением размера или без уменьшения размера.

35 Еще одной задачей настоящего изобретения является разработка альтернативных способов методологии эффективной конъюгации за меньшее время посредством уменьшения размера ViPs *Salmonella typhi* перед началом конъюгации с белком-носителем и, как следствие, увеличения процента конъюгации Vi-полисахарида с белком-носителем.

40 Еще одной задачей настоящего изобретения является разработка способа конъюгации капсулярного Vi-полисахарида *Salmonella typhi* и белка-носителя столбнячного токсина в качестве конечной массы конъюгированного полисахарида и готовой вакцины с линкерной молекулой или без нее.

Следующей задачей настоящего изобретения является получение составов иммуногенной вакцины, содержащих связанные полисахарид-белковые конъюгаты «Vi-полисахарид-белки» в соответствующих флаконах, содержащих однократную дозу или несколько доз, для введения детям и взрослым в соответствующих концентрациях, эффективно обеспечивающих профилактику против *S.typhi*.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения раскрывается культивация и обработка Vi-полисахарида *Salmonella typhi*. Далее его очищают, проводя через несколько следующих стадий обработки, для получения чистого Vi-полисахарида.

5 В соответствии с еще одним вариантом осуществления настоящего изобретения раскрывается способ конъюгации чистого Vi-полисахарида с образованием конъюгата с белком столбнячного токсина в присутствии линкерной молекулы дигидразида адипиновой кислоты (ADH, Adipic Acid Dihydrazide). Выход образующегося очищенного ViPs-ТТ конъюгата достигает 70%-80%.

10 В соответствии с другим альтернативным вариантом осуществления настоящего изобретения раскрывается способ конъюгации Vi-полисахарида с образованием конъюгата с белком столбнячного токсина в отсутствие какой-либо линкерной молекулы. Выход образующегося очищенного ViPs-ТТ конъюгата без линкера достигает 70%-80%.

15 Следующий вариант осуществления настоящего изобретения раскрывает стабильные составы вакцины, содержащей ViPs-ТТ конъюгат, с подходящими концентрациями ViPs-ТТ с или без 2-феноксэтанола в качестве консерванта для ViPs-ТТ, обеспечивающие проведение полного курса вакцинации посредством всего одной инъекции.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения представляет клинически
20 обоснованные экспериментальные данные, подтверждающие, что стабильный состав вакцины, содержащей ViPs-ТТ конъюгат, обладает выраженной серопротекцией и вызывает желаемую иммуногенность в отношении инфекции *Salmonella typhi* у людей, включая младенцев младше 2 лет (от 6 месяцев до 2 лет), а также субъектов других
25 возрастных групп посредством всего одной инъекции, составляющей полный курс вакцинации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Общая схема получения ViPs и конъюгации с линкером ADH (слева) и без линкера (справа).

Фигура 2: Тест на серологическое определение Vi-полисахарида.

30 Фигура 3: ВЭЖХ (рефрактометрический детектор) нативного брюшнотифозного Vi-полисахарида; на колонке для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии анализировали профиль очищенного Vi-полисахарида с помощью рефрактометрического детектора. Пик на 13,185 минутах представляет собой нативный Vi-полисахарид, молекулярный вес которого составляет ~900 кДа.

35 Фигура 4: Уменьшение размера ViPs с помощью гомогенизатора приблизительно за 45 пропусков. На колонке для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии с помощью рефрактометрического детектора анализировали профиль Vi-полисахарида уменьшенного размера. Пик на 16,04 минутах представляет собой Vi-полисахарид уменьшенного размера, молекулярный вес которого составляет ~200 кДа.

40 Фигура 5: Уменьшение размера ViPs с применением микроволновой печи. На колонке для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии с помощью рефрактометрического детектора анализировали профиль Vi-полисахарида уменьшенного размера. Пик на 15,18 минутах представляет собой Vi-полисахарид уменьшенного размера, молекулярный вес которого составляет ~250 кДа.

45 Фигура 6: ВЭЖХ (рефрактометрический детектор) массы ViPs-ТТ конъюгата. ВЭЖХ профиль конъюгата «Vi-полисахарид-столбнячный токсин» регистрировали с помощью рефрактометрического детектора с помощью колонки для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии. Пик на 12,83 минутах представляет собой конъюгат

ViPs-ТТ без линкерной молекулы.

Фигура 7: ВЭЖХ (УФ) массы ViPs-ТТ. ВЭЖХ профиль конъюгата «Vi-полисахарид-столбнячный токсин» регистрировали с помощью УФ детектора с помощью колонки для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии. Пик на 12,66 минутах

представляет собой конъюгат ViPs-ТТ без линкерной молекулы.

Фигура 8: ВЭЖХ (рефрактометрический детектор) массы ViPs-ТТ конъюгата без линкера. ВЭЖХ профиль вакцины, содержащей конъюгат «Vi-полисахарид-столбнячный токсин», регистрировали с помощью рефрактометрического детектора с помощью колонки для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии. Пик на 12,98

минутах представляет собой ViPs-ТТ конъюгат без линкера.

Фигура 9: ВЭЖХ (УФ) массы ViPs-ТТ конъюгата без линкера. ВЭЖХ профиль вакцины, содержащей конъюгат «Vi-полисахарид-столбнячный токсин» регистрировали с помощью УФ детектора с помощью колонки для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии. Пик на 12,662 минутах представляет собой ViPs-ТТ

конъюгат без линкера.

Фигура 10: ВЭЖХ (рефрактометрический детектор) ViPs-ТТ конъюгированной вакцины. ВЭЖХ профиль вакцины, содержащей конъюгат «Vi-полисахарид-столбнячный токсин», регистрировали с помощью рефрактометрического детектора с помощью колонки для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии. Пик на 12,82

минутах представляет собой ViPs-ТТ конъюгат.

Фигура 11: ВЭЖХ (УФ) ViPs-ТТ конъюгированной вакцины. ВЭЖХ профиль вакцины, содержащей конъюгат «Vi-полисахарид-столбнячный токсин», регистрировали с помощью УФ-детектора с помощью колонки для высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии. Пик на 12,72 минутах представляет собой ViPs-ТТ

конъюгат.

Фигура 12: Сравнение среднего геометрического титров в различных возрастных группах после однократной инъекции одной 25 мкг дозы вакцины, содержащей ViPs-ТТ конъюгат.

Фигура 13: Сравнение % сероконверсии в различных возрастных группах после однократной инъекции одной 25 мкг дозы вакцины, содержащей ViPs-ТТ конъюгат.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Salmonella typhi выращивают в подходящей среде, и клетки в фазе активного роста переносят в ферментер, содержащий предварительно стерилизованную среду. Сначала проводят процесс периодической ферментации, а когда культуры достигают ранней стационарной фазы, питательная среда, содержащая высокую концентрацию источников углерода, непрерывно подают в ферментер. Процесс периодического культивирования с подпиткой проводят до достижения желаемой оптической плотности. Культуры собирают с помощью инактивации формалином в низкой концентрации и далее центрифугируют для получения клеточного супернатанта. Гексадецилтриметиламмония бромид (Cetavlon) добавляют к клеточному супернатанту для отделения неочищенного Vi-полисахарида от компонентов клетки-хозяина посредством преципитации. Последующие этапы очистки, т.е. преципитации этанолом, концентрирование и диафильтрация с применением мембран, отсекающих молекулы с различным молекулярным весом, и способы стерильной фильтрации, проводили для отделения очищенного Vi-полисахарида от примесей клетки-хозяина, таких как нуклеиновые кислоты, белки и липополисахариды.

Факторы, влияющие на связывание полисахаридов и белков, зависят от молекулярного веса и активации функциональных групп. Низкий молекулярный вес

полисахаридов может способствовать эффективному связыванию. Различные белки, такие как столбнячный токсин, белок дифтерийного токсина CRM 197, В-субъединица термолabile токсина (В subunit heat-labile toxin (LT-B)) *Escherichia coli*, рекомбинантный экзобелок А (rЕРА) *Pseudomonas aeruginosa* и гемоцианин мечехвоста (Horseshoe crab Haemocyanin (НСН)), чаще всего применяли для конъюгации. Определение молекулярных размеров полисахаридов и полисахарид-белковых конъюгатов бактериальных полисахаридов является важным аспектом создания конъюгированных вакцин. Оценка физико-химических характеристик полисахарид-белкового конъюгата играет важную роль в индукции специфического иммунного ответа. Определение молекулярного размера полисахарида до и после обеспечивает эффективную конъюгацию. Двумя важными критериями критического контроля качества, применяемыми после конъюгации и очистки, являются «отношение полисахарида к белку» и «процент неконъюгированного полисахарида (свободного полисахарида.

Podda et al (2010) сообщили об эпидемиологии заболевания и важности вакцинации детей младше двух лет. Доступные в настоящее время вакцины имеют ряд существенных недостатков, по причине которых не могут применяться у детей младше 2 лет, то есть в возрастной группе, в значительной мере подверженной брюшному тифу. Ожидают, что внедрение конъюгированных вакцин станет эффективным средством эффективной иммунизации всех возрастных групп, хотя в настоящее время нет доступных экспериментальных данных о возможности вакцинации брюшнотифозной конъюгированной вакциной детей младше 2 лет. Настоящее изобретение основано на уникальной методологии конъюгации вакцины, содержащей ViPs-ТТ конъюгат, обладающей преимуществом, дающим возможность вакцинировать детей или младенцев младше двух лет для защиты от заражения *Salmonella typhi*, вызывающих брюшной тиф в этой уязвимой возрастной группе, что надлежащим образом подтверждают экспериментальные данные клинического исследования, а также позволяет уменьшить количество инъекций для проведения полного курса вакцинации до всего одной дозы брюшнотифозной конъюгированной вакцины у детей младше 2 лет.

Пример 1: Культивирование и обработка Vi-полисахарида *S.typhi*

Штамм *Salmonella typhi* (Ty2) получили от Dr. John Robbins, Национальный институт Здоровья Ребенка и Развития Человека (National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD)), США. Культуру, полученную из NICHD (США), верифицировали и идентифицировали как *Salmonella* серовара *typhi* посредством определения следующих характеристик: окрашивание по Граму, ферментация глюкозы без образования газа, образование H₂S на ксилозо-лизиновом дезоксихолатном агаре (КЛД-агар) и положительная серология с Vi-полисахаридом. Чистоту штамма подтверждали на разных селективных средах, таких как висмут-сульфитный агар, тройной сахаро-железный агар. Чистоту штамма подтверждали на разных селективных средах, таких как ксилозо-лизиновый дезоксихолатный агар (КЛД-агар), висмут-сульфитный агар, тройной сахаро-железный агар.

Salmonella typhi Ty2 выращивали на соево-казеиновой питательной среде (Soyabean Casein Digest (SCDM)) при 37±1°C, в течение 12 часов. Бактериальную культуру центрифугировали и осадок ресуспендировали в стерильном глицерине (50%). Получали аликвоты по 0,5 мл глицериновой суспензии в криопробирках объемом 1 мл и хранили при -70°C. Также проводили подсчет живых клеток в производственном штамме. Содержимое криопробирки с производственным штаммом инокулировали в соево-казеиновую питательную среду (SCDM) и инкубировали при 37±1°C в течение 12 часов. Бактериальную культуру центрифугировали и осадок ресуспендировали в стерильном

глицерине (50%). Осуществляли подсчет живых клеток. Получали аликвоты глицериновой суспензии в криопробирках и хранили при -70°C . Производственный и рабочий банки клеток характеризовали с помощью окрашивания по Граму, по ферментации глюкозы (способ Дарема), с помощью оксидазного теста, теста на агглютинацию и подсчета живых клеток. Клетки высевали на триптон-соевый агар (ТСА) и инкубировали при 37°C от 48 до 72 часов. Подсчет колоний проводили с помощью счетчика колоний.

1.1. Процесс ферментации:

Развитие инокулята: Содержимое одной криопробирки с рабочей культурой извлекали из морозильного шкафа и размораживали при комнатной температуре на водяной бане. Содержимое одной криопробирки из рабочего банка клеток *Salmonella typhi* инокулировали в 10 мл соево-казеиновой питательной среды (SCDM) и культивировали при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов (стадия I), переносили в два флакона, содержащих по 50 мл SCDM каждый, при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ на 12 часов (стадия II) и в конце переносили в четыре флакона, содержащих по 400 мл SCDM, и инкубировали при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов (стадия III). На каждой стадии пересева культуры чистоту и морфологические характеристики проверяли с помощью окрашивания по Граму. Оптическую плотность измеряли при 600 нм. Оптическая плотность культуры *Salmonella typhi* на различных стадиях роста культуры варьировала от 1,2 до 3,8.

Ферментация в периодическом режиме:

Таблица 1.1 Параметры ферментации и установленные пределы	
Параметры	Интервалы
рН	$6,9\pm 0,2$
Растворенный кислород	70-90%
Скорость перемешивания	250 ± 10 оборотов в минуту
Температура	$37\pm 2^{\circ}\text{C}$
Подача воздуха	$0,5\pm 0,1$ (объем на объем в минуту)

Исходно готовили 85 л SCDM в 100 л сосуде из нержавеющей стали и переносили в ферментер. Среду стерилизовали *in situ* при 121°C в течение 15 минут. Среду остужали до 37°C . На этой стадии дополнительную смесь закачивали в ферментер через порт для добавления. Для поддержания рН к порту для добавления присоединяли бутылку с 50% раствором аммиака в качестве источника азота. Исходный инокулят переносили в ферментер и проводили процесс ферментации при рН $6,9\pm 0,2$, температуре $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ и содержании растворенного кислорода на уровне 70-90% в течение периода времени от 22 до 24 часов. Рост контролировали, измеряя оптическую плотность при 600 нм исходно в час 0 и далее каждые 2 часа до 24 часов.

