



(51) МПК  
**A61K 39/095** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: **2004105656/15, 26.07.2002**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**26.07.2002**

(30) Конвенционный приоритет:  
**20.06.2002 IB PCT/IB02/03191**

(43) Дата публикации заявки: **10.04.2005**

(45) Опубликовано: **27.04.2008 Бюл. № 12**

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: **WO 00/57906 A1, 05.10.2000. WO  
01/41800 A2, 14.06.2001. WO 99/48525 A1,  
30.09.1999. RU 2135209 C1, 27.08.1999. RU  
2035916 C1, 27.05.1995. RU 2121365 C1,  
10.11.1998.**

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу:  
**26.02.2004**

(86) Заявка PCT:  
**IB 02/03495 (26.07.2002)**

(87) Публикация PCT:  
**WO 03/009869 (06.02.2003)**

Адрес для переписки:  
**129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517**

(72) Автор(ы):  
**КОНТОРНИ Марио (IT),  
МАФФЕЙ Массимо (IT)**

(73) Патентообладатель(и):  
**ЧИРОН СРЛ. (IT)**

**RU 2 323 002 C2**

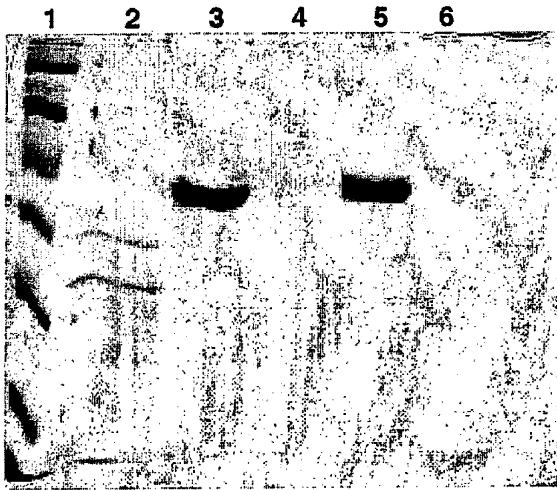
**RU 2 323 002 C2**

**(54) ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩИЕ АЛЮМИНИЕВЫЕ АДЪЮВАНТЫ И ГИСТИДИН**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается антигенной композиции, способу ее получения и ее применению. Композицию, содержащую антиген, соль алюминия и гистидин, получают путем 1) смешивания соли алюминия и гистидина с получением смеси гистидин/соль алюминия и 2) смешивания смеси гистидин/соль алюминия и одного или более антигенов. При этом антигеном может являться белковый или

сахаридный антиген, предпочтительно из *N. meningitidis*. Данная композиция применяется в производстве лекарственного средства для повышения у млекопитающего, в том числе человека, иммунного ответа против антигена (антигенов). Использование способа позволяет улучшить стабильность pH и адсорбцию адъюванта и снизить гидролиз антигена. 3 н. и 20 з.п. ф-лы, 10 ил., 9 табл.



ФИГ. 1

RU 2323002 C2

RU 2323002 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*A61K 39/095* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004105656/15, 26.07.2002**(24) Effective date for property rights: **26.07.2002**(30) Priority:  
**20.06.2002 IB PCT/IB02/03191**(43) Application published: **10.04.2005**(45) Date of publication: **27.04.2008 Bull. 12**(85) Commencement of national phase: **26.02.2004**(86) PCT application:  
**IB 02/03495 (26.07.2002)**(87) PCT publication:  
**WO 03/009869 (06.02.2003)**

Mail address:  
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):  
**KONTORNI Mario (IT),  
MAFFEJ Massimo (IT)**(73) Proprietor(s):  
**ChIRON SRL. (IT)****(54) VACCINES COMPRISING ALUMINUM ADJUVANTS AND HISTIDINE**

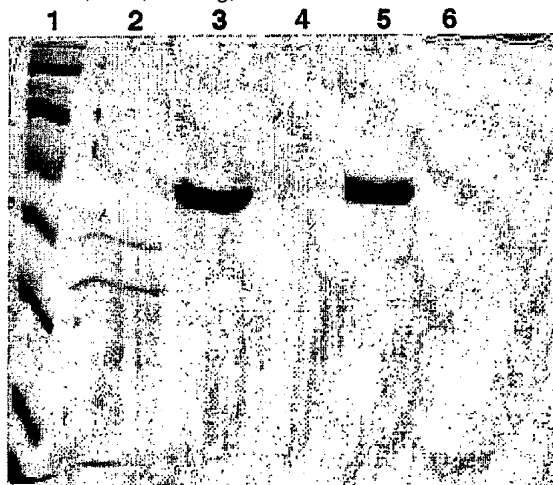
(57) Abstract:

FIELD: medicine, vaccines.

SUBSTANCE: invention relates to an antigen composition, a method for its preparing and its using. Composition comprising antigen, aluminum salt and histidine is prepared by: (1) mixing aluminum salt and histidine to obtain a mixture histidine/aluminum salt, and (2) mixing a mixture histidine/aluminum salt and one or more antigens. Antigen can represent a protein or saccharide antigen from *N. meningitidis* preferably. Proposed composition is used in production of a drug for enhancing the immune response in mammal and in humans against antigen (antigens). Use of the method provides improving pH stability and adsorption of adjuvant and to decrease hydrolysis of antigen.

EFFECT: improved and valuable properties of vaccine.

23 cl, 9 tbl, 10 dwg, 9 ex

**ФИГ. 1**

Все документы, цитируемые в данном описании, полностью включены в качестве ссылок.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области препаратов вакцин.

## 5 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Так же, как и антигенные субстанции, вакцины содержат такие вещества, как разбавители, вспомогательные вещества, консерванты, стабилизаторы и буферы. Как правило, вакцины также содержат адъюванты, то есть вещества, которые улучшают

10 иммунный ответ, развивающийся в ответ на антиген вакцины. Адъювантами, традиционно применяемыми в человеческих вакцинах, служат соли алюминия, такие как гидроксид алюминия и фосфат алюминия. Известны многие другие экспериментальные адъюванты, которые описаны, например, в ссылке 1. Однако адсорбция на солях алюминия остается наиболее общепринятой препаративной формой

15 Хотя их применение является широко распространенным, соли алюминия не всегда сочетаются с отдельными антигенами. Предполагают, например, что гидроксид алюминия не является подходящим для применения в поливалентных вакцинах, содержащих поверхностный антиген гепатита В [2], или для применения с капсулярным полисахаридом *Haemophilus influenzae* [3]. Также предполагают, что различные антигены

20 в одной и той же препаративной форме вакцины должны быть адсорбированы на различных солях алюминия [4] из соображений совместимости.

Так же, как антигенную совместимость, необходимо принимать во внимание стабильность вакцины при применении солей алюминия. Например, было показано, что

25 способность данных солей адсорбировать белки падает с течением времени при комнатной температуре [5] и в результате автоклавирования [6]. Соли квасцов также могут вызывать трудности при лиофилизации [7]. Более того, было обнаружено, что гидроксид алюминия может гидролизовать сахаридные антигены [8] даже при низких температурах и

30 когда антиген конъюгирован с белком-носителем, что приводит к снижению эффективности. Вообще такие проблемы появляются только при получении антигенов для клинического применения и могут не приниматься во внимание во время начальных исследований и

разработки антигена как такового. Объектом данного изобретения является обеспечение улучшения стабильности вакцин, которые содержат соли алюминия, и, в частности, улучшение рН-стабильности (буферизации) и адсорбции адъювантом при различных температурах и/или

35 усовершенствования стабильности антигена (например, снижение гидролиза).

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано на неожиданном наблюдении, что аминокислота гистидин усиливает стабильность вакцин, которые содержат адъюванты - соли алюминия. Данный

40 факт был обнаружен как для сахаридных антигенов, так и для белковых антигенов.