Периодическая ферментация с подпиткой: Процесс периодической ферментации с подпиткой *S.typhi* обеспечивал повышенную продукцию Vi-полисахарида. Культуры на стадии III с оптической плотностью OD_{600} равной 3,8 идеально подходили для культивирования. Показатель рН поддерживали на уровне 6,90, а содержание растворенного кислорода было в пределах от 40% до 60%. В ферментер к культуре в ранней стационарной фазе постепенно на протяжении всего процесса ферментации подавали питательную среду, содержащую источник углерода, а также неорганические соли и минералы. В данной заявке процесс периодического культивирования с подпиткой адаптировали с целью увеличения биомассы путем добавления питательного раствора, содержащего глюкозу в диапазоне концентраций от 1 до 2 мг/мл. Значения рН поддерживали в интервале от 6,90 до 7,20, а содержание растворенного кислорода

поддерживали в пределах 40%–60%. Раствор аммиака (50%) добавляли с питательной средой в качестве источника азота. Пенообразование контролировали посредством подачи в асептических условиях антипенного раствора в порт для добавления. Оптимальный уровень pH 7,2 поддерживали с помощью 10% NH₄OH, а концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 35% насыщения воздуха. Уровень глюкозы контролировали каждые 30 минут и на протяжении всего процесса периодического культивирования с подпиткой концентрацию глюкозы поддерживали на уровне около 1 г/л.

Процесс проводили на протяжении 24 часов, после чего бактериальную культуру инактивировали 0,5% формальдегидом и держали в охлажденном виде (ниже 15°C), осторожно помешивая. Рост проверяли, измеряя оптическую плотность при 600 нм в час 0 и далее каждые 2 часа до 24 часов. Эта стратегия культивирования обеспечила увеличение биомассы до уровня от 120 до 130 в единицах оптической плотности. Увеличение биомассы привело к увеличению образования Vi-полисахарида, которое в периодически подпитываемой культуре достигло конечного выхода Vi-полисахарида равного примерно 1000 мг на литр в рамках настоящего процесса, из которых после завершения последующей обработки получали 400 мг на литр очищенного ViPs. Таким образом, в результате процесса периодического культивирования с подпиткой конечный выход составил по меньшей мере 40%.

1.2. Дальнейшая обработка массы очищенного Vi-полисахарида (ViPs):

Супернатант культивированных клеток проводили через различные стадии очистки с целью выделения очищенного Vi-полисахарида. Vi-полисахарид состоит из частично 3-О-ацетилированных повторяющихся единиц 2-ацетиламино-2-дезоксид-галактопиранурановой кислоты с α-(1→4) связями. Таким образом, определение содержания О-ацетила может коррелировать с количеством Vi-полисахарида. Конечная фракция очищенного Vi-полисахарида должна содержать 2 мМ О-ацетила на грамм Vi-полисахарида (серия технических докладов ВОЗ (WHO TRS) 840). В норме супернатант содержит большое количество белков, нуклеиновых кислот и липополисахаридов. Техники фильтрации играют важную роль в дальнейшем процессе очистки бактериальных полисахаридов от примесей из клетки-хозяина. Удерживание целевой молекулы из раствора веществ происходит на основании размера, частицы с большим размером удерживаются на поверхности мембраны, в то время как частицы массой меньше номинального предела веса для данной мембраны выходят с фильтратом (Jagannathan et al., 2008). Мембранные кассеты, отсекающие 100 кДа, применяли на начальной стадии концентрирования супернатанта, а мембранные кассеты, отсекающие 300 кДа, - на конечной стадии концентрирования и проводили диафильтрацию с помощью стерильной воды для инъекций.

Отделение клеток: собранную культуру центрифугировали в роторной центрифуге при 9000 оборотах в минуту (8000 g) в течение 30 минут при 4°C. Супернатант собирали в стерильные сосуды. Образец супернатанта отбирали для анализа содержания О-ацетила.

Концентрирование и диафильтрация: супернатант подвергали диафильтрации с помощью системы тангенциальной проточной фильтрации, применяя 100 кДа мембрану. Супернатант концентрировали до 1/10^й исходного объема и далее диафильтровали с применением воды для инъекций до достижения необходимой концентрации. Анализировали содержание О-ацетила в концентрате.

Преципитация цетримидом: к концентрату добавляли 0,4 М цетримидом и инкубировали при (5°±1°C) в течение 3±1 часов. Содержимое центрифугировали при 9000 оборотах

в минуту в течение 30 минут при 4°C. Осадок собирали и суспендировали в необходимом объеме 1 М NaCl. Определяли содержание О-ацетила в суспензии осадка.

Преципитация этанолом: Один объем этанола и 2% ацетата натрия добавляли к ресуспендированному цетримидному преципитату, содержимое перемешивали в течение 20±5 минут с помощью магнитной мешалки. Содержимое центрифугировали при 4200 оборотах в минуту (8000 g) в течение 30 минут при 4°C. Супернатант собирали в стерильную бутылку, а осадок удаляли. К супернатанту добавляли два объема этанола (100%) при постоянном помешивании в течение 60±10 минут. К описанному выше содержимому добавляли 2% ацетат натрия при постоянном помешивании. После 1 часа инкубации содержимое центрифугировали при 4200 оборотах в минуту (8000 g) в течение 30 минут при 4°C. Супернатант удаляли; осадок суспендировали в стерильной охлажденной воде для инъекций и переносили в стерильную бутылку. Определяли содержание О-ацетила в образце. Фильтрация: концентрированную массу Vi-полисахарида пропускали через 0,22 мкм капсульный фильтр (Sartopore, Sartorius). В этой стерильной фильтрованной очищенной массе Vi-полисахарида определяли содержание О-ацетила. Полученную таким образом массу Vi-полисахарида повторно экстрагировали цетримидом и преципитировали этанолом. В конце массу концентрировали и подвергали диафильтрации с применением 300 кДа кассеты (и называли концентрированной массой), как упоминали ранее. Содержание О-ацетила определяли после каждого этапа. Определяли содержание О-ацетила на различных стадиях последующей обработки, как показано в Таблице 1.2 ниже. Содержание О-ацетила определяли по способу Хестрина (Hestrin), описанному ниже.

Анализ содержания О-ацетила: Определение содержания О-ацетила выполняли по способу Хестрина (Hestrin, 1949). Количество О-ацетила в образце было пропорционально количеству Vi-содержимого, выраженному в мг/мл. К исследуемым образцам добавляли 0,5 мл 3,6 N HCl и 1 мл раствора щелочного гидроксиламина и тщательно перемешивали. Смесь держали при комнатной температуре в течение 2 минут, затем добавляли 0,5 мл раствора хлорида железа и тщательно перемешивали. Поглощение измеряли при 540 нм. Содержание О-ацетила рассчитывали следующим образом:

$$\text{О-ацетил (мкмоль/мл)} = \frac{\text{OD образца} \times \text{концентрация стандарта} \times \text{коэффициент разбавления}}{\text{OD стандарта}}$$

Коэффициент перевода для О-ацетила в Vi-содержимое = О-ацетил (мкмоль/мл) × 0,294 (25/0,085/1000) = Vi-содержимое (мг/мл)

Конечную стерильную фильтрованную (0,22 мкм) Vi-полисахаридную массу лиофилизировали в низкотемпературной вакуумной сушильной установке (лиофилизатор – FTS system). Лиофилизированный порошок исследовали на предмет серологической идентификации по методу Оухтерлони, влажности, содержания белка, содержания нуклеиновых кислот, распределения по размеру молекул и содержания бактериального эндотоксина. В настоящем исследовании очищенный Vi-полисахарида соответствующую гомологичную антисыворотку добавляли в лунки до исчезновения мениска. Пластины с гелем инкубировали во влажной камере. Линии преципитации наблюдали невооруженным глазом на ярком светлом фоне. На фотографии, представленной на Фигуре 2, видна четкая дуга преципитации.

Распределение по размеру молекул Vi-полисахарида проводили с помощью гель-фильтрационной колонки с Сефарозой CL-4В в качестве неподвижной фазы. Фракции,

соответствующие 0,25 кДа, собирали после выхода свободного объема колонки (Vo) и объединяли вместе. 75% полисахарида элюировали при 0,25 кДа. Распределение по размеру молекул Vi-полисахарида *S.typhi* представлено в Таблице 4.5 ниже.

Характеристика Vi показала, что он содержит 1% нуклеиновых кислот, 0,3% белков, а уровень О-ацетилирования составляет 86% по данным протонного ЯМР.

Результаты исследований, полученные для одной партии высушенной массы ViPs, приведены в Таблице 1.2 ниже:

Таблица 1.2 Результаты исследований массы высушенного Vi-полисахарида	
Исследования	Результаты
Серологическая идентификация (по Оухтерлони)	Наблюдали четкую дугу преципитации
Влажность	1,80%
Белок	2,5 мг/г Vi-полисахаридного порошка
Нуклеиновые кислоты	5 мг/г Vi-полисахаридного порошка
Содержание О-ацетила (по Hestrin)	2,1 ммоль/г Vi-полисахаридного порошка
Распределение по размеру молекул	75% полисахарида элюировали при 0,25 кДа
Эндотоксины	Менее 150 ед. ELISA/мкг Vi-полисахаридного порошка

Результаты, представленные выше, соответствовали всем требованиям Серии технических докладов ВОЗ 840 (WHO TRS 840) и стандартам фармакопеи Великобритании (2010) и Фармакопеи Индии (2010). Требования Серии технических докладов ВОЗ 840 (WHO TRS 840) (1994) в настоящем исследовании приняты в качестве стандартных технических условий. В соответствии со стандартными требованиями ВОЗ содержание белков равно 10 мг/г, нуклеиновых кислот - 20 мг/г, содержание О-ацетила составляет не менее 2 ммоль/г Vi-полисахарида, в соответствии с размером молекул 50% полисахарида должны элюироваться раньше 0,25 кДа, идентификация по способу иммунопреципитации и тест на стерильность пройдены. В соответствии с Фармакопеей Великобритании и Европейской Фармакопеей (2007), технические требования к высушенному Vi-полисахариду следующие: содержание белка равно 10 мг/г, нуклеиновых кислот - 10 мг/г, О-ацетильных групп - 2 ммоль/г, не менее 50 процентов полисахарида должны находиться в пуле, содержащем фракции, элюированные до 0,25 кДа, идентификация по способу иммунопреципитации и тест на содержание бактериального эндотоксина. Эти технические требования схожи с требованиями Серии технических докладов ВОЗ 840 (WHO TRS 840), Фармакопеи Великобритании (2010) и Фармакопеи Индии (2010).

Пример 2: МЕТОДОЛОГИЯ КОНЬЮГАЦИИ

Эффективные способы конъюгации очищенного Vi-полисахарида с белком-носителем, выбранным из любых бактериальных белков или вирусных белков, таких как дифтерийный токсин, столбнячный токсин, токсин *Pseudomonas aeruginosa*, коклюшный токсин, токсин *Clostridium perfringens*, экзобелок А *Pseudomonas*, CRM197, раскрыты в настоящем изобретении. Предпочтительно, чтобы в данном изобретении очищенный Vi-полисахарид конъюгировали со столбнячным токсином. Высокий выход в реакции конъюгации достигают, применяя различные альтернативные методологии конъюгации. Можно уменьшить размер очищенного Vi-полисахарида перед конъюгацией. В настоящем изобретении эффективность конъюгации с применением как ViPs с большим молекулярным размером (неуменьшенный размер), так и с малым молекулярным размером (уменьшенный размер), сохранялась в обеих методологиях для достижения высокого выхода очищенного ViPs-ТТ конъюгата. Для конъюгации ViPs с большим молекулярным размером со столбнячным токсином концентрация ViPs (неуменьшенного размера) в конечной реакционной смеси должна находиться в пределах от 1 мг/мл до

10 мг/мл для достижения желаемого выхода конъюгата ViPs-ТТ вплоть до 70%-80%, в то время как для конъюгации Vi-полисахарида с малым молекулярным размером со столбнячным токсином концентрация Vi-полисахарида (уменьшенного размера) в конечной реакционной смеси должна находиться в пределах от 5 мг/мл до 10 мг/мл для достижения желаемого выхода конъюгата ViPs-ТТ вплоть до 70%-80%. Альтернативные способы уменьшения размера очищенного ViPs раскрыты в следующих разделах.

Новизна настоящего изобретения состоит в модификации Vi-полисахарида и его активации в присутствии линкера или без молекулы линкера в присутствии сшивающих агентов. В соответствии с настоящим изобретением не требуется активация конъюгированных белков. Конъюгация активированных полисахаридов с белками-носителями происходит в присутствии сшивающих агентов, таких как EDAC. WO2009/150543 обучает получению производных белков для конъюгации, где Vi-полисахарид выделяли из *C. freundii* и далее конъюгировали с CRM197 и/или столбнячным токсином в качестве белков-носителей. В этом исследовании Vi и EDAC смешивали в соответствующем молярном отношении (EDAC/Vi) равном 0,9-1,4, или, альтернативно, CRM197 и/или ТТ преобразовывали, обрабатывая АДН и EDAC. Vi конъюгировали с CRM197 и ТТ по отдельности и конъюгированную смесь очищали с использованием Sephacryl S-1000; фракции анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и отбирали те, которые не содержали свободный белок (Micoli et al., 2011). Однако, в соответствии с WO2009/150543 избыток линкера удаляли с помощью диализа, в то время как в настоящем изобретении, при желании, проводили уменьшение размера Vi-полисахарида (гомогенизацией или микроволновым способом, а затем проводили конъюгацию, при желании, при связывании линкерной молекулы или без какой-либо линкерной молекулы. Следовательно, в отсутствие линкерной молекулы не требовалась дополнительная стадия удаления избытка линкерной молекулы. Дополнительно в процессе, включающем конъюгацию с линкерной молекулой, избыток линкера удаляли посредством высаливания и диафильтрации, а не диализом, как описано в WO2009/150543.

2.1. Уменьшение размера ViPs с использованием гомогенизации под высоким давлением:

ViPs представляет собой большую молекулу весом около 1000 кДа. Поэтому желательно уменьшить размер молекулы до приблизительно одной четвертой размера большой молекулы с целью облегчения реакции конъюгации с белками-носителями, в том числе со столбнячным токсином, при низких концентрациях. Таким образом, ViPs в концентрации 5-7,5 мг/мл подвергали гомогенизации под высоким давлением 1500 бар при 2-8°C и воздействие повторяли на протяжении по меньшей мере 45 пропусков. Размер молекул уменьшенных ViPs затем проверяли с помощью эксклюзионной хроматографии/гель-фильтрации, как показано на соответствующих Фигурах. Время удерживания ViPs до проведения эксклюзионной хроматографии составляло 13,185 минут (Фигура 3), в то время как, после проведения эксклюзионной хроматографии элюция ViPs происходила на 16,04 минутах (Фигура 4), что означает, что размер ViPs уменьшился до соответствующей молекулярной массы равной приблизительно 200 кДа. Содержание О-ацетила в уменьшенном ViPs остается прежним после процедуры гомогенизации, что подтверждают по способу Хестрина. После этого ViPs уменьшенного размера проводят через последующие стадии конъюгации, как обсуждают в следующих разделах.

2.2. Уменьшение размера ViPs с помощью микроволновой печи:

В другом способе уменьшения размера ViPs перед конъюгацией применяли микроволновую печь. ViPs в концентрации 5-7,5 мг/мл в стеклянной бутылке помещали

в микроволновую печь при 50%-100% мощности на 5-10 минут. Микроволны, генерируемые внутри печи, вызывают расщепление гликозильных связей в длинных цепях Vi-полисахарида, уменьшая их до более коротких молекул, необходимых для конъюгации с белком-носителем. Размер молекул уменьшенных ViPs затем проверяли с помощью эксклюзионной хроматографии/гель-фильтрации, как показано на соответствующих фигурах. Время удерживания ViPs до проведения эксклюзионной хроматографии составляло 13,185 минут (Фигура 3), в то время как, после проведения эксклюзионной хроматографии элюция ViPs происходила на 15,18 минутах (Фигура 5), что означает, что размер ViPs уменьшился до соответствующей молекулярной массы равной приблизительно 250 кДа. Содержание О-ацетила в уменьшенном ViPs остается прежним после обработки в микроволновой печи, что подтверждают по способу Хестрина. После этого ViPs уменьшенного размера проводят через последующие стадии конъюгации, как обсуждают в следующих разделах.

2.3. Конъюгация Vi-полисахарида со столбнячным токсином в присутствии линкера

Очищенные Vi-полисахариды (уменьшенного размера или неуменьшенного размера) подвергали частичному О-деацетилированию в присутствии бикарбоната натрия, и связывали с АДН с помощью EDAC-опосредованной реакции при рН в пределах 6,0-7,5. Реакцию проводили при 2-8°C и мягком перемешивании. После инкубации реакцию останавливали, доводя рН до 8,0 с помощью фосфатного буфера-ЭДТА буфера, и далее диализовали с помощью мембран, отсекающих низкомолекулярные соединения, сначала в фосфатном буфере, а затем в буфере MES. Получившуюся в результате смесь концентрировали и проверяли на предмет содержания О-ацетила, отношения ViPs-АДН, свободного АДН.

Столбнячный токсин концентрировали и диафильтровали в буфере MES с помощью мембран, отсекающих низкомолекулярные соединения. Конечный концентрированный столбнячный токсин исследовали на предмет содержания белка. Для конъюгации модифицированные Vi-полисахариды и белки связывают при конденсации карбодимидом с применением EDAC. Образующиеся связанные молекулы концентрируют и диафильтруют с помощью мембраны, отсекающей 1000 кДа, предпочтительно, полиэфирсульфоновой мембраны, с последующей постоянной сменой буфера с применением 20 диаобъемов фосфатно-солевого буфера. В диализате, содержащем очищенный ViPs-ТТ, оценивают отношение полисахарид-белок, которое должно находиться в пределах от 0,5% до 1,5%, содержание Vi, содержание белка и распределение молекул по размеру. Конечную массу конъюгата стерильно фильтровали с помощью 0,22 мкм мембраны и хранили при 2-8°C.

При желании, образованные связанные молекулы концентрируют и диафильтруют с помощью мембраны, отсекающей 1000 кДа, предпочтительно, полиэфирсульфоновой мембраны, с помощью фосфатно-солевого буфера, а затем наносят на гель-фильтрационную колонку (шарики из перекрестно сшитой Сефарозы). Собранные фракции с соотношением от 0,5% до 1,5% соединяли вместе, концентрировали и исследовали на предмет соотношения полисахарид-белок, содержания Vi, содержания белка и распределение молекул по размеру. Конечную массу конъюгата стерильно фильтровали с помощью 0,22 мкм мембраны и хранили при 2-8°C.

Распределение по размеру молекул массы конъюгированного Vi-полисахарида настоящего изобретения представлено в Таблице 2.1. Молекулярный размер ViPs-ТТ конъюгата, полученного в настоящем исследовании, составляет 0,3 кДа; при сравнении с результатами, полученными в рамках более ранних исследований ViPs-ТТ конъюгата, распределение по размеру молекул заданного конъюгата <0,1 кДа. Это означает, что

распределение по размеру молекул 0,3 кДа, указывает на оптимальный фильтруемый размер, позволяющий осуществлять надлежащую фильтрацию ViPs-ТТ, и в тоже время обеспечивающий лучшую иммуногенность конъюгированной вакцины по сравнению с другими распределениями по размеру молекул меньшего размера, представленных в известном уровне техники. Большой молекулярный размер означает лучшую иммуногенность, хотя при этом важно также ограничивать размер молекулы на соответствующем уровне, чтобы обеспечить фильтрацию ViPs-ТТ. Таким образом, благодаря такому распределению по размеру молекул 0,3 кДа всего ОДНОЙ инъекции конъюгированной брюшнотифозной вакцины, как изложено в настоящем изобретении, достаточно для проведения полного курса вакцинации против брюшного тифа, вызываемого *Salmonella typhi*. Известный уровень техники предписывает проводить несколько инъекций, предпочтительно, трех доз, в случае с более низким распределением по размеру молекул конъюгированной вакцины против брюшного тифа.

Определение общего и свободного (несвязанного) Vi-полисахарида проводили с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсной амперометрической детекцией (HРАЕС-РАD, High-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection). В настоящей методологии выход Vi-конъюгата составлял 75% конъюгата Vi-полисахарида, элюированного при 0,30 кДа, обеспечивая таким образом лучшую полидисперсность и содержание Vi равное 0,56 мг/мл, свободного ViPs - 5%, содержание белка - 0,25 мг/мл, отношение Vi-полисахарид-белок - 1,05, пик, соответствующий свободному белку, не определялся, и стерильность считали приемлемой (см. Таблицу 2.1). Настоящую методологию применяли при размере исходной партии ViPs равном 10 грамм, из которого получили 8 литров массы конъюгированного ViPs с концентрацией Vi конъюгата равной 0,9 мг/мл – 1,0 мг/мл, что соответствует 7-8 граммам конъюгата ViPs-ТТ и, таким образом, выходу в 70%-80%.

Таблица 2.1 Результаты исследований массы конъюгированного ViPs-ТТ с линкером	
Исследования	Результаты (в интервалах)
Распределение молекул по размеру	75,7% полисахарида элюировали при 0,3 кДа
Содержание Vi-конъюгата	0,9 мг/мл – 1,0 мг/мл
Свободный ViPs	3% - 6%.
Содержание белка	0,78 мг/мл – 0,9 мг/мл
Отношение ViPs/белок	1,1
Свободный белок	Не детектировался пик на 17 ^{ой} -18 ^{ой} минутах на ВЭЖХ УФ (280 нм) хроматограмме. Свободный белок отсутствует
Стерильность	Рост микроорганизмов не наблюдали

На фигурах с 6 по 7 представлены ВЭЖХ хроматограммы Vi-полисахарида и массы конъюгата ViPs-ТТ на различных стадиях с линкером. Все представленные ВЭЖХ профили четко демонстрируют эффективность конъюгации по настоящей методологии.

Методологию конъюгации в присутствии линкерной молекулы АДН с целью получения очищенного вакцинального антигена конъюгата ViPs-ТТ для получения состава конъюгированной вакцины против брюшного тифа, вызываемого *Salmonella typhi*, описанную выше, можно кратко изложить с помощью следующих стадий:

а. периодическое культивирование с подпиткой для получения очищенного ViPs в питательной среде, при этом указанная питательная среда содержит питательный раствор, содержащий глюкозу в концентрации от 1 до 2 мг/мл, с рН в интервале от 6,90 до 7,20, и с растворенным кислородом, уровень которого поддерживают между 40% и 60%, где раствор аммиака (50%) поставляли в качестве источника азота вместе с

питательной средой;

b. необязательное уменьшение размера ViPs, при котором ViPs в концентрации 5-7,5 мг/мл подвергают гомогенизации под высоким давлением 1500 бар при 2-8°C и повторяют такое воздействие на протяжении по меньшей мере 45 пропусканий, или помещают в микроволновую печь так, чтобы в результате получить очищенный ViPs с соответствующим молекулярным размером приблизительно равным 250 кДа;

c. обработка очищенного ViPs со стадии (a) или стадии (b) сшивающим агентом EDAC;

d. активация ViPs со стадии (c) линкерной молекулой ADH в присутствии EDAC;

e. обработка активированного ViPs, связанного с линкерной молекулой ADH, со стадии (d) при концентрации от 1 мг/мл до 5 мг/мл очищенного ViPs ~900 кДа или при концентрации от 5 мг/мл до 7,5 мг/мл очищенного ViPs ~250 кДа белком-носителем в присутствии EDAC для образования конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель»;

f. диафильтрация конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» со стадии (f) с непрерывной сменой буфера с помощью фосфатно-солевого буфера, с применением 1000 кДа мембраны для получения очищенного вакцинального антигена «ViPs-белок-носитель».

2.4. Конъюгация Vi-полисахарида со столбнячным токсином без линкера:

Очищенные Vi-полисахариды (уменьшенного размера или неуменьшенного размера) помещали в MES-буфер (2-морфолиноэтансульфоновую кислоту) или в фосфатно-солевой буфер, или в физиологический раствор при pH в пределах от 5,0 до 9,0 (точное значение pH 6-7,5), при этом концентрация полисахарида составляла в пределах от 1,0 мг до 20 мг/мл (5 мг/мл). Белок помещали в такой буфер, как MES, или в фосфатно-солевой буфер, или в физиологический раствор при pH в пределах от 6,0 до 9,0 (точное значение pH 6-7,5) при различных концентрациях от 2,0 мг/мл до 20 мг/мл (10 мг/мл). Отношение ViPs к белку должно находиться в пределах от 1:1 до 1:3, что означает, что для конъюгации на общее количество ViPs равное 1 г необходимо взять эквивалент белка от 1 г до 3 г белка. Конъюгацию проводили при 2°C-8°C, что позволяло обеспечить лучший контроль за скоростью реакции по сравнению с комнатной температурой. При более высоких температурах скорость реакции конъюгации слишком высокая. Нежелательно подвергать полисахариды действию более высоких температур, так как после образования конъюгатов при более высоких температурах существует вероятность агрегации конъюгированных полисахарид-белковых молекул. Это увеличит размер молекул, что осложнит дальнейшую очистку конъюгированных белков на последующих стадиях. Таким образом предпочтительно проводить конъюгацию при 2-8°C. ViPs и ТТ смешивали друг с другом в различных концентрациях и в любом из буферов, описанных выше, при различных значениях pH и инкубировали для проведения конъюгации. Время инкубации варьировало от 15 до 45 минут при комнатной температуре (25°C), и от 1 часа до 2 часов при 2-8°C, в то время как в соответствии с методологией конъюгации с использованием ADH (с линкером), время инкубации, необходимое для конъюгации, составляет минимум 2-4 часа при 2°C-8°C. Таким образом общее время реакции также сокращается при применении данного способа конъюгации без линкера по сравнению с конъюгацией с линкером.

Образовавшиеся в результате связанные молекулы концентрируют и диафильтруют с помощью мембраны, отсекающей 1000 кДа, предпочтительно, полиэфирсульфоновой мембраны, с последующей постоянной сменой буфера с применением 20 диаобъемов фосфатно-солевого буфера. В диализате, содержащем очищенный ViPs-ТТ, оценивают отношение полисахарид-белок, которое должно находиться в пределах от 0,5% до 1,5%,

содержание Vi, содержание белка и распределение молекул по размеру. Конечную массу конъюгата стерильно фильтровали с помощью 0,22 мкм мембраны и хранили при 2-8°.