Следовательно, данное изобретение обеспечивает композицию, содержащую антиген, соль алюминия и гистидин. Также данное изобретение обеспечивает способ получения такой композиции, включающий в себя стадию смешивания антигена, соли алюминия и гистидина.

## Антиген

45 Антиген предпочтительно является белковым антигеном или сахаридным антигеном (необязательно конъюгированным). Предпочтительными являются антигены бактерий, особенно предпочтительным является род бактерий *Neisseria* (например, *N. meningitidis*).

Особые бактериальные антигены для применения в рамках изобретения включают в себя

- 50 - белковый антиген *N. meningitidis* серогруппы В, такой как в ссылках 9-15, с особенно предпочтительным белком '287' (см. ниже) и производными (например, 'G287'),
- препарат везикул наружной мембраны (OMV) *N. meningitidis* серогруппы В, такой как описан в ссылках 16, 17, 18, 19 и др.

- сахаридный антиген *N. meningitidis* серогрупп А, С, W135 и/или Y, такой как олигосахарид, описанный в ссылке 20 серогруппы С [см. также ссылку 21].

- сахаридный антиген *Streptococcus pneumoniae* [например, 22, 23, 24].

5 - антиген *Bordetella pertussis*, такой как коклюшный голотоксин (PT) и нитевидный гемагглютинин (FHA) *B. Pertussis*, необязательно также в комбинации с пертактином и/или агглютиногенами 2 и 3 [например, ссылки 25 и 26].

- дифтерийный антиген, такой как дифтерийный анатоксин [например, глава 3 ссылки 27], например, CRM<sub>197</sub> мутант [например, 28].

- столбнячный антиген, такой как столбнячный анатоксин [например, глава 4 ссылки 27].

10 - белковый антиген *Helicobacter pylori*, такой как CagA [например, 29], VacA [например, 29], NAP [например, 30], HopX [например, 31], HopY [например, 31] и/или уреазы.

- сахаридный антиген *Haemophilus influenzae* B [например, 21], предпочтительно олигосахарид.

- антиген *N. gonorrhoeae* [например, 9, 10, 11].

15 - антиген *Chlamydia pneumoniae* [например, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38].

- антиген *Chlamydia trachomatis* [например, 39].

- антиген *Porphyromonas gingivalis* [например, 40].

- антиген *Moraxella catarrhalis* [например, 41].

- антиген *Streptococcus agalactiae* (стрептококк группы В) [например, 42, 43].

20 - антиген *Streptococcus pyogenes* (стрептококк группы А) [например, 43, 44, 45].

- антиген *Staphylococcus aureus* [например, 46].

- антиген *Bacillus anthracis* [например, 47, 48, 49].

Особые вирусные антигены для применения в рамках изобретения включают в себя

- антиген вируса гепатита А, такой как инактивированный вирус [например, 50, 51].

25 - антиген вируса гепатита В, такой как поверхностный и/или сердцевинный антигены [например, 51, 52].

- антиген вируса гепатита С [например, 53].

- антиген(ы) полиомиелита [например, 54, 55], такой как IPV.

30 - антиген(ы) бешенства [например, 56], такой как лиофилизированный инактивированный вирус [например, 57, RabAvert™].

- антигены кори, свинки и/или краснухи [например, главы 9, 10 и 11 ссылки 27].

- антиген(ы) гриппа [например, глава 19 ссылки 27], такие как поверхностные белки гемагглютинин и/или нейраминидаза.

35 - антиген вируса семейства *Flaviviridae* (род флавивирус), такой как вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита, четыре серотипа вируса тропической лихорадки, вирус клещевого энцефалита, вирус Западного Нила.

- антиген пестивируса, такой как вирус классической свиной лихорадки, вирус коровьей вирусной диареи и/или вирус краевой лихорадки.

- антиген парвовируса, например, парвовируса В19.

40 - Композиция может содержать один или более из указанных бактериальных или вирусных антигенов. Композиция может не содержать вирусных антигенов.

Другие антигены, которые можно применять, включают в себя

- прионовый белок (например, прионовый белок CJD)

- амилоидный белок, такой как бета-пептид [58]

45 - раковый антиген, такой как перечисленные в Таблице 1 ссылки 59 или в таблицах 3 и 4 ссылки 60.

При использовании сахаридных или углеводных антигенов их предпочтительно конъюгируют с белком-носителем с целью усиления иммуногенности [например, ссылки 61-

50 70]. Предпочтительными белками-носителями являются бактериальные токсины или анатоксины, такие как дифтерийный или столбнячный анатоксины. Особенно

предпочтительным является дифтерийный анатоксин CRM<sub>197</sub>. Другие подходящие белки-носители включают в себя белок наружной мембраны *N. meningitidis* [например, ссылка 71], синтетические пептиды [например, 72, 73], белки теплового шока [например, 74],

коклюшные белки [например, 75, 76], белок D *H. influenzae* [например, 77], токсин А или В *C. difficile* [например, 78] и др. Когда смесь содержит капсулярные сахараиды обеих серогрупп А и С, предпочтительно, чтобы соотношение (мас./мас.) сахараида MenA: сахараида MenC составляло больше, чем 1 (например, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 или больше). Сахарида различных серогрупп *N. meningitidis* могут быть конъюгированы с одним и тем же или с разными белками-носителями.

При необходимости можно применять любые подходящие реакции конъюгации с любым подходящим связующим звеном.

Токсические белковые антигены при необходимости могут быть детоксифицированы (например, детоксификация коклюшного токсина при помощи химических и/или генетических способов [26]).

Вирус папилломы человека (HPV), вирусоподобные частицы (VLP) не являются предпочтительными антигенами (ср. WO00/45841, WO00/57906, WO01/28585).

При включении в композицию дифтерийного антигена предпочтительно также включать в нее столбнячный антиген и коклюшный антиген. Подобным образом при включении столбнячного антигена предпочтительно также включать дифтерийный и коклюшный антигены. Также и при включении коклюшного антигена предпочтительно также включать дифтерийный и столбнячный антигены. Можно применять коклюшный антиген в виде целой клетки.

Антиген предпочтительно адсорбирован на соли алюминия.

Когда присутствует HBsAg, он предпочтительно адсорбирован на гидроксифосфате алюминия или не адсорбирован ни на какой соли. Адсорбции HBsAg на гидрохлориде алюминия предпочтительно избегают.

Когда присутствует сахаридный антиген *H. influenzae*, он предпочтительно адсорбирован на гидроксифосфате алюминия или не адсорбирован ни на какой соли. Адсорбции сахаридов Hib на гидрохлориде алюминия предпочтительно избегают.

Антигены в композиции в типичном случае присутствуют в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл каждого. Как правило, концентрация любого данного антигена должна быть достаточной, чтобы вызвать иммунный ответ против данного антигена.

В качестве альтернативы применения белковых антигенов в композиции согласно изобретению можно применять нуклеиновые кислоты, кодирующие антиген [например, ссылки 79-87]. Белковые компоненты композиций согласно изобретению, таким образом, могут быть заменены нуклеиновыми кислотами (предпочтительно ДНК, например, в форме плазмиды), которые кодируют белок.

### 35 Соль алюминия

Соль алюминия предпочтительно является гидроксидом алюминия (например, оксигидроксидом алюминия) или фосфатом алюминия (например, гидроксифосфатом или ортофосфатом алюминия), но также можно применять любые другие подходящие соли (например, сульфат и др. [см. главы 8 и 9 ссылки 1]). Соль может быть представлена в любой подходящей форме (например, гелеобразной, кристаллической или аморфной и др.). Предпочтительными солями являются (аморфные) гидроксифосфаты и (кристаллический) оксигидроксид (бемит).