При желании, образованные связанные молекулы концентрируют и диафильтруют с помощью мембраны, отсекающей 1000 кДа, предпочтительно, полиэфирсульфоновой мембраны, с помощью фосфатно-солевого буфера, а затем наносят на гель-фильтрационную колонку (шарики из перекрестно сшитой Сефарозы). Собранные фракции с соотношением от 0,5% до 1,5% объединяли вместе, концентрировали и исследовали на предмет соотношения полисахарид-белок, содержания Vi, содержания белка и распределение молекул по размеру. Конечную массу конъюгата стерильно фильтровали с помощью 0,22 мкм мембраны и хранили при 2-8°С.

Настоящую методологию конъюгации без какой-либо линкерной молекулы применяли при размере исходной партии ViPs равном 10 г, из которого получили 8 литров массы конъюгированного ViPs с концентрацией Vi конъюгата равной 0,9 мг/мл – 1,0 мг/мл, что соответствует 7-8 г конъюгата ViPs-ТТ и, таким образом, выходу в 70%-80%.

Таблица 2.2 Результаты исследований массы конъюгированного ViPs-ТТ без линкера	
Исследования	Результаты (в интервалах)
Распределение молекул по размеру	74,3% полисахарида элюировали при 0,3 кДа
Содержание Vi конъюгата	0,9 мг/мл – 1,0 мг/мл
Свободный Vi Ps	3%-6%.
Содержание белка	0,75 мг/мл – 0,8 мг/мл
Отношение Vi Ps/белок	1,2
Свободный белок	Не детектировался пик на 17 ^{ой} -18 ^{ой} минутах на ВЭЖХ УФ (280 нм) хроматограмме. Свободный белок отсутствует
Стерильность	Рост микроорганизмов не наблюдался

Полученный таким образом неочищенный конъюгат очищают с помощью гель-фильтрационной хроматографии, тангенциальной проточной фильтрации (ТФФ), ионообменной хроматографии или хроматографии гидрофобных взаимодействий (ННС). Конъюгат соответствует всем необходимым требованиям фармакопеи; далее конъюгат стерильно фильтруют. На Фигурах с 8 по 9 представлены ВЭЖХ хроматограммы Vi-полисахарида и массы ViPs-ТТ конъюгата на различных стадиях без линкера. Все представленные ВЭЖХ профили четко демонстрируют эффективность конъюгации в соответствии с настоящими методологиями.

Методологию конъюгации без какой-либо линкерной молекулы АДН с целью получения очищенного вакцинального антигена конъюгата ViPs-ТТ для получения состава конъюгированной вакцины против брюшного тифа, вызываемого *Salmonella typhi*, описанную выше, можно кратко изложить с помощью следующих стадий:

а. периодическое культивирование с подпиткой для получения очищенного ViPs в питательной среде, при этом указанная питательная среда содержит питательный раствор, содержащий глюкозу в концентрации от 1 до 2 мг/мл, с рН поддерживаемым в интервале от 6,90 до 7,20, и с растворенным кислородом, уровень которого поддерживают между 40% и 60%, где раствор аммиака (50%) поставляли в качестве источника азота вместе с питательной средой;

б. необязательное уменьшение размера ViPs, при котором ViPs в концентрации 5-7,5 мг/мл подвергают гомогенизации под высоким давлением 1500 бар при 2-8°С и повторяют такое воздействие на протяжении по меньшей мере 45 пропусканий, или помещают в микроволновую печь так, чтобы в результате получить очищенный ViPs

с соответствующим молекулярным размером приблизительно равным 250 кДа;

c. обработка очищенного ViPs со стадии (a) или стадии (b) сшивающим агентом EDAC;

5 d. обработка белка-носителя ViPs со стадии (c) при концентрации от 1 мг/мл до 5 мг/мл очищенного ViPs ~900 кДа или при концентрации от 5мг/мл до 7,5 мг/мл очищенного ViPs ~250 кДа в присутствии EDAC для образования конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель»;

10 e. диафильтрация конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» со стадии (d) с непрерывной сменой буфера с помощью фосфатно-солевого буфера, с применением 1000 кДа мембраны для получения очищенного вакцинального антигена «ViPs-белок-носитель».

Линкерная молекула, например ADH, имеет концевые аминогруппы на обоих концах. Нативный Vi-полисахарид, размер которого в дальнейшем уменьшают перед конъюгацией, от природы содержит избыток функциональных карбоксильных групп (-COOH). Белки-носители, например, столбнячный токсин, содержат как амино- (-NH₂), так и карбоксильные группы (-COOH). В случае конъюгации ViPs с белком-носителем с помощью линкерной молекулы ADH, конъюгацию проводят в присутствии сшивающих агентов, таких как EDAC, при этом -COOH группа ViPs должна связываться с -NH₂ группой линкера ADH на одном из его концов. Активированный ViPs связывает линкер ADH, присоединяясь через -CONH связь к одному концу молекулы ADH. Другой конец молекулы ADH остается свободным для последующего связывания с -COOH группой белка-носителя при соответствующих диапазонах концентраций и температуры. Активированный ViPs-ADH, таким образом, снова реагирует с белком-носителем в присутствии сшивающего агента EDAC, который позволяет -NH₂ группе на другом конце молекулы ADH связаться с -COOH группой на молекуле белка-носителя, таким образом формируя эффективный мостик между Vi-полисахаридами белком-носителем. Таким образом, в данном способе существует необходимость в удалении избытка линкеров после обработки Vi-полисахарида ADH, и еще раз после взаимодействия ViPs-ADH с белком-носителем. Более того, EDAC в данном способе необходимо применять дважды.

35 В то же время, в процессе применения методологии конъюгации ViPs с белками-носителями без какой-либо линкерной молекулы, благодаря наличию -COOH групп у Vi-полисахарида и свободных -NH₂ групп у белков-носителей, существует возможность прямого связывания -COOH групп ViPs с -NH₂ группами белков-носителей при обработке в присутствии сшивающих агентов, таких как EDAC. Вся реакция протекает в одну стадию, что минимизирует необходимость лишнего применения EDAC, а также сокращает время проведения конъюгации ViPs с белком-носителем. Так как все белки-носители содержат свободные -NH₂ группы и ViPs также содержат свободные -COOH, можно конъюгировать любой белок-носитель, например дифтерийный токсин, столбнячный токсин или CRM197 и т.п., с Vi-полисахаридом с помощью данного способа. Таким образом, нет необходимости в применении какой-либо линкерной молекулы (ADH) для конъюгации ViPs с белком-носителем. Преимущество конъюгации без линкера определяет и стабильность конъюгатов, поскольку отсутствуют какие-либо соединительные молекулярные мостики (ADH) между ViPs и белком-носителем. Это обеспечивает большую стабильность благодаря большей устойчивости молекулы конъюгата ViPs-белок-носитель (ViPs-ТТ в данном случае) в отсутствие каких-либо соединительных мостиков. Дальнейшая деградация ViPs-ТТ также значительно

снижается. Также в настоящем способе объективно просто организовывать и проводить эксперименты. Необходимое общее количество EDAC меньше приблизительно на 50%, и его вносят лишь один раз вместо двух, как в случае способа с применением линкера ADH (EDAC является раздражающим веществом, способным вызывать коагуляцию белков при длительном воздействии). Дополнительно, нет необходимости в геле-фильтрационной колонке или TFF системе для удаления избытка линкеров. За счет сокращения количества стадий можно минимизировать потери ViPs, необходимого для конъюгации с любым белком-носителем (например, с ТТ), так как стадии очистки, относящиеся к ViPs-ADH связыванию, отсутствуют. В следующей таблице приведен пример проведения всего эксперимента конъюгации с сокращенным числом стадий и общее время, представленное по сравнению со случаями присутствия и отсутствия линкерной молекулы.

Общее время, необходимое для проведения полного эксперимента по конъюгации:

Таблица 2.3 Сравнение времени, необходимого для проведения конъюгации.			
Эксперимент с линкером ADH		Эксперимент без линкера ADH	
Активность	Затраченное время	Активность	Затраченное время
Реакция ViPs с ADH	4 часа	Не требуется	Не применимо
Удаление свободного ADH	12-15 часов	Не требуется	Не применимо
Анализ % ADH, связанного с ViPs	2 часа	Не требуется	Не применимо
Реакция ViPs с ТТ	2-4 часа при 2°C-8°C	Реакция ViPs с ТТ	1-2 часа при 2°C-8°C
Очистка ViPs-ТТ конъюгата	10 часов	Очистка ViPs-ТТ конъюгата	10 часов
Анализ фракций ViPs-ТТ	10 часов	Анализ фракций ViPs-ТТ	10 часов
Объединение и стерильная фильтрация оп	3 часа	Объединение и стерильная фильтрация	3 часа
Конечный анализ конъюгата (ВЭЖХ, содержание Vi, содержание белка, отношение)	2 часа	Конечный анализ конъюгата (ВЭЖХ, содержание Vi, содержание белка, отношение)	2 часа
Общее затраченное время	45-50 часов	Общее затраченное время	25-27 часов

Пример 3: Состав вакцины и ее стабильность.

Типичная единичная доза состава брюшнотифозной конъюгированной вакцины, заявленная в настоящем изобретении, содержит в качестве антигена Vi-ТТ конъюгат в количестве от 15 микрограмм (мкг) до 25 мкг, растворенный в физиологическом растворе, доведенный до конечного объема 0,5 мл для одной инъекции для проведения полного курса вакцинации.

Состав вакцины, заявленный в настоящем изобретении, также доступен в форме многодозовых флаконов. Многодозовые флаконы могут содержать либо 5 доз (для 5 разных вакцинируемых/субъектов/предполагаемых реципиентов вакцины), либо 10 доз (для 10 разных вакцинируемых/субъектов/предполагаемых реципиентов вакцины). В случае многодозовых флаконов в состав вакцины добавляют консервант для предотвращения контаминации состава вакцины в процессе многократных отборов вакцины из флакона с целью вакцинации 5-10 разных детей из одного многодозового флакона вакцины. Многодозовые флаконы с составом брюшнотифозной конъюгированной ViPs-ТТ вакцины настоящего изобретения содержат уникальный консервант 2-феноксэтанол, который не содержит хлорид ртути и тиомерсал. В области техники, к которой относится настоящее изобретение, сообщают о недостатках применения стандартных консервантов, таких как хлорид ртути и тиомерсал, способствующих канцерогенности. Поэтому применение данного уникального консерванта 2-феноксэтанол позволяет преодолеть недостатки стандартных

консервантов хлорида ртути и тиомерсала. Подробная информация о многодозовых флаконах и их составе представлена в таблице ниже:

5

Компонент вакцины	Единичная доза	5-дозовый флакон	10-дозовый флакон
Vi-ТТ конъюгат	От 15 мкг до 25 мкг	От 75 мкг до 125 мкг	От 150 мкг до 250 мкг
Консервант 2-феноксиэтанол	Не требуется	25 мг (10% об./об.)	50 мг (10% об./об.)
Физиологический раствор	Достаточное количество	Достаточное количество	Достаточное количество
Объем дозы	0,5 мл	2,5 мл	5,0 мл

10
15

Стабильность ViPs-ТТ конъюгированной вакцины компании ВВЦ подробно исследовали и подтверждали на протяжении 3 лет. Стабильность ViPs конъюгированной брюшнотифозной ViPs-ТТ вакцины исследовали как в условиях ускоренного хранения (25°C±2°C) в течение 6 месяцев, так и в условиях реального времени хранения (от 2°C до 8°C) в течение 36 месяцев, и обнаружили, что полученные результаты исследования находятся в допустимых пределах и соответствуют необходимым техническим требованиям (Таблицы с 3.2 по 3.5).

20

Время	Описание	Идентификация (по Оухтерлони)	pH	Содержание О-ацетила (по Хестрину)	Содержание Vi (исследование)	Свободный ViPs	Тест на пирогены	Абдоминальная токсичность	Стерильность
25	Прозрачная, бесцветная жидкость без видимых частиц при визуальном осмотре	Должна наблюдаться четкая дуга преципитации	От 6,50 до 7,50	От 0,064 до 0,106 мкмоль/доза	20-30 мкг/доза	Не более 20%	Суммарный ответ у 3 кроликов не должен превышать 1,15°C	Все животные должны прожить 7 дней без уменьшения массы тела	Должна соответствовать тесту на стерильность
30	День 0	Соответствует	7,08	0,099	29,30	6,3	0,6	Соответствует	Соответствует
30	3 ^й месяц	Соответствует	7,09	0,098	28,91	6,2	0,5	Соответствует	Соответствует
30	6 ^й месяц	Соответствует	7,15	0,093	28,45	5,9	0,6	Соответствует	Соответствует
30	9 ^й месяц	Соответствует	7,13	0,094	28,31	6,3	0,6	Соответствует	Соответствует
30	12 ^й месяц	Соответствует	7,03	0,091	27,89	6,3	0,6	Соответствует	Соответствует
35	18 ^й месяц	Соответствует	7,06	0,087	27,45	6,1	0,5	Соответствует	Соответствует
35	24 ^й месяц	Соответствует	7,15	0,089	27,16	5,7	0,6	Соответствует	Соответствует
35	36 ^й месяц	Соответствует	7,02	0,080	26,56	6,0	0,5	Соответствует	Соответствует

40

Время	Описание	Идентификация (по Оухтерлони)	pH	Содержание О-ацетила (по Хестрину)	Содержание Vi (исследование)	Свободный ViPs	Тест на пирогены	Абдоминальная токсичность	Стерильность
45	Прозрачная, бесцветная жидкость без видимых частиц при визуальном осмотре	Должна наблюдаться четкая дуга преципитации	От 6,50 до 7,50	От 0,064 до 0,106 мкмоль/доза	20-30 мкг/доза	Не более 20%	Суммарный ответ у 3 кроликов не должен превышать 1,15°C	Все животные должны прожить 7 дней без уменьшения массы тела	Должна соответствовать тесту на стерильность
45	День 0	Соответствует	7,15	0,098	28,82	4,5	0,3	Соответствует	Соответствует

1 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,13	0,097	28,52	4,1	0,4	Соответствует	Соответствует
2 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,16	0,095	27,94	4,4	0,5	Соответствует	Соответствует
3 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,12	0,093	27,35	4,9	0,5	Соответствует	Соответствует
6 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,10	0,092	26,8	5,3	0,4	Соответствует	Соответствует

Таблица 3.4

Исследование стабильности Турбаг-TCV™ (конъюгированной без линкерной молекулы) при 2°C - 8°C (25 мкг в дозе Vi-ТТ объемом 0,5 мл)

Время	Описание	Идентификация (по Оухтерлони)	pH	Содержание О-ацетила (по Хестрину)	Содержание Vi (исследование)	Свободный ViPs	Тест на пирогены	Абдоминальная токсичность	Стерильность
	Прозрачная, бесцветная жидкость без видимых частиц при визуальном осмотре	Должна наблюдаться четкая дуга преципитации	От 6,50 до 7,50	От 0,064 до 0,106 мкмоль/доза	20-30 мкг/доза	NMT 20%	Суммарный ответ у 3 кроликов не должен превышать 1,15°C	Все животные должны прожить 7 дней без уменьшения массы тела	Должна соответствовать тесту на стерильность
День 0	Соответствует	Соответствует	7,03	0,101	29,60	6,0	0,5	Соответствует	Соответствует
3 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,05	0,095	27,93	6,3	0,7	Соответствует	Соответствует
6 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,15	0,093	27,34	5,8	0,5	Соответствует	Соответствует
9 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,10	0,094	27,63	6,0	0,5	Соответствует	Соответствует
12 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,00	0,092	27,04	6,3	0,6	Соответствует	Соответствует
18 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,02	0,086	25,28	6,2	0,6	Соответствует	Соответствует
24 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,11	0,087	25,57	6,5	0,7	Соответствует	Соответствует
36 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,04	0,086	25,28	6,7	0,5	Соответствует	Соответствует

Таблица 3.5

Исследование стабильности Турбаг-TCV™ (конъюгированной без линкерной молекулы) при 25°C±2°C (25 мкг в дозе Vi-ТТ объемом 0,5 мл)

Время	Описание	Идентификация (по Оухтерлони)	pH	Содержание О-ацетила (по Хестрину)	Содержание Vi (исследование)	Свободный ViPs	Тест на пирогены	Абдоминальная токсичность	Стерильность
	Прозрачная, бесцветная жидкость без видимых частиц при визуальном осмотре	Должна наблюдаться четкая дуга преципитации	От 6,50 до 7,50	От 0,064 до 0,106 мкмоль/доза	20-30 мкг/доза	Не более 20%	Суммарный ответ у 3 кроликов не должен превышать 1,15°C	Все животные должны прожить 7 дней без уменьшения массы тела	Должна соответствовать тесту на стерильность
День 0	Соответствует	Соответствует	7,10	0,093	27,30	5,0	0,3	Соответствует	Соответствует
1 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,12	0,095	27,93	4,9	0,6	Соответствует	Соответствует
2 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,15	0,098	28,80	5,1	0,4	Соответствует	Соответствует
3 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,13	0,094	27,63	5,3	0,5	Соответствует	Соответствует
6 ^й месяц	Соответствует	Соответствует	7,11	0,095	27,93	5,7	0,6	Соответствует	Соответствует

Пример 4: Клинические исследования

Готовую массу конъюгата «Vi-полисахарид-столбнячный токсин» выпускали в виде лекарственной формы и исследовали на предмет иммуногенности на мышах Balb/c, сравнивая с вакциной, содержащей нативный полисахарид. Исследование с нагрузкой проводили для оценки защитной эффективности вакцины, а доклиническое исследование проводили для оценки абдоминальной, острой и системной токсичности у лабораторных животных. Далее эффективность исследуемой вакцины, содержащей конъюгат «капсулярный Vi-полисахарид-столбнячный токсин» (Vi-ТТ), исследовали в двух различных концентрационных дозах (15 мкг и 25 мкг в дозе) и показали, что обе концентрации вызывают выработку защитных антител у младенцев (до 2 лет), детей и взрослых. Оценивали иммуногенность и безопасность конъюгата брюшнотифозного капсулярного Vi-полисахарида со столбнячным токсином в составе Vi-ТТ конъюгированной вакцины компании BBIL по сравнению с вакциной сравнения (вакцина Турбар[®], содержащая Vi-полисахарид *Salmonella typhi*).

В рамках II фазы: всего 100 участников включили в исследование для оценки безопасности и иммуногенности брюшнотифозной вакцины, содержащей конъюгат капсулярного Vi-полисахарида со столбнячным токсином, по сравнению с брюшнотифозной вакциной Турбар[®], содержащей капсулярный Vi-полисахарид, у здоровых подростков в возрасте от 13 до 17 лет, у детей в возрасте 6-12 лет и 2-5 лет. Исследование показало, что исследуемая вакцина, содержащая конъюгат капсулярного Vi-полисахарида со столбнячным токсином (Vi-ТТ), превосходила вакцину сравнения Турбар[®], содержащую капсулярный Vi-полисахарид, в отношении иммуногенности и реактогенности во всех возрастных группах. Среднее геометрическое титров IgG к Vi в единицах ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, твердофазный иммуноферментный анализ) на миллилитр (ед. ELISA/мл) увеличилось более чем в 4 раза, до 80%, 100% и 70%, соответственно, по сравнению со значениями до вакцинации только вакциной Турбар[®].

Исследуемую вакцину, содержащую конъюгат брюшнотифозного капсулярного Vi-полисахарида со столбнячным токсином (Vi-ТТ), вводили в дозе 25 мкг/доза в виде одной инъекции подросткам 13-17 лет и детям 2-6 лет. Среднее геометрическое IgG к Vi (ед. ELISA/мл) увеличивалось более чем в 4 раза, соответственно, до 100% в обеих возрастных группах по сравнению со значениями в сыворотке до вакцинации. Соответственно, в возрастной группе 2-5 лет делали инъекции по 25 мкг/доза в виде двух инъекций. Временной интервал перед второй инъекцией составлял 6 недель, соответственно. Среднее геометрическое IgG к Vi (ед. ELISA/мл) увеличивалось более чем в четыре раза, соответственно до 100% в этой возрастной группе по сравнению со значениями в сыворотке до вакцинации.

В другой группе детям в возрасте 2-5 лет вводили по 15 мкг/доза в виде двух инъекций. Временной интервал перед второй инъекцией составлял 6 недель, соответственно. Среднее геометрическое IgG к Vi (ед. ELISA/мл) увеличивалось более чем в 4 раза, соответственно до 100% в этой возрастной группе по сравнению со значениями в сыворотке до вакцинации.

Во всех исследуемых группах, получивших 25 мкг в виде одной инъекции, 25 мкг в дозе в виде двух инъекций и 15 мкг в дозе в виде двух инъекций, отмечали 100% сероконверсию. Гуморальный иммунный ответ на вакцину, содержащую конъюгат «Vi-полисахарид-столбнячный токсин» (Vi-ТТ), превосходит ответ на вакцину сравнения, содержащую нативный полисахарид, во всех возрастных группах. Таким образом,

можно заключить, что исследуемая брюшнотифозная вакцина компании ВВЛ, содержащая конъюгат капсулярного Vi-полисахарида со столбнячным токсином (Vi-ТТ), была иммуногенной по сравнению с коммерчески доступной вакциной сравнения Турбар® компании ВВЛ.

5 Данные о количестве участников исследования III фазы: всего 981 участника распределили в группы для получения брюшнотифозной вакцины, содержащей конъюгат ViPs-ТТ, и вакцины сравнения Турбар® для оценки иммуногенности и безопасности брюшнотифозной вакцины, содержащей конъюгат «Vi-полисахарид-ТТ» (Турбар-ТСV™) по сравнению с простой брюшнотифозной Vi-полисахаридной вакциной (Турбар®, вакцина сравнения). Брюшнотифозную вакцину компании

10 ВВЛ, содержащую конъюгат ViPs-ТТ, среднее геометрическое титров и % 4-кратной сероконверсии анализировали в трех возрастных группах (от 6 месяцев до 2 лет, >2 до <15 лет и от 15 до 45 лет) для исследуемой брюшнотифозной ViPs-ТТ конъюгированной вакцины (Турбар-ТСV™). Значения среднего геометрического титров у участников в возрастных группах от 6 месяцев до 2 лет, >2 до <15 лет и от 15 до 45 лет, получавших брюшнотифозную-ТТ конъюгированную вакцину, в день 42 составляло 1952,03 ед. ELISA/мл, 1555,51 ед. ELISA/мл и 812,97 ед. ELISA/мл, соответственно, для IgG антител к брюшнотифозному Vi, по данным ELISA. Процент сероконверсии (4-кратное повышение титра) у субъектов возрастных групп от 6 месяцев до 2 лет, >2 до <15 лет и от 15 до 45 лет, получавших брюшнотифозную-ТТ конъюгированную вакцину, в день 42 составил 98,05%, 99,17% и 92,13%, соответственно (Фигура 12).

25 Таблица 4.1

Данные исследования III фазы вакцины Турбар-ТСV™

Ответ	Период	Возрастная группа		
		6 месяцев - 2 года (N=307)	2 года - 15 лет (N=242)	15 лет - 45 лет (N=90)
30 Среднее геометрическое титров, ед. ELISA/мл (нижний предел ДИ, верхний предел ДИ)	День 0	9,44 (8,66, 10,31)	9,61(8,92, 10,35)	13,01(10,60, 15,97)
	День 42	1952,03 (1795,48, 2122,23)	1555,51 (1371,33, 1764,43)	812,97 (637,66, 1036,46)
Сероконверсия (%) (4-кратная)	День 0 - День 42	98,05%	99,17%	92,13%

35 В группе от 2 до <15 лет среднее геометрическое титров в группе получавших брюшнотифозную-ТТ конъюгированную вакцину Турбар-ТСV™ и брюшнотифозную вакцину Турбар® в день 42 составляло 1555,51 ед. ELISA/мл и 426,63 ед. ELISA/мл, соответственно, для IgG антител к брюшнотифозному Vi, по данным ELISA (p=0,00001). Процент сероконверсии (4-кратное повышение титра) в день 42 в группах получавших вакцину Турбар-ТСV™ и брюшнотифозную вакцину Турбар® составлял 99,17% и 94,86%, соответственно (p=0,0086).

40 В группе от 15 до 45 лет среднее геометрическое титров в группе получавших вакцину Турбар-ТСV™ и брюшнотифозную вакцину Турбар® в день 42 составляло 812,97 ед. ELISA/мл и 376,81 ед. ELISA/мл, соответственно, для IgG антител к брюшнотифозному Vi, по данным ELISA (p=0,0001). Процент сероконверсии (4-кратное повышение титра) в день 42 в группах получавших вакцину Турбар-ТСV™ и брюшнотифозную вакцину Турбар® составлял 92,13% и 89,01%, соответственно (p=0,4737).

45 Брюшнотифозная-ТТ конъюгированная вакцина (ViPs-ТТ) превосходит обычную полисахаридную вакцину в 3,16 раза по среднему геометрическому титров после

вакцинации. Оцененное отношение среднего геометрического поствакцинальных титров к превакцинальным для брюшнотифозной конъюгированной вакцины (исследуемой) в 3,53 раза выше, чем у простой полисахаридной вакцины (вакцины сравнения). В отношении сероконверсии брюшнотифозная конъюгированная вакцина в значительной степени превосходит обычную полисахаридную вакцину с коэффициентом 0,016%.

Резюмированные данные клинического исследования III фазы ViPs-TT конъюгированной вакцины компании BBIL Турбар-TCV™ подробно представлены в таблицах ниже по сравнению с вакциной сравнения Турбар® (Фигуры 12 и 13), а также с вакциной Peda Турп™.