Гидроксифосфаты получают путем осаждения, и условия проведения реакции и концентрации реагентов во время реакции преципитации влияют на степень замещения фосфата гидроксиллом в соли. Гидроксифосфаты обычно имеют молярное соотношение  $PO_4/Al$  от 0,3 до 0,99, а предпочтительные соли имеют соотношение от 0,8 до 0,95 (например,  $0,88 \pm 0,05$ ). Гидроксифосфаты  $[Al(OH)_x(PO_4)_y]$ , где сумма валентности каждого аниона, определяющая его мольную долю, составляет -3], могут отличаться от  $AlPO_4$  наличием гидроксильной группы. Например, зона ИК (IR) спектра  $3146 \text{ см}^{-1}$  (например, при нагревании до  $200^\circ\text{C}$ ) показывает присутствие структурных гидроксидов.

Оксигидроксид алюминия  $[AlO(OH)]$  можно отличить от  $Al(OH)_3$  при помощи ИК-спектроскопии, в частности, по присутствию дорожки поглощения при  $1070 \text{ см}^{-1}$  и сильного плеча спектральной линии при  $3090-3100 \text{ см}^{-1}$ .

Также можно применять смеси различных солей алюминия. Однако предпочтительно применение главным образом одной соли, например, когда применяют две соли, соотношение одной к другой должно быть по меньшей мере 5:1 по массе, например, по меньшей мере 10:1, 100:1, 1000:1 и др.

5 Соль должна быть, как правило, представлена так, чтобы концентрация  $Al^{+3}$  составляла по меньшей мере 1 мкг/мл (например, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл и др.).

Применение гистидина в комбинации с фосфатом алюминия (особенно гидроксифосфатом) является особенно полезным для кислых антигенов.

#### 10 **Гистидин**

Гистидин представляет собой стандартную аминокислоту и легко доступен для применения в данном изобретении. Так как он по существу является биосовместимым, он безопасен и вследствие этого полезен в качестве компонента вакцин.

15 Концентрация гистидина в композиции, как правило, составляет по меньшей мере 1 мкМ и самое большее - 1 М. Концентрация предпочтительно составляет по меньшей мере 1 мМ (например, по меньшей мере 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ и др.) и предпочтительно самое большее 250 мМ (например, самое большее 200 мМ, 150 мМ, 100 мМ, 90 мМ, 80 мМ, 70 мМ, 60 мМ, 50 мМ, 40 мМ, 30 мМ, 20 мМ, 10 мМ и др.). Более предпочтительно, концентрация гистидина в композиции составляет от 2 мМ до 10 мМ (например, от 5 мМ до 20 мМ) и, наиболее предпочтительно, составляет около 5 мМ.

Гистидин предпочтительно представляет собой L-гистидин.

Гистидин предпочтительно действует как буфер. Гистидиновые буферы хорошо известны специалисту в данной области. Соответственно гистидин может быть включен в композицию согласно изобретению.

25 Композиция предпочтительно отличается повышенной рН-стабильностью и/или сниженным гидролизом антигена по сравнению с такой же композицией, в которой гистидиновая буферная система заменена фосфатной буферной системой или которая не содержит буферной системы. Сниженный гидролиз может являться результатом повышенной рН-стабильности.

30 Гистидин можно добавлять к композиции в виде аминокислоты как таковой или в виде ее соли. Типичной солью гистидина является моногидрохлоридмоногидрат.

Необходимо принять во внимание, что ссылки на гистидин в композиции согласно изобретению скорее относятся к "свободному" гистидину, чем к любым остаткам гистидина, которые могут быть частью полипептида (например, антигена) в композиции.

#### 35 **Дополнительные характеристики композиции**

Композиция предпочтительно представлена в жидкой форме, но она может быть лиофилизована (ср. WO01/41800).

40 Композиция также может включать в себя соль натрия, например, фосфат натрия или хлорид натрия. Концентрация соли натрия предпочтительно составляет по меньшей мере 1 мМ (например, 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ и т.д.) и предпочтительно самое большее 10 мМ (например, самое большее 10 мМ, 9 мМ, 8 мМ, 7 мМ и т.д.). Более предпочтительно, концентрация соли натрия в композиции составляет от 1 мМ до 5 мМ (например, от 2 мМ до 3 мМ) и, наиболее предпочтительно, составляет около 2,5 мМ.

45 Особенно полезным в изобретении является то, что оно позволяет контролировать рН и адсорбцию в вакцинах, которые содержат высокие концентрации ионов свободного фосфата, которые могут быть неустраняемыми в вакцине, например, из-за обмена фосфатами в адъюванте или из-за остаточного фосфатного буфера. Когда остаточные фосфатные ионы присутствуют в количестве от 3 до 5 мМ, например, трудно контролировать уровень рН между 6,0 и 7,0, и некоторые антигены могут десорбироваться с адъювантов, а добавление 5-10 мМ гистидина позволяет контролировать рН и адсорбцию, в том числе и при хранении при повышенной температуре.

50 Молярное соотношение гистидина и свободного фосфата предпочтительно составляет по меньшей мере 1,25:1, например 1,5:1, 1,75:1, 2:1, 2,25:1, 3:1, 4:1 и т.д.

Уровень pH композиции предпочтительно составляет от 6 до 7 (например, от 6,3 до 7,0). Уровень pH может быть достигнут с помощью буфера. Как правило, он по существу может быть достигнут присутствием гистидина в композиции.

Композиция, как правило, не содержит сыворотку (например, эмбриональную бычью сыворотку и др.) или другие подобные компоненты, применяемые в культурах клеток; ДНК клетки-хозяина с уровнем более 100 пг/дозу для антигенов, выделенных из культуры клеток; живые клетки.

Композиция обычно является стерильной и/или свободной от пирогенных препаратов.

Композиция может включать в себя детергент (например, Tween, такой как Tween 80) с целью минимизировать адсорбцию антигенов на контейнерах.

Композиция предпочтительно не содержит консерванта. Когда присутствует консервант, могут применяться ртутные концентраты (например, тимеросал) (ср. WO98/34594). Консервантами, которые могут присутствовать или отсутствовать, являются 2-феноксиэтанол, метиловые парабыны, пропиловые парабыны и бензиловый спирт (или их смеси).

#### **Антигенные композиции и лекарственные препараты**

Композиция согласно изобретению, как правило, является вакцинной композицией.

Данное изобретение также обеспечивает применение композиции согласно изобретению в качестве лекарственного препарата. Лекарственный препарат предпочтительно способен повышать иммунный ответ у млекопитающих в ответ на антиген (т.е. он является антигенной композицией) и более предпочтительно является вакциной.

Данное изобретение также обеспечивает применение композиции согласно изобретению для получения лекарственного препарата для повышения иммунного ответа у млекопитающих в ответ на антиген. Лекарственный препарат предпочтительно является вакциной.

Данное изобретение также обеспечивает способ повышения иммунного ответа у млекопитающих, включающий в себя стадию введения эффективного количества композиции согласно изобретению. Иммунный ответ предпочтительно является защитным. Данный способ может повышать бустерный ответ.

Млекопитающим предпочтительно является человек и, наиболее предпочтительно, ребенок.

Данные применения и способы являются предпочтительными для предупреждения и/или лечения заболеваний, вызываемых *Neisseria* (например, менингит, септицемия, гонорея и др.), *H. influenzae* (например, средний отит, бронхит, пневмония, целлюлит, перикардит, менингит и др.) или пневмококком (например, менингит, сепсис, пневмония и пр.). Таким образом, профилактика и/или лечение бактериального менингита является предпочтительной.

Вакцины согласно изобретению могут быть профилактическими (т.е. могут служить для предотвращения инфицирования) или терапевтическими (т.е. для лечения заболевания после инфицирования), но, как правило, являются профилактическими.