Таблица 4.2
Турбар-TCV™ по сравнению с Турбар®

15 Возрастная группа	Однократная инъекция 25 мкг ViPs-TT конъюгированной вакцины Турбар-TCV™ компании BBIL для проведения полного курса вакцинации (единичная доза)		Простая ViPs вакцина Турбар® компании BBIL	
	Среднее геометрическое титров в день 42 (ед. ELISA/мл)	% сероконверсии в день 42	Среднее геометрическое титра в день 42 (ед. ELISA/мл)	% сероконверсии в день 42
20 6 месяцев - 24 месяца	1952,03	98,05%	Не применимо	Не применимо
2 года- 15 лет	1555,51	99,17%	426,03	94,86%
15 лет - 45 лет	812,97	92,13%	376,81	89,01%

Пример 5: Исследование интерференции TCV и противокоревой вакцины

Турбар-TCV™ представляет собой препарат Vi-полисахаридной вакцины, конъюгированной с белком-носителем столбнячным токсином. Доказано, что у детей, которые получали Vi-конъюгированную вакцину, уровни сывороточных IgG антител к Vi достигали более высоких значений и сохранялись на этом уровне по сравнению с детьми, которые получали простую Vi-полисахаридную вакцину. Турбар-TCV™ (ViPs-TT конъюгированная вакцина) предлагают для введения в рамках календаря вакцинации между 6^м и 24^м месяцами, предпочтительно на 9^м месяце после рождения ребенка. Поскольку противокоревую иммунизацию также проводят в этот же период времени, комбинирование обеих вакцин и введение в составе одной инъекции принесет дополнительную пользу. Чтобы это стало возможным, необходимо исследовать интерференцию двух вакцин в отношении биологических и химических свойств друг друга. В соответствии с указанным предложением спланировали исследование, в котором лиофилизированную противокоревую вакцину разводили жидкой Турбар-TCV™ (ViPs-TT конъюгированной вакциной) и проводили тест на содержание О-ацетила (для Турбар-TCV™) и тест на цитопатический эффект (для противокоревой вакцины) в час 0 и через 4 часа, 8 часов и 12 часов после инкубации при 25⁰ С. Проверяли, находятся ли физико-химические и биологические параметры обеих вакцин в пределах соответствующих технических условий при указанной температуре и в указанные моменты времени. В этом исследовании приводили обзор лабораторных данных для растворенного вакцинального продукта для короткого периода времени.

Таблица 5.1
Техническое описание брюшнотифозной конъюгированной и противокоревой вакцин

Брюшнотифозная конъюгированная вакцина	Противокоревая вакцина
--	------------------------

Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированная вакцина) Единичная доза- 0,5 мл	Противокоревая вакцина (ЖИВАЯ), Фармакопея Индии (лиофилизированная) Единичная доза- 0,5мл
--	--

Проведенное исследование: определение содержания О-ацетила по способу Хестрина
Vi-полисахаридпредставляет собой линейный гомополимер состоящий из (1-4)-20-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактуроновой кислоты, которая О-ацетилирована по углероду-3. Содержание О-ацетила в очищенном Vi-полисахариде имеет важное значение для иммуногенности Vi и может быть измерено по способу Хестрина.

Таблица 5.2
Содержание О-ацетила по методу Хестрина

Номер образца	Описание образца	0 час	4 ^й час	8 ^й час
1.	Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированная вакцина) в начальной временной точке при 2-8°C	0,098 мкмоль/доза	0,098 мкмоль/доза	0,098 мкмоль/доза
2.	Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированная вакцина) при 25°C	0,100 мкмоль/доза	0,100 мкмоль/доза	0,096 мкмоль/доза
3.	Противокоревая вакцина, разведенная в Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированная вакцина) при 25°C	0,151 мкмоль/доза	0,086 мкмоль/доза	0,058 мкмоль/доза
	Техническое описание	0,064-0,106 мкмоль/доза	0,064-0,106 мкмоль/доза	0,064-0,106 мкмоль/доза

Результаты:

Противокоревую вакцину, разведенную в Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированную вакцину) инкубировали при 25°C, после чего анализировали содержание О-ацетила по способу Хестрина. В качестве контроля также одновременно анализировали Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированную вакцину), которую держали в начальной временной точке при 2-8°C, и Турбар-TCV™ (ViPs-ТТ конъюгированную вакцину), которую держали в начальной временной точке при 25°C. Как и ожидали, содержание О-ацетила в контрольных образцах при 2-8°C и 25°C было близко к исходному значению. Содержание О-ацетила в комбинированной вакцине (противокоревая+TCV) превышало допустимой нормы в час 0 (0,151 мкмоль/доза). Оно снижалось со временем к часу 4 и часу 8 (0,086 и 0,058 мкмоль/доза), находясь в пределах допустимой нормы, однако отличалось от соответствующих значений при сравнении с применением только вакцины Турбар-TCV™ при 2-8°C и 25°C.

Проведенное исследование: исследование потенциала вакцины с помощью оценки цитопатического эффекта.

Противокоревая вакцина представляет собой живую аттенуированную вакцину. Для титрования противокоревой вакцины готовили логарифмическое разведение, каждой порцией, полученной в результате логарифмического разведения, инокулировали клетки линии Vero в 8 повторах и инкубировали в течение 7-8 дней, после чего анализировали наличие или отсутствие цитопатического эффекта. Титр вируса вычисляли по формуле Спирмана-Карбера. Результаты представлены ниже:

Таблица 5.3
Исследование потенциала вакцины с помощью оценки цитопатического эффекта

Результаты (log₁₀ CCID₅₀ (50% cell culture infective dose, средняя заражающая доза для клеточной культуры)/0,5мл) исследования интерференции противокоревой вакцины с TCV

№	Описание образца	0 часов	4 часа	8 часов	12 часов
1	Противокоревая вакцина, разведенная собственным растворителем в начале каждой временной точки	3,50		3,40	3,50

2	Противокоревая вакцина, разведенная собственным растворителем, которую держали при 25°C	3,50	3,45	3,50	3,40
3	Противокоревая вакцина, растворенная Турбар-ТСV™ (ViPs-ТТ конъюгированная вакцина), которую держали при 25°C	3,30	3,15	3,00	2,80
5	Техническое описание	Не менее 3,00			

Результаты: По результатам исследования видно, что противокоревая вакцина при разведении собственным растворителем остается стабильной в течение 12 часов, а при разведении Турбар-ТСV™ (ViPs-ТТ конъюгированной вакциной) стабильна в течение 4 часов, а далее между 4 и 8 часами ее активность падает.

(57) Формула изобретения

1. Состав вакцины для предотвращения брюшного тифа, вызываемого *Salmonella typhi*, включающий частично де-О-ацелированный капсулярный Vi-полисахарид (ViPs) *Salmonella typhi*, конъюгированный с белком-носителем с формированием конъюгированного вакцинального антигена, причем ViPs дериватизированы с линкером, представляющим собой дигидразид адипиновой кислоты (ADH), или без него перед конъюгацией с формированием активированных ViPs так, что конъюгация происходит между активированными ViPs и белком-носителем, который не дериватизирован с ADH, и ни один свободный ADH не связан с белком-носителем; состав вакцины вызывает Т-зависимый иммунный ответ против *S.typhi*; причем конъюгированный вакцинальный антиген присутствует в концентрации от 5 до 25 мкг на дозу, предпочтительно 25 мкг на дозу; причем выход конъюгированного вакцинального антигена составляет от 70 до 80%.

2. Состав вакцины по п.1, где белок-носитель выбран из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина, CRM197, предпочтительно столбнячного анатоксина.

3. Состав вакцины по п.1, где конъюгированный вакцинальный антиген получен способом, включающим:

а) периодическое культивирование с подпиткой для получения очищенного ViPs в питательной среде, при этом указанная питательная среда содержит питательный раствор, содержащий глюкозу в интервале концентраций от 1 до 2 мг/мл, при рН, поддерживаемым в интервале от 6,90 до 7,20, и с растворенным кислородом, уровень которого поддерживают между 40 и 60%, где раствор аммиака (50%) поставляли в качестве источника азота вместе с питательной средой;

б) гомогенизацию ViPs со стадии (а) в концентрации 5-7,5 мг/мл под высоким давлением 1500 бар при 2-8°C и повтор стадии гомогенизации на протяжении по меньшей мере 45 пропусков, или помещение в микроволновую печь с получением очищенного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа, который подвергают частичному де-О-ацелированию в присутствии бикарбоната натрия;

с) обработку очищенного ViPs со стадии (а) или стадии (б) сшивающим агентом EDAC;

д) активацию ViPs со стадии (с) линкерной молекулой ADH в присутствии EDAC;

е) обработку активированного ViPs, связанного с линкерной молекулой ADH, со стадии (д) в концентрации от 5 до 7,5 мг/мл очищенного частично де-О-ацелированного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа белком-носителем в присутствии EDAC для образования конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель»; и

ф) диафильтрацию конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» со стадии (е) с непрерывной сменой буфера с помощью фосфатно-солевого буфера, с использованием 1000 кДа мембраны для получения очищенного частично де-О-ацелированного

вакцинального антигена «ViPs-белок-носитель», причем молекулярная масса молекулы конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» составляет от 0,25 до 0,35 кДа.

4. Состав вакцины по п.1, где конъюгированный вакцинальный антиген получен способом, включающим:

5 а) периодическое культивирование с подпиткой для получения очищенного ViPs в питательной среде, при этом указанная питательная среда содержит питательный раствор, содержащий глюкозу в интервале концентраций от 1 до 2 мг/мл, при pH, поддерживаемым в интервале от 6,90 до 7,20, и с растворенным кислородом, уровень которого поддерживают между 40 и 60%, где раствор аммиака (50%) поставляли в качестве источника азота вместе с питательной средой;

10 б) гомогенизацию ViPs со стадии (а) в концентрации 5-7,5 мг/мл под высоким давлением 1500 бар при 2-8°C и повтор стадии гомогенизации на протяжении по меньшей мере 45 пропусаний, или помещение в микроволновую печь с получением очищенного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа, который подвергают частичному де-О-ацетилрованию в присутствии бикарбоната натрия;

15 в) обработку очищенного ViPs со стадии (а) или стадии (б) сшивающим агентом EDAC;

д) обработку белка-носителя ViPs со стадии (в) в концентрации от 5 до 7,5 мг/мл очищенного частично де-О-ацетилированного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа в присутствии сшивающего агента EDAC с целью образования конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель»; и

20 е) диафильтрацию конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» со стадии (д) с непрерывной сменой буфера с помощью фосфатно-солевого буфера, с использованием 1000 кДа мембраны для получения очищенного частично де-О-ацетилированного вакцинального антигена «ViPs-белок-носитель», причем молекулярная масса молекулы конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» составляет от 0,25 до 0,35 кДа.

25 5. Состав вакцины по п.3, где белок-носитель выбран из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина, CRM197, предпочтительно является столбнячным анатоксином.

30 6. Состав вакцины по п.4, где белок-носитель выбран из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина, CRM197, предпочтительно является столбнячным анатоксином.

7. Способ получения вакцинального антигена, представляющего собой конъюгат Vi-полисахарида *Salmonella typhi* с белком-носителем, включающий следующие стадии:

35 а) периодическое культивирование с подпиткой для получения очищенного ViPs в питательной среде, при этом указанная питательная среда содержит питательный раствор, содержащий глюкозу в интервале концентраций от 1 до 2 мг/мл, при pH, поддерживаемым в интервале от 6,90 до 7,20, и с растворенным кислородом, уровень которого поддерживают между 40% и 60%, где раствор аммиака (50%) поставляли в качестве источника азота вместе с питательной средой;

40 б) гомогенизации ViPs со стадии (а) в концентрации 5-7,5 мг/мл под высоким давлением 1500 бар при 2-8°C и повтор стадии гомогенизации на протяжении по меньшей мере 45 пропусаний, или помещение в микроволновую печь с получением очищенного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа, который подвергают частичному де-О-ацетилрованию в присутствии бикарбоната натрия;

45 в) обработку очищенного ViPs со стадии (а) или стадии (б) сшивающим агентом EDAC;

д) активацию ViPs со стадии (в) линкерной молекулой ADH в присутствии EDAC;

е) обработку активированного ViPs, связанного с линкерной молекулой ADH, со стадии (d) в концентрации от 5 до 7,5 мг/мл очищенного частично де-О-ацетилизованного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа белком-носителем в присутствии EDAC для образования конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель»; и

5 ф) диафильтрацию конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» со стадии (f) с непрерывной сменой буфера с помощью фосфатно-солевого буфера, с использованием 1000 кДа мембраны для получения очищенного частично де-О-ацетилизованного вакцинального антигена «ViPs-белок-носитель», причем молекулярная масса молекулы конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» составляет от 0,25 до 0,35 кДа;

10 причем выход конъюгированного вакцинального антигена составляет от 70% до 80%.

8. Способ получения вакцинального антигена, представляющего собой конъюгат Vi-полисахарида *Salmonella typhi*, включающий следующие стадии:

а) периодическое культивирование с подпиткой для получения очищенного ViPs в питательной среде, при этом указанная питательная среда содержит питательный раствор, содержащий глюкозу в интервале концентраций от 1 до 2 мг/мл, при pH, поддерживаемым в интервале от 6,90 до 7,20, и с растворенным кислородом, уровень которого поддерживают между 40 и 60%, где раствор аммиака (50%) поставляли в качестве источника азота вместе с питательной средой;

20 б) гомогенизацию ViPs со стадии (a) в концентрации 5-7,5 мг/мл под высоким давлением 1500 бар при 2-8°C и повтор стадии гомогенизации на протяжении по меньшей мере 45 пропусков, или помещение в микроволновую печь с получением очищенного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа;

25 в) обработку очищенного ViPs со стадии (a) или стадии (b) сшивающим агентом EDAC;

д) обработку белка-носителя ViPs со стадии (c) в концентрации от 5 мг/мл до 7,5 мг/мл очищенного частично де-О-ацетилизованного ViPs с молекулярной массой 250-300 кДа в присутствии сшивающего агента EDAC с целью образования конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель»; и

30 е) диафильтрацию конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» со стадии (f) с непрерывной сменой буфера с помощью фосфатно-солевого буфера, с использованием 1000 кДа мембраны для получения очищенного частично де-О-ацетилизованного вакцинального антигена «ViPs-белок-носитель», причем молекулярная масса молекулы конъюгата «Vi-полисахарид-белок-носитель» составляет от 0,25 до 0,35 кДа;

35 причем выход конъюгированного вакцинального антигена составляет от 70% до 80%.

9. Способ по п.7, где белок-носитель выбран из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина, CRM197, предпочтительно является столбнячным анатоксином.

40 10. Способ по п.8, где белок-носитель выбран из столбнячного анатоксина, дифтерийного анатоксина, CRM197, предпочтительно является столбнячным анатоксином.

11. Способ профилактики брюшного тифа, в том числе у детей в возрасте младше 2 лет, посредством всего одной инъекции для проведения полного курса вакцинации, вызываемого *Salmonella typhi*, посредством введения состава вакцины, где состав вакцины включает частично де-О-ацетилованный капсулярный Vi-полисахарид *Salmonella typhi*, конъюгированный с белком-носителем столбнячным токсином, причем конъюгированный вакцинальный антиген присутствует в концентрации от 5 до 25 мкг

на дозу, предпочтительно 25 мкг на дозу, где указанный состав вакцины достаточен для индукции необходимого зависимого от Т-клеток иммунного ответа против *S. typhi*.

12. Состав вакцины по п.1, где состав вакцины стабилен в течение 3 лет при 2-8°C, и по меньшей мере 6 месяцев при 25°C.

5 13. Состав вакцины по п.1, который также содержит 2-феноксиэтанол в качестве стабилизатора для многодозовых составов.

14. Состав вакцины по п.1, где % сероконверсии состава вакцины составляет от 98 до 100% в случае возрастной группы от 6 до 24 месяцев, от 99 до 100% в случае возрастной группы от 2 до 15 лет, от 90 до 100% в случае возрастной группы 92,13%,
10 таким образом обеспечивая четырехкратное повышение сероконверсии на 42^й день после вакцинации.

15. Комбинированный состав вакцины, содержащий антигены:

а) антиген, представляющей собой конъюгат Vi-полисахарида *S. typhi* со столбнячным токсином (ViPs-ТТ);

15 б) антиген кори;

где отсутствует антигенная интерференция между ViPs-ТТ и антигеном кори, для профилактики брюшного тифа, вызываемого *Salmonella typhi*, и вируса кори, где указанный состав вакцины достаточен для индукции необходимого зависимого от Т-клеток иммунного ответа против *S. typhi*, в том числе у детей в возрасте младше 2 лет
20 посредством всего одной инъекции для проведения полного курса вакцинации, причем каждый из вакцинальных антигенов присутствует в концентрации от 5 до 25 мкг на дозу, предпочтительно 25 мкг на дозу.