#### **Дополнительные компоненты композиции**

Композиция согласно изобретению, как правило, в дополнение к компонентам, упомянутым выше, включает в себя один или более из "фармацевтически приемлемых носителей", которые включают в себя любой носитель, который сам по себе не стимулирует продукцию антител, вредных для лица, получающего данную композицию. Подходящими носителями, как правило, являются крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полилактоновые кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, трегалоза (WO00/56365) и сложные липиды (такие как масляные капли или липосомы). Подобные носители хорошо известны рядовому специалисту в данной области. Вакцины также могут содержать растворители, такие как вода, соляной раствор, глицерин и др. Кроме того, в композиции могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие агенты, вещества-буферы pH и им подобные. Полное обсуждение



фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ представлено в Remington's Pharmaceutical Sciences [например, ссылка 88].

Антигенные композиции, применяемые в качестве вакцин, включают в себя иммунологически эффективное количество антигена, а также при необходимости любой другой из вышеупомянутых компонентов. Под "иммунологически эффективным количеством" подразумевается то, что введение такого количества индивиду в однократной дозе или в качестве части цикла лечения эффективно для лечения или профилактики. Это количество может варьироваться в зависимости от состояния здоровья и физического состояния пациента, возраста, таксономической группы индивида, подвергаемого лечению (например, нечеловекообразного примата, примата и др.), способности иммунной системы индивида синтезировать антитела, желаемой степени защиты, препаративной формы вакцины, оценки медицинской ситуации лечащим врачом и других важных факторов. Полагают, что количество может варьировать в относительно широком диапазоне, что можно определить обычными способами. Режим лечения может быть схемой одной дозы или схемой множества доз (например, включая бустерные дозы). Вакцину можно вводить в сочетании с другими иммунорегуляторными агентами.

Вакцину можно вводить в сочетании с другими иммунорегуляторными агентами.

Вакцина может включать в себя, помимо соли алюминия, адьювант. Предпочтительные адьюванты для усиления эффективности композиции включают в себя, не ограничиваясь перечисленным, (1) эмульсионные композиции типа "масло-в-воде" (в присутствии или в отсутствие специфических иммуностимулирующих агентов, таких как мурамилпептиды (см. ниже) или компоненты бактериальной стенки), такие, например, как (a) MF59™ (WO90/14837; глава 10 в ссылке 1), содержащий 5% сквалена, 0,5% Tween 80 и 0,5% Span 85 (необязательно содержащий MTP-PE), изготовленный в виде субмикронных частиц с применением микрофлюидизатора, (b) SAF, содержащий 10% сквалена, 0,4% Tween 80, 5% полиионноблокированный полимер L121 и thr-MDP, микрофлюидизированный до субмикронной эмульсии или обработанный вихревым встряхивателем, для образования эмульсии с большим размером частиц, и (c) Ribit™ адьювантная система (RAS) (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), содержащая 2% сквалена, 0,2% Tween 80 и один или более компонентов бактериальной стенки из группы, состоящей из монофосфорилипид A (MPL), димиколаттрегалозы (TDM) и остова клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL + CWS (Detox™); (2) можно применять адьюванты сапонины, такие как QS21 или Stimulon™ (Cambridge, Bioscience, Worcester, MA), или частицы, произведенные из них, такие как ISCOM (иммуностимулирующие комплексы), данные ISCOM могут быть лишены дополнительного разрыхлителя, например, WO00/07621; (3) полный адьювант Фрейнда (CFA) и неполный адьювант Фрейнда (IFA); (4) цитокины, такие как интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636) и др.), интерфероны (например, интерферон гамма), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор некроза опухолей (TNF), и др.; (5) монофосфорилипид A (MPL) или 3-О-деацелированный MPL (3dMPL), например, GB-2220221, EP-A-0689454; (6) комбинация 3dMPL, например, с QS21 и/или эмульсиями типа "масло-в-воде", например, EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) олигонуклеотиды, содержащее CpG-мотивы [Krieg Vaccine 2000, 19, 618-622; Krieg Curr opin Mol Ther 2001 3:15-24; Roman et al., Nat. Med., 1997, 3, 849-854; Weiner et al., PNAS USA, 1997, 94, 10833-10837; Davis et al., J. Immunol., 1998, 160, 870-876; Chu et al., J. Exp. Med., 1997, 186, 1623-1631; Lipford et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu et al., Vaccine, 1988, 16, 1216-1224, Krieg et al., Nature, 1995, 374, 546-549; Klinman et al., PNAS USA, 1996, 93, 2879-2883; Ballas et al., J. Immunol., 1996, 157, 1840-1845; Cowdery et al., J. Immunol., 1996, 156, 4570-4575; Halpern et al., Cell. Immunol., 1996, 167, 72-78; Yamamoto et al., Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 866-873; Stacey et al., J. Immunol., 1996, 157, 2116-2122; Messina et al., J. Immunol., 1991, 147, 1759-1764; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi et al., J. Immunol., 1996, 157, 5394-5402; Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 4755-4761; и Yi et al., J. Immunol., 1998, 160, 5898-

5906; Международные патентные заявки WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 и WO98/52581], то есть содержащие по меньшей мере один CG-динуклеотид, с 5-метилцитозином, необязательно применяемым вместо цитозина; (8) простой эфир полиоксиэтилена или сложный эфир полиоксиэтилена, например, WO01/52549; (9) поверхностно-активное вещество - сложный эфир полиоксиэтилена и сорбита в комбинации с октоксинолом (например, WO01/21207) или полиоксиэтиленалкиловый простой эфир или поверхностно-активное вещество - сложный эфир в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным неионным поверхностно-активным веществом, таким как октоксинол (например, WO01/21152); (10) иммуностимулирующий олигонуклеотид (например, CpG-олигонуклеотид) и сапонин, например, WO00/62800; (11) адъювант и частицы соли металла, например, WO00/23105; (12) сапонин и эмульсия типа "масло-в-воде", например, WO99/11241; (13) сапонин (например, QS21) + 3dMPL + IL-12 (необязательно + стерол), например, WO98/57659; (14) хитозан; (15) холерный токсин или термолабильный токсин *E.coli*, или их детоксифицированные мутанты [89]; (16) микрочастицы поли( $\alpha$ -гидроксильных)кислот, таких как PLG; (17) другие вещества, которые действуют как иммуностимулирующие агенты для усиления эффективности данной композиции.

Мурамиловые пептиды включают в себя N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетилнормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1'-2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)этиламин (MTP-PE) и др.

После получения композиции согласно изобретению можно вводить непосредственно субъекту. Субъектами, подвергающимися лечению, могут быть животные, в частности, можно лечить человека. Вакцины являются особенно полезными для вакцинации детей и подростков.

Как правило, антигенные композиции получают как инъекционные формы в виде жидких растворов, так и в виде суспензий; могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких растворителях перед выполнением инъекции. Препарат также может быть эмульгирован или заключен в липосомы для усиления адъювантного эффекта. Непосредственная доставка композиций обычно является парентеральной (например, путем инъекции подкожно, внутривенно или внутримышечно, или доставки в межтканевое пространство ткани). Данные композиции также можно вводить в место повреждения. Другие пути введения включают в себя пероральное или легочное введение, суппозитории и трансдермальные или транскутанные аппликации (например, см. WO98/20734), иглы и гипоспреи. Режим лечения может быть схемой одной дозы или схемой множества доз (например, включая бустерные дозы).

#### **Стадия смешивания антигена, соли алюминия и гистидина**

Для получения композиции согласно изобретению необходимо смешать антиген, соль алюминия и гистидин. Предпочтительно, чтобы при смешивании антигена и соли алюминия присутствовал гистидин. Таким образом, гистидин присутствует во время адсорбции на соли алюминия. Данный процесс сравнивают с добавлением гистидина к комбинации антиген/соль алюминия, которая уже существует, т.е. гистидин в данном процессе не просто добавляет как буфер после взаимодействия антигена и соли алюминия, а он присутствует во время их взаимодействия.

В способе согласно изобретению антиген, следовательно, смешивают со смесью гистидин/соль алюминия. Следовательно, способ согласно изобретению может включать в себя следующие стадии: (a) получение смеси соли алюминия и гистидина; и (b) смешивание антигена с указанной смесью. Смесь по пункту (a) предпочтительно является водной и может быть получена в водных условиях или может быть сухой смесью, которую регидратируют перед применением.

Когда один или более антигенов адсорбированы на соли алюминия в присутствии гистидина, смесь может быть смешана с другими антигенами, например смешана с существующими композициями дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита или гепатита

В.

**Определения**

Термин "содержащий" означает "включающий", так же как и "состоящий из", например, композиция, "содержащая" X, может состоять только из X или может включать в себя что-

5 нибудь дополнительное, например, X+Y.

Термин "приблизительно" в применении к численным значениям x означает, например,  $x \pm 10\%$ .

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фиг.1 показан анализ электрофореза в денатурирующих условиях антигенных композиций после центрифугирования. Дорожка 1 включает в себя маркеры молекулярной массы (MW) (220, 97, 66, 46, 30, 21, 14 кДа). OMV-антиген (2 мкг) применяли в дорожке 2; G287-антиген применяли в дорожках 3 (10 мкг) и 4 (0,5 мкг). Антигеном, применяемым в дорожках 5 и 6, была комбинация OMV (50 мкг/мл) и G287 (100 мкг/мл) с 1 мг/мл оксигидроксида алюминия; композиция дорожки 5 включает в себя 10 мМ фосфата натрия (PBS), тогда как композиция дорожки 6 включает в себя 5 мМ гистидина в соляном растворе.

На фиг.2 также показан анализ электрофореза в денатурирующих условиях антигенных композиций после центрифугирования. Дорожка 1 включает в себя такие же маркеры MW, как и фиг.1. OMV-антиген (2,5 мкг) применяли в дорожке 2;  $\Delta$ G287-антиген применяли в дорожках 3 (2 мкг) и 4 (0,5 мкг). Антигеном, применяемым в дорожках 5, 6 и 7, была комбинация OMV (50 мкг/мл) и  $\Delta$ G287 (100 мкг/мл) с 1 мг/мл оксигидроксида алюминия в соляном растворе (pH 6,5); композиция дорожки 5 включает в себя 2,5 мМ фосфата натрия, композиция дорожки 6 содержит 5 мМ гистидина, а композиция дорожки 7 содержит 10 мМ гистидина.

На фиг.3 также показан анализ электрофореза в денатурирующих условиях антигенных композиций после центрифугирования. Дорожка 1 включает в себя такие же маркеры MW, как и фиг.1. OMV-антиген (2 мкг) применяли в дорожке 2;  $\Delta$ G287-антиген применяли в дорожках 3 (2 мкг) и 4 (0,5 мкг). Антигеном, применяемым в дорожках 5 и 6, была комбинация OMV (50 мкг/мл) и  $\Delta$ G287 (100 мкг/мл) с 3,3 мг/мл оксигидроксида алюминия в соляном растворе (pH 6,5); композиция дорожки 5 включает в себя 2,5 мМ фосфата натрия (PBS), композиция дорожки 6 содержит 5 мМ гистидина в соляном растворе.

На фиг.4 показана pH-стабильность композиций вакцины при 4°C. Заштрихованные символы представляют собой вакцины, забуференные 5 мМ гистидина; незаштрихованные символы представляют собой вакцины, забуференные 2,5 мМ фосфата натрия. Исходный уровень pH составлял 6,0 (ромбы), 6,5 (квадраты) или 7,0 (треугольники). На фиг.5 показано то же самое при температуре 37°C.

На фиг.6 показан гель-электрофорез в денатурирующих условиях для различных антигенов. Дорожка 1 содержит маркеры MW. Дорожки 2-6 содержат маркеры: (2) G287-953; (3) 961с; (4) 936-741; (5) новозеландские OMV; и (6) норвежские OMV. Дорожки 7-10 показывают надосадочную жидкость центрифугированных композиций гистидина согласно изобретению после 1 месяца хранения при 2-8°C: (7)  $\Delta$ G287-953; (8) 961с + 936-741 +  $\Delta$ G287-953; (9) 961с + 936-741 +  $\Delta$ G287-953 + OMV<sub>NZ</sub>; (10) 961с + 936-741 +  $\Delta$ G287-953 + OMV<sub>Norway</sub>.

45 На фиг.7 показано то же самое, что и на фиг.6, но на дорожках 7-10 представлен препарат после хранения при 36-38°C.

На фиг.8 показан гель-электрофорез в денатурирующих условиях для различных антигенов. Дорожка 1 содержит маркеры MW. Дорожки 2-5 содержат маркеры: (2) 961с; (3) 936-741; (4) новозеландские OMV; и (5) норвежские OMV. Дорожки 6-9 показывают надосадочную жидкость центрифугированных композиций гистидина согласно изобретению после 1 месяца хранения при 2-8°C: (6) 961с; (7) 936-741; (8) OMV<sub>NZ</sub>; (9) OMV<sub>Norway</sub>.

На фиг.9 показано то же самое, что и на фиг.8, но на дорожках 6-9 представлен препарат после хранения при 36-38°C.

На фиг.10 показан гель-электрофорез в денатурирующих условиях для новозеландских ОМV. Дорожка 1 содержит маркеры MW. Дорожки 2, 3, 6 и 7 содержат ОМV-маркеры, хранящиеся при 2-8°C (дорожки 2 и 3) или 36-38°C (дорожки 6 и 7), присутствующие в количестве 2 мкг (дорожки 2 и 6) или 1 мкг (дорожки 3 и 7). Дорожки 4, 5, 8 и 9 показывают ОМV в композициях гистидина согласно изобретению после 30 дней хранения при 2-8°C (дорожки 4 и 5) или 36-38°C (дорожки 8 и 9). Дорожки 4 и 8 соответствуют надосадочной жидкости отцентрифугированных ОМV, тогда как дорожки 5 и 9 соответствуют осадку.

#### ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### Пример 1 - рН-стабильность и адсорбция менингококкового антигена В '287'

В ссылке 11 описан белковый антиген, названный '287' *N. meningitides* серогруппы В. В ссылке 90 описана форма данного антигена ('ΔG287'), который укорочен с удалением N-концевых аминокислот вплоть до гексаглицинового участка (и включая его). Оба, 287 и ΔG287, способны вызывать защитный иммунный ответ у мышей. В ссылках 16-19 описаны ОМV-антигены *N. meningitides* серогруппы В. Данные ОМV также способны вызывать защитный иммунный ответ у мышей.

Данные два антигена получены путем адсорбции на адъюванте гидроксида алюминия. Исследовали две концентрации адъюванта (1 мг/мл и 3,3 мг/мл).

Исследования иммунизации мышей показали, что иммуногенность вакцины связана с уровнем адсорбции антигена на адъюванте. Для оценки уровня адсорбции образцы окончательных композиций центрифугировали при 1300 об/мин в течение 10 минут и анализировали надосадочную жидкость методом электрофореза в денатурирующих условиях с целью определения присутствия неадсорбированного антигена. Рядом помещали подходящие белковые стандарты в соответствующих концентрациях для количественного сравнения.

В порядке поддержания стабильного физиологического уровня рН при 4°C и 37°C в течение периода 4 недели с применением в качестве буфера фосфата натрия было обнаружено, что для композиции необходимо 10 мМ фосфата натрия. Однако при этом уровне адсорбция G287 составила только 50% (фиг.1, дорожка 5). 100% адсорбцию можно было поддерживать при 2,5 мМ фосфата натрия (дорожка 5 фиг.2 и 3), но такая композиция не имела стабильного уровня рН при 4°C или 37°C.

Следовательно, был необходим поиск альтернативной буферной системы, которая сможет поддерживать стабильность рН без снижения адсорбции.

Адсорбция составила 95-100% при применении 5 мМ гистидина (дорожки 6 фиг.1, 2 и 3), а также при применении 10 мМ гистидина (фиг.2, дорожка 7). На основании адсорбции, таким образом, 5 мМ или 10 мМ гистидина соответствовали 2,5 мМ фосфата натрия в присутствии 1 мг/мл (фиг.1 и 2) или 3,3 мг/мл (фиг.3) оксигидроксида алюминия.

С целью определения диапазона рН, в котором вакцинные композиции являются стабильными, выбрали три исходных значения рН (рН 6,0, 6,5 и 7,0) и контролировали рН-стабильность в течение четырех недель в присутствии 2,5 мМ фосфата натрия и 5 мМ гистидина. Стабильность оценивали как при 4°C, так и при 37°C.

Антигеном во всех вакцинах была комбинация ΔG287 (100 мкг/мл) и ОМV (50 мкг/мл) с добавлением 3,3 мг/мл оксигидроксида алюминия.

На фиг.4 показана рН-стабильность при 4°C, а на фиг.5 показана рН-стабильность при 37°C [NB - из-за бактериальной контаминации не было возможности провести измерения для гистидин-забуференной вакцины при рН 6,0 в течение 4 недель].

При обеих температурах уровень рН имел тенденцию к повышению с течением времени при 2,5 мМ натрий-фосфатного буфера, но оставался стабильным в присутствии 5 мМ гистидинового буфера.

Следовательно, по сравнению с натрий-фосфатным буфером гистидин поддерживает рН-стабильность с течением времени без снижения адсорбции.

##### Пример 2 - адсорбция сахаридного антигена менингококка С

Конъюгаты сахаридов в растворе имеют тенденцию к деградации путем гидролиза [7, 8] ("жидкие" вакцины). Для предотвращения этого конъюгаты могут быть лиофилизированы [7], но данный процесс требует добавления адъюванта в момент разбавления концентрата. Предпочтительной является жидкая форма вакцины, в которой сахарид не является предметом гидролитической деградации.

Этот процесс изучали для конъюгата олигосахарида менингококка серогруппы С на белке-носителе CRM<sub>197</sub> [20]. CRM<sub>197</sub> является кислым и вследствие этого не полностью адсорбируется на отрицательно заряженных фосфатах алюминия. Гистидин, однако, является положительно заряженным, и считается, что он способен маскировать отрицательный заряд. Следовательно, гистидиновый буфер исследовали с целью улучшения адсорбции MenC-CRM<sub>197</sub> на гидроксифосфате алюминия.

Адсорбцию антигена оценивали в присутствии и в отсутствие гистидинового буфера, измеряя концентрацию белка в надосадочной жидкости вакцины с применением метода определения белка BCA, после центрифугирования для отделения осадка адъюванта. Вакцины получали в виде 20 мкг/мл олигосахарида и 45 мкг/мл белка CRM<sub>197</sub>. Получены следующие результаты:

Антиген	Адъювант	[Гистидин] (мМ)	Белок (мкг/мл)
MenC-CRM <sub>197</sub>	Гидроксифосфат Al <sup>3+</sup> =0,6 мг/мл	0	42,4
		5	28,6
		10	21,7

Таким образом, адсорбция антигена улучшается, когда гистидин присутствует в композиции: адсорбция составляет около 6% в отсутствие гистидина; 5 мМ гистидина повышают ее до 36%; 10 мМ гистидина повышают адсорбцию почти до 52%.

Таким образом, гистидин является полезным дополнением для улучшения адсорбции антигенов на гидроксифосфате алюминия.

### Пример 3 - адсорбция антигена менингококка B NadA

NadA (адгезин А нейсерии) серогруппы В *N. meningitidis* описан как белок '961' в ссылке 11 (SEQ IDs 2943 & 2944) и как 'NMB1994' в ссылке 13 (см. также инвентарные номера GenBank 11352904 & 7227256). Аллельные формы NadA описаны в ссылке 91. У предпочтительных форм NadA отсутствует С-концевой якорный домен ('961с').

961с (100 мкг/мл) адсорбировали на оксигидроксида алюминия (3 мг/мл) в присутствии 10 мМ гистидинового буфера, рН 6,5. Через 4 недели хранения при 2-8°C или при 36-38°C антиген остался на 100% адсорбированным (фиг.8 и 9, дорожка 6). Уровень рН композиции был 6,44 в нулевой момент времени и через 4 недели хранения немного возростал до 6,48 (2-8°C) или 6,47 (36-38°C).

### Пример 4 - адсорбция гибридных антигенов менингококка В

В ссылках 92 и 93 описана гибридная экспрессия антигенов менингококка В. Одним из этих гибридов является ' $\Delta$ G287<sub>nz</sub>-953', а другим - '936-741'. Оба этих гибрида (100 мкг/мл) адсорбировали на оксигидроксида алюминия (3 мг/мл) в присутствии 10 мМ гистидинового буфера, рН 6,3. Через 4 недели хранения при 2-8°C или при 36-38°C, ' $\Delta$ G287<sub>nz</sub>-953' остался адсорбированным на 100% (фиг.6 и 7, дорожка 7) с уровнем рН, немного возросшим с 6,44 до 6,52 (2-8°C) или 6,53 (36-38°C). '936-741' оставался на 100% адсорбированным при 36-38°C (фиг.9, дорожка 7), но оказался адсорбированным на ~99% при 2-8°C (фиг.8, дорожка 7), с уровнем рН, немного возросшим с 6,33 до 6,37 (2-8°C) или 6,38 (36-38°C).

### Пример 5 - адсорбция менингококковых OMV

Как упомянуто выше, вакцины OMV менингококка В хорошо известны. OMV получают из норвежского штамма менингококка В или из новозеландского штамма (394/98). Оба этих препарата OMV (50 мкг/мл) были адсорбированы на оксигидроксида алюминия (3 мг/мл) в присутствии 10 мМ гистидинового буфера, рН 6,5. Через 4 недели хранения при 2-8°C или при 36-38°C оба препарата OMV оставались адсорбированными на 100% (фиг.8 и 9, дорожки 8 и 9). В препарате норвежских OMV уровень рН немного возростал с 6,39 до

6,42 в течение 4 недель хранения при обеих температурах хранения. В препарате новозеландских OMV уровень pH немного возростал с 6,40 до 6,42 (2-8°C) или 6,43 (36-38°C).

Новозеландские OMV в качестве альтернативы получали с применением 5 мМ гистидина. Начиная с чистой воды, добавляли оксигидроксид алюминия, затем гистидин с 10-минутным перемешиванием. Затем добавляли OMV и перемешивали в течение 15 минут. Затем добавляли NaCl, после чего еще 10 минут перемешивали. Окончательная композиция содержала 3,3 мг/мл оксигидроксида алюминия, 7,5 мМ NaCl, 5 мМ гистидина, 100 мкг/мл OMV, pH 6,42.

При хранении при температурах 2-8°C или 36-38°C уровень pH и адсорбция OMV варьировались следующим образом:

	pH		% адсорбции	
	2-8°C	36-38°C	2-8°C	36-38°C
Нулевая точка	6,42	6,42	100	100
15 дней	6,36	6,37	100	100
30 дней	6,35	6,34	100	100

Сравнение дорожек 4 и 5 (2-8°C) или дорожек 8 и 9 (36-38°C) на фиг.10 показывает, что OMV остаются адсорбированными после 1 месяца хранения.

**Пример 6 - адсорбция смесей менингококковых OMV и белковых антигенов**  
961с, G287<sub>nz</sub>-953 и 936-741 смешивали в количестве 100 мкг/мл каждого антигена и смесь адсорбировали на оксигидроксида алюминия (3 мг/мл) в присутствии 10 мМ гистидинового буфера, pH 6,3. В две дополнительные композиции включали OMV (50 мкг/мл) норвежского и новозеландского штаммов менингококка В.

Все антигены в трех смесях (фиг.6 и 7, дорожки 8-10) оказались на 100% адсорбированными после 4 недель хранения при 2-8°C или при 36-38°C, кроме 936-741, который был адсорбирован на ~96% во всех трех смесях при 2-8°C и адсорбирован на ~99% при 36-38°C. Уровень pH каждой из трех смесей немного возростал от 6,53 в нулевой точке до 6,62 после 4 недель при 2-8°C. При 36-38°C уровень pH трех смесей возростал до 6,71±0,02.

Отдельные антигены вносили остаточные фосфатные ионы в смесь из их собственного PBS. Фосфатные ионы иногда присутствовали в количестве 3 и 5 мМ в комбинированной смеси антигенов. В присутствии таких высоких концентраций остаточного фосфатного буфера оказалось трудно стабилизировать уровень pH в пределах 6,0-7,0, даже с 5 мМ гистидина. Однако, когда количество гистидина увеличивали до 10 мМ, pH стабилизировалось. Более того, антигены оставались адсорбированными даже после 1 месяца хранения при 2-8°C или при 36-38°C.

#### **Пример 7 - адсорбция сахаридного антигена менингококка А**

В ссылке 94 описаны конъюгаты CRM<sub>197</sub> капсулярного олигосахарида менингококка серогруппы А. Эти конъюгаты не являются полностью стабильными, и следовательно, их получают в лиофилизованной форме, готовой для разбавления концентрата во время введения. Лиофилизованную форму получают, имея компоненты, которые дают в одной дозе следующие композиции после разбавления концентрата:

Компонент	Концентрация
CRM-МенА	29 мкг сахараида/мл
Калиево-фосфатный буфер	5 мМ
Маннит	15 мг/мл

Данная композиция не содержит адъюванта, так что адъювант получают для разбавления его концентрата:

Компонент	Концентрация
Оксигидроксид алюминия	0,68 мг Al <sup>3+</sup> /мл
Гистидиновый буфер	10 мМ
Хлорид натрия	9 мг/мл
Tween 80	0,005%

pH	7,2±0,05
* - аморфный гидроксифосфат, молярное соотношение PO <sub>4</sub> /Al от 0,84 до 0,92.	

**Пример 8 - адсорбция сахаридных антигенов менингококка C, W135 и Y**

В ссылке 94 описаны конъюгаты CRM<sub>197</sub> капсулярных олигосахаридов менингококков серогрупп C, W135 и Y. Получали трехвалентную смесь трех конъюгатов, адсорбированную на адъюванте оксигидроксида алюминия (2 мг/мл) или адъюванте гидроксифосфата алюминия (0,6 мг/мл Al<sup>3+</sup>). Композиции двух трехвалентных смесей были следующие:

Компонент	Концентрация	Концентрация
Оксигидроксид алюминия	0,68 мг Al <sup>3+</sup> /мл	-
Гидроксифосфат алюминия*	-	0,6 мг Al <sup>3+</sup> /мл
CRM-MenC	20 мг сахараида/мл	20 мг сахараида/мл
CRM-MenY	20 мг сахараида/мл	20 мг сахараида/мл
CRM-MenW135	20 мг сахараида/мл	20 мг сахараида/мл
Натрий-фосфатный буфер	-	10 мМ
Гистидиновый буфер	10 мМ	-
Хлорид натрия	9 мг/мл	9 мг/мл
Tween 80	0,005%	0,005%

\* - аморфный гидроксифосфат, молярное соотношение PO<sub>4</sub>/Al от 0,84 до 0,92.

Для композиции оксигидроксида/гистидина стабильность сахаридных компонентов в сухой смеси или после упаковки во флаконы была следующая:

Время (дни)	Хранение при 2-8°C		Хранение при 36-38°C	
	Свободный сахарид (мкг/мл)	Свободный сахарид (%)	Свободный сахарид (мкг/мл)	Свободный сахарид (%)
MenC сухая смесь				
0	<1,2	<6	<1,2	<6
15	<1,2	<6	<1,2	<6
30	<1,2	<6	<1,2	<6
MenC флаконы				
0	<1,2	<6	<1,2	<6
15	<1,2	<6	<1,2	<6
30	<1,2	<6	1,3	6,6
MenW135 сухая смесь				
0	2,5	12,5	2,5	12,5
15	2,3	11,4	3,4	16,8
30	2,3	11,5	3,5	17,3
MenW135 флаконы				
0	2,1	10,6	2,1	10,6
15	2,3	11,7	2,7	13,3
30	20	10,2	3,3	16,3
MenY сухая смесь				
0	1,7	8,3	1,7	8,3
15	<1,3	<6,3	2,0	10,2
30	1,3	6,3	2,4	12,2
MenY флаконы				
0	1,4	7,1	1,4	7,1
15	1,5	7,6	2,1	10,7
30	1,3	6,3	2,9	14,3

Следовательно, уровни свободных сахаридов являлись стабильными в течение по меньшей мере 1 месяца при 2-8°C до и после упаковки.

В условиях термического стресса наблюдали небольшое увеличение свободных сахаридов с течением времени для MenW135 и MenY, а MenC оставались стабильными.

Через 30 дней уровень pH во флаконах и сухих смесях был стабильным 7,15±0,05 при обеих температурах хранения.

**Пример 9 - адсорбция сахаридных антигенов менингококка A, C, W135 и Y**

Две трехвалентные жидкие композиции примера 8 разбавляли, и 0,5 мл использовали для разведения концентрата лиофилизованного конъюгата MenA примера 7. Полученную

четырёхвалентную смесь вводили группе из десяти мышей линии Balb/c (самки, возраст 6-8 недель) путем подкожной инъекции в день 0 и 28. Смесь содержала 2 мкг каждого конъюгата сахара на дозу, что представляет собой 1/5 от однократной человеческой дозы (SHD). В качестве контроля использовали физиологический раствор или неконъюгированные гомологичные полисахариды. Образцы крови получали перед иммунизацией и затем на 42 день с хранением сыворотки при -70°C.

Все применяемые на животных конъюгаты были безопасными и иммуногенными. Титры GMT в исследовании методом иммуноферментного анализа (ELISA) (с 95% доверительным интервалом) были следующие:

Вакцина	Адьювант	A	Y	W135	C
MenA (лиофилизованная и ресуспендированная)	гидроксифосфат	172 (69-439)	-	-	-
	оксигидроксид	619 (419-906)	-	-	-
MenY	гидроксифосфат	-	328 (147-731)	-	-
	оксигидроксид	-	452 (344-593)	-	-
MenW	гидроксифосфат	-	-	80 (28-225)	-
	оксигидроксид	-	-	277 (185-411)	-
MenC	гидроксифосфат	-	-	-	317 (152-659)
	оксигидроксид	-	-	-	723 (615-851)
MenA (лиофилизованная) + MenC, W135, Y	гидроксифосфат	32 (15-68)	397 (252-627)	99 (35-288)	114 (53-246)
	оксигидроксид	206 (112-372)	141 (97-205)	139 (76-251)	163 (122-218)

Таким образом, титры, как правило, были выше в группах "оксигидроксид алюминия + гистидин". Бактерицидные титры сыворотки были также обычно лучше в группах "оксигидроксид алюминия + гистидин".

В параллельных экспериментах мышей иммунизировали, как описано выше, но вакцинные композиции содержали различные соотношения различных конъюгатов олигосахаридов. Во всех экспериментах использовали лиофилизированный олигоконъюгат MenA. Титры ELISA были следующие:

Количество антигена (мкг/доза)				Адьювант алюминия	GMT ELISA (95% доверительный интервал)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	гидрокси фосфат	177 (107-291)	367 (263-510)	239 (135-424)	239 (184-311)
4	2	2	2	окси гидроксид	390 (313-486)	494 (345-706)	338 (266-430)	158 (96-260)
2	2	2	2	гидрокси фосфат	132 (59-296)	582 (268-1155)	143 (75-272)	247 (153-400)
2	2	2	2	окси гидроксид	337 (239-476)	569 (462-679)	171 (117-251)	100 (59-169)

Вторую группу экспериментов проводили с применением дозы 2 мкг/мл сахара для MenA и MenC, половиной этой дозы для MenY и четвертью дозы для MenW135. Титры ELISA были следующие:

Количество антигена (мкг/доза)				Адьювант алюминия	GMT ELISA (95% доверительный интервал)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
2	2	2	2	гидроксифосфат	32 (15-68)	114 (53-246)	99 (35-288)	397 (252-627)
4	2	2	2		оксигидроксид	206 (112-372)	163 (122-218)	139 (76-251)
2	2	1	0,5	гидроксифосфат	96 (49-187)	238 (101-561)	42 (20-89)	315 (114-867)
2	2	2	2		оксигидроксид	293 (144-597)	267 (158-451)	83 (43-163)

Следовательно, по меньшей мере для серогрупп A, C и W135 композиция "оксигидроксид + гистидин" обычно давала лучшие титры, чем гидроксифосфат при данных различных соотношениях антигенов.

Очевидно, что данное изобретение описано только при помощи примеров, поэтому модификации в рамках объема данного изобретения вполне допустимы.



**ССЫЛКИ** (содержание которых включено в данное описание в качестве ссылок).

1. Vaccine Design: subunit & adjuvant approach (1995) Powell & Newman (ISBN: 030644867X).
2. Международная патентная заявка WO93/24148.
- 5 3. Международная патентная заявка WO97/00697.
4. Международная патентная заявка WO98/48525.
5. Burrell et al. (2000) Vaccine 18:2188-2192.
6. Burrell et al. (1999) Vaccine 17:2599-2603.
7. Corbel (1996) Dev Biol Stand 87:113-124.
- 10 8. Sturgess et al. (1999) Vaccine 17:1169-1178.
9. Международная патентная заявка WO99/24578.
10. Международная патентная заявка WO99/36544.
11. Международная патентная заявка WO99/57280.
12. Международная патентная заявка WO00/22430.
- 15 13. Tettelin et al. (2000) Science 287:1809-1815.
14. Международная патентная заявка WO96/29412.
15. Pizza et al. (2000) Science 287:1816-1820.
16. Международная патентная заявка WO01/52885.
17. Bjune et al. (1991) Lancet 338(8775):1093-1096.
- 20 18. Fukasawa et al. (1999) Vaccine 17:2951-2958.
19. Rosenqvist et al. (1998) Dev. Biol. Stand. 92:323-333.
20. Costantino et al. (1992) Vaccine 10:691-698.
21. Costantino et al. (1999) Vaccine 17:1251-1263.
22. Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
- 25 23. Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285, v.
24. Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
25. Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
26. Rappuoli et al. (1991) TIBTECH 9:232-238.
27. Vaccines (1998) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 30 28. Del Giudice et al. (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
29. Международная патентная заявка WO93/18150.
30. Международная патентная заявка WO99/53310.
31. Международная патентная заявка WO98/04702.
32. Международная патентная заявка WO02/02606.
- 35 33. Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389.
34. Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
35. Shirai et al. (2000) J. Infect. Dis. 181(Suppl 3): S524-S527.
36. Международная патентная заявка WO99/27105.
37. Международная патентная заявка WO00/27994.
- 40 38. Международная патентная заявка WO00/37494.
39. Международная патентная заявка WO99/28475.
40. Ross et al. (2001) Vaccine 19:4135-4142.
41. McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1: S101-107.
42. Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6.
- 45 43. Международная патентная заявка WO02/34771.
44. Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.
45. Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98:4658-4663.
46. Kuroda et al. (2001) Lancet 357 (9264):1225-1240; также см. стр. 1218-1219.
47. J. Toxicol Clin Toxicol (2001) 39:85-100.
- 50 48. Demicheli et al. (1998) Vaccine 16:880-884.
49. Stepanov et al. (1996) J Biotechnol 44:155-160.
50. Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
51. Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.

52. Gerlich et al. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 & 79-80.  
 53. Hsu et al. (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.  
 54. Sutter et al. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.  
 55. Zimmerman & Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.  
 56. Dreesen (1997) Vaccine 15 Suppl:S2-6.  
 57. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16; 47(1):12, 19.  
 58. Ingram (2001) Trends Neurosci 24:305-307.  
 59. Rosenberg (2001) Nature 411:380-384.  
 60. Moingeon (2001) Vaccine 19:1305-1326.  
 61. Ramsay et al. (2001) Lancet 357(9251):195-196.  
 62. Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.  
 63. Buttery & Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168.  
 64. Ahmad & Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.  
 65. Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567.  
 66. Европейский патент 0477508.  
 67. Патент США 5306492.  
 68. Международная патентная заявка WO98/42721.  
 69. Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) ISBN 3805549326, особенно vol. 10:48-114.  
 70. Hermanson (1996) Voiconjugate Techniques ISBN: 0123423368 или 012342335X.  
 71. Европейская патентная заявка 0372501.  
 72. Европейская патентная заявка 0378881.  
 73. Европейская патентная заявка 0427347.  
 74. Международная патентная заявка WO93/17712.  
 75. Международная патентная заявка WO98/58668.  
 76. Европейская патентная заявка 0471177.  
 77. Международная патентная заявка WO00/56360.  
 78. Международная патентная заявка WO00/61761.  
 79. Robinson & Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283.  
 80. Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648.  
 81. Scott-Taylor & Dalgleish (2000) Expert Opin Investig Drugs 9:471-480.  
 82. Apostolopoulos & Plebanski (2000) Curr Opin Mol Ther 2:441-447.  
 83. Ilan (1999) Curr Opin Mol Ther 1:116-120.  
 84. Dubensky et al. (2000) Mol Med 6:723-732.  
 85. Robinson & Pertmer (2000) Adv Virus Res 55:1-74.  
 86. Donnelly et al. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2):S190-193.  
 87. Davis (1999) Mt Sinai J Med 66:84-90.  
 88. Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20<sup>th</sup> edition, ISBN: 0683306472.  
 89. WO93/13202.  
 90. Международная патентная заявка WO01/64922.  
 91. Международная патентная заявка, поданная 26 июля 2002 г. патентным поверенным ссылки P027797WO на имя CHIRON SpA, заявляя приоритет патентных заявок Великобритании 0118401.9, 0121591.2 и 0211025.2.  
 92. Международная патентная заявка WO01/64920.  
 93. Патентная заявка Великобритании 0121591.2.  
 94. Международная патентная заявка, поданная 20 июня 2002 г. патентным поверенным ссылки P027504WO на имя CHIRON SpA, заявляя приоритет патентной заявки Великобритании 0115176.0.

50

## Формула изобретения

1. Способ получения композиции, содержащей антиген, соль алюминия и гистидин, в соответствии с которым стадия смешивания включает в себя первую стадию смешивания (i) соли алюминия и (ii) гистидина с получением смеси гистидина/соли алюминия и

вторую стадию смешивания (i) указанной смеси гистидина/соли алюминия и (ii) одного или более антигенов.

2. Способ по п.1, согласно которому антиген является белковым антигеном или сахаридным