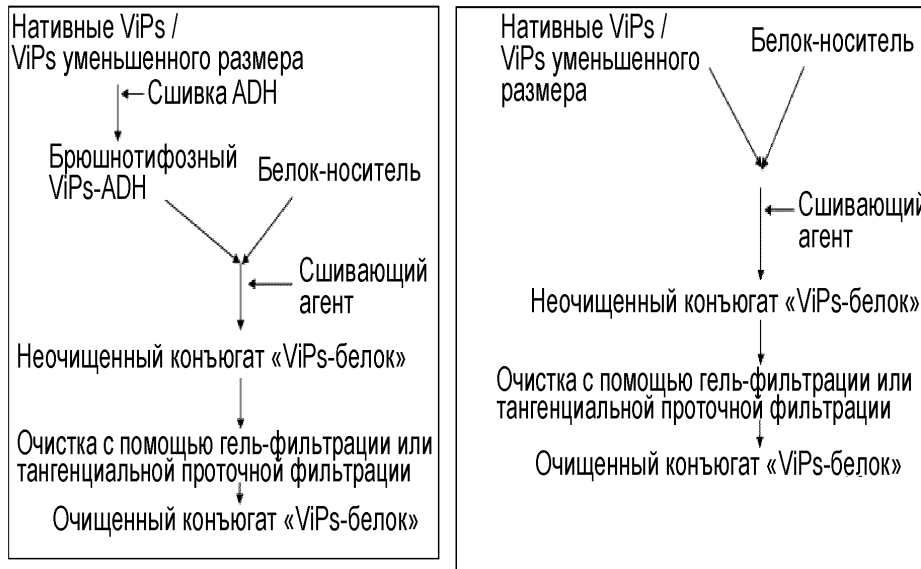
25

30

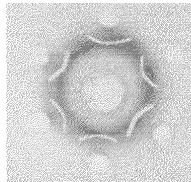
35

40

45



ФИГ. 1

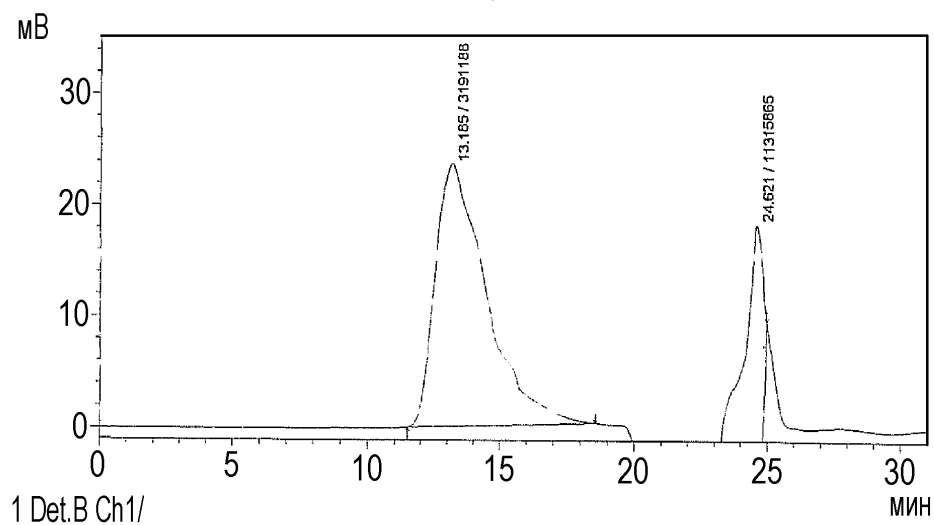


ФИГ. 2

2/12

Описание колонки :SHODEX OHPAK SB-G, SB-805HQ, SB-804HQ

<Хроматограмма> **Рефрактометрический
детектор**

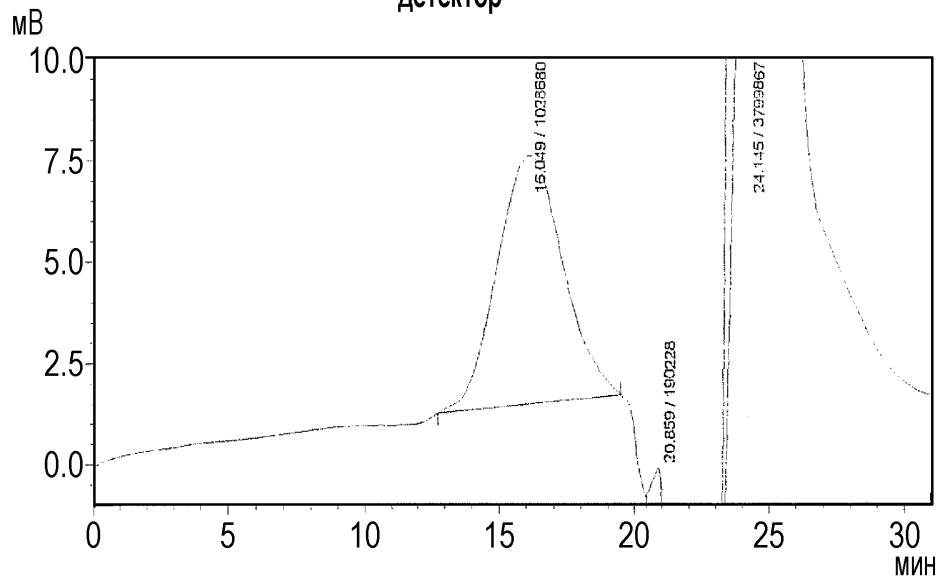


ФИГ. 3

3/12

Описание колонки :SHODEX ОНРАК SB-G, SB-805HQ, SB-804HQ

<Хроматограмма> **Рефрактометрический
детектор**

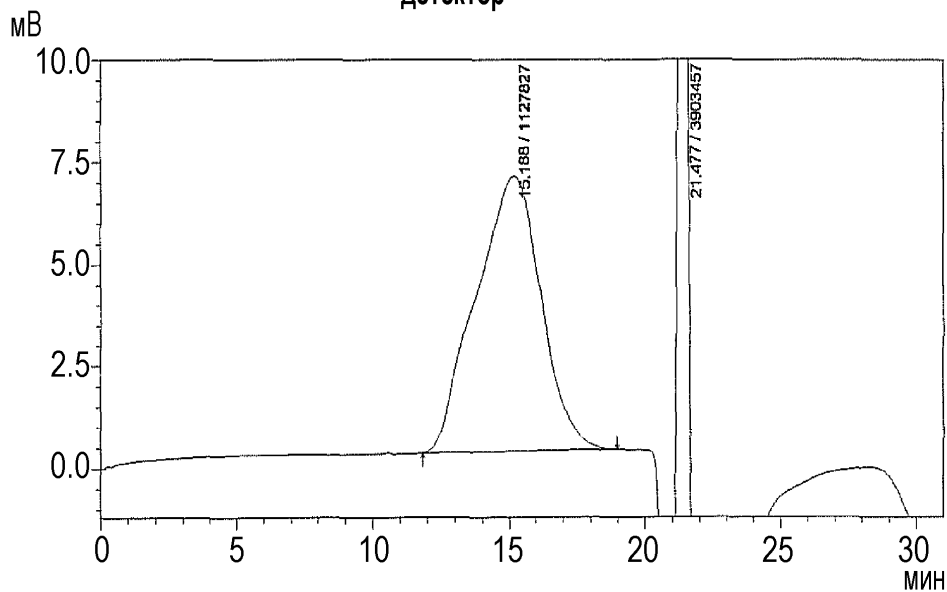


ФИГ. 4

4/12

Описание колонки :SHODEX OHPAK SB-G, SB-805HQ, SB-804HQ

<Хроматограмма> Рефрактометрический детектор

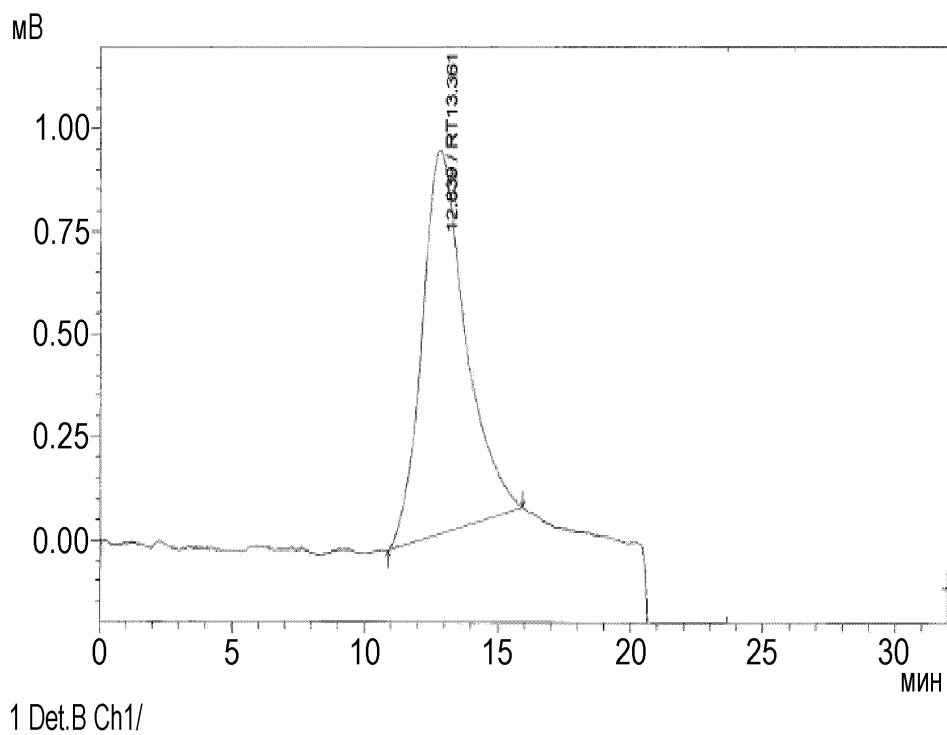


ФИГ. 5

5/12

<Хроматограмма>

Рефрактометрический
детектор

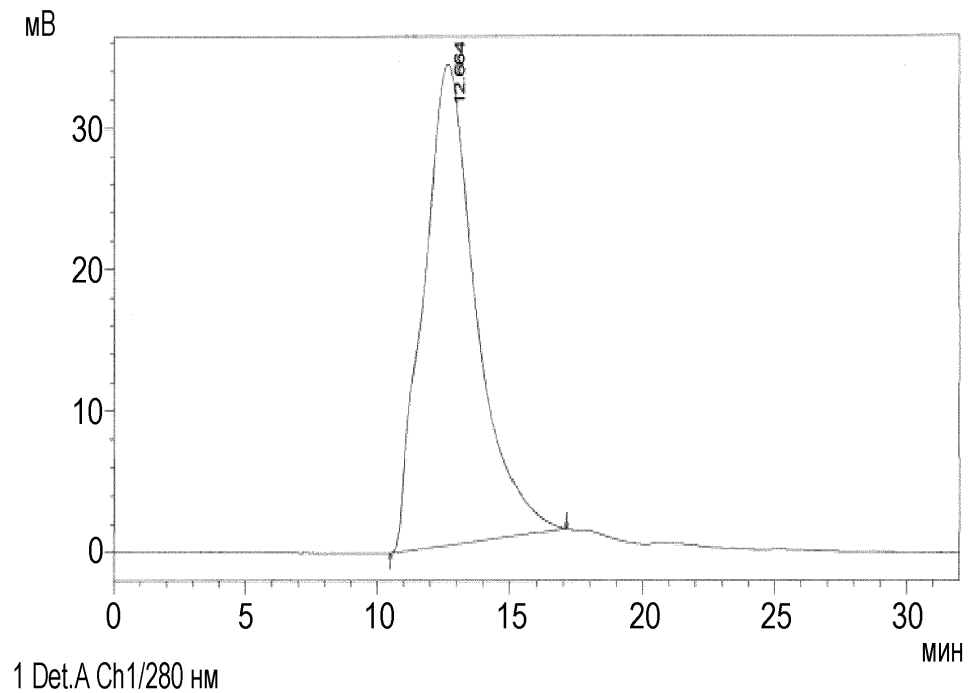


ФИГ. 6

6/12

<Хроматограмма>

УФ



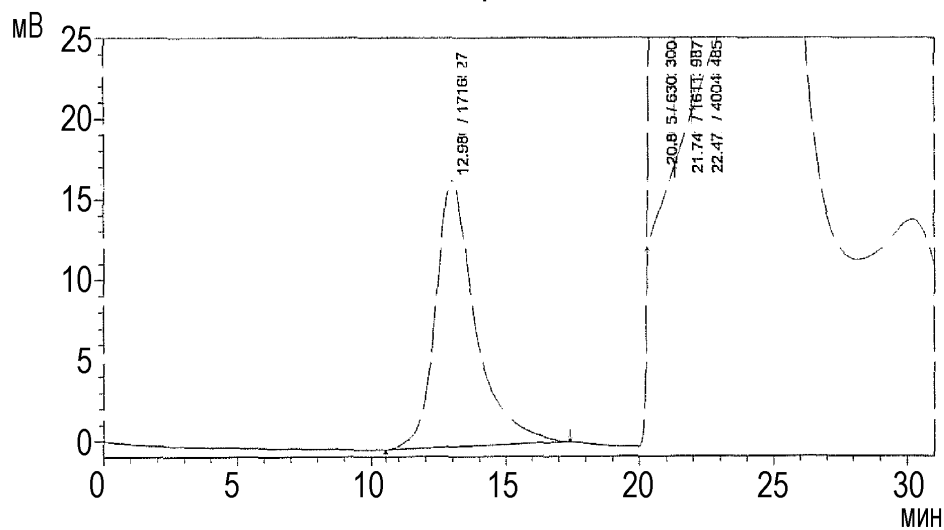
1 Det.A Ch1/280 нм

ФИГ. 7

7/12

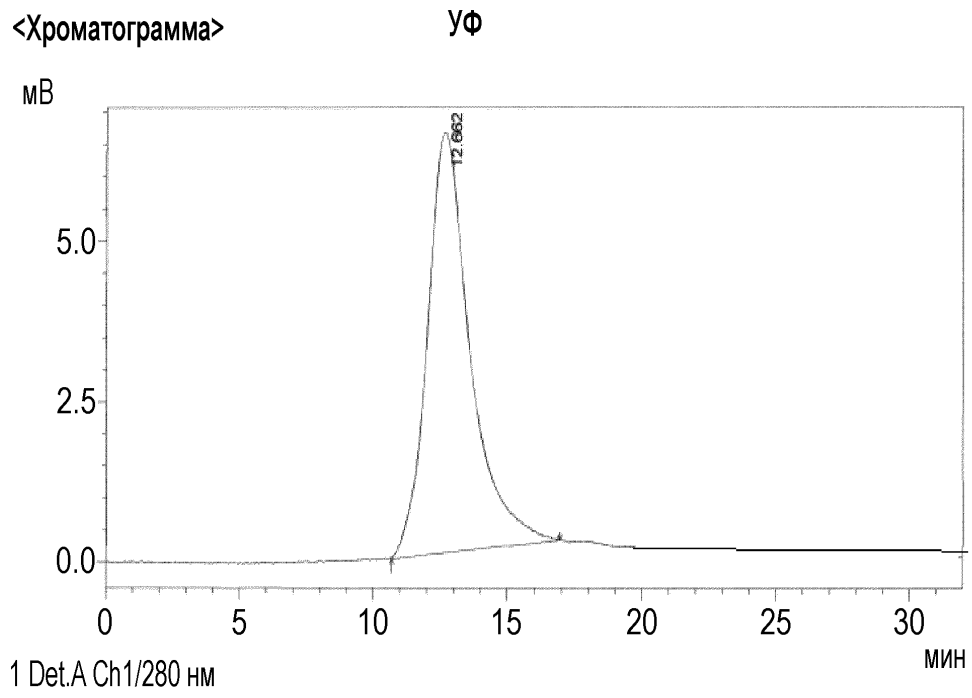
Описание колонки :SHODEX ОНПАК SB-G, SB-805HQ, SB-804HQ

<Хроматограмма> Рефрактометрический детектор



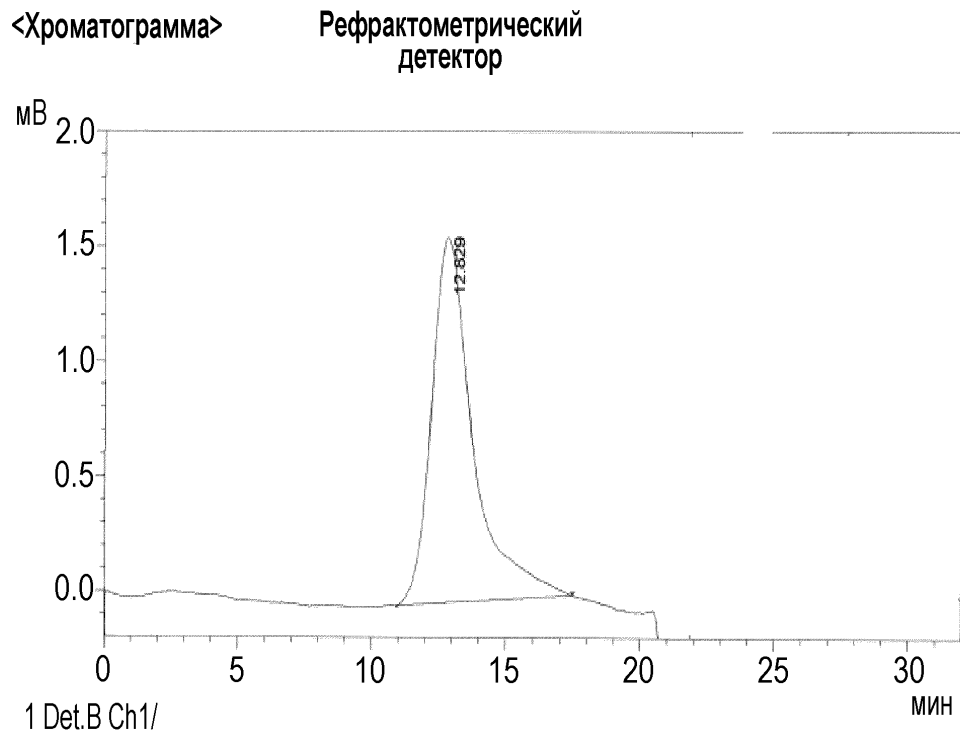
ФИГ. 8

8/12



ФИГ. 9

9/12

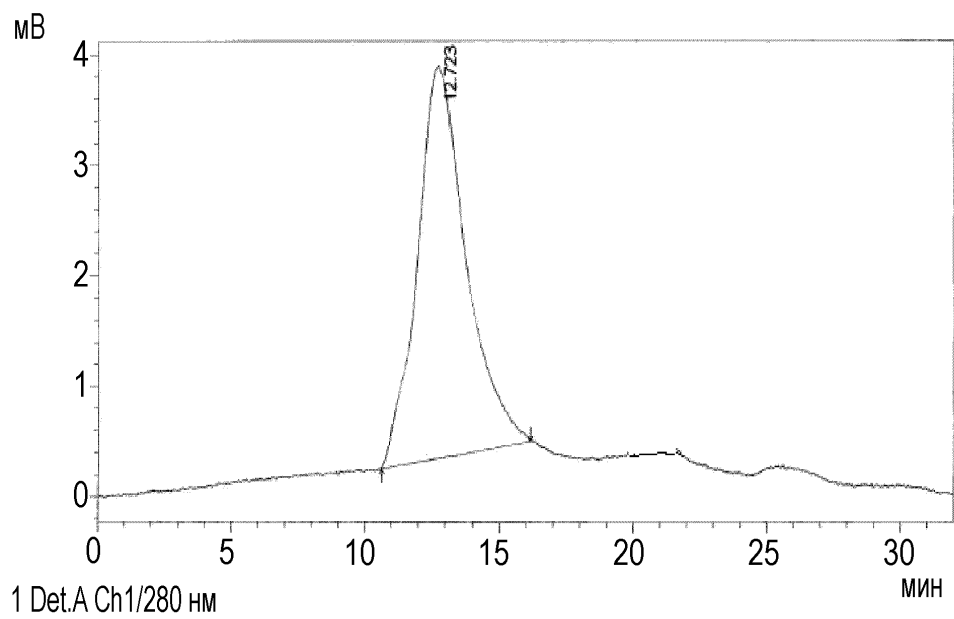


ФИГ. 10

10/12

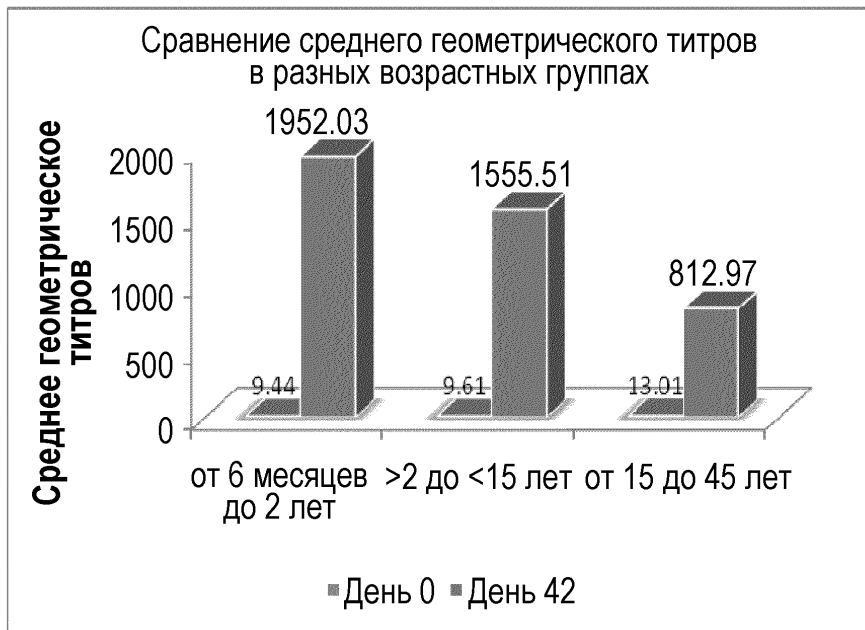
<Хроматограмма>

УФ



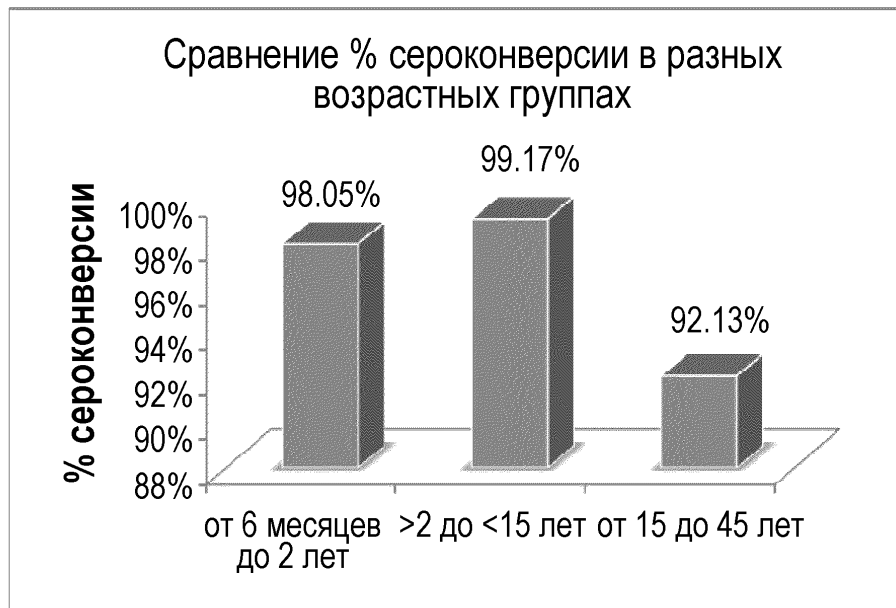
ФИГ. 11

11/12



ФИГ. 12

12/12



ФИГ. 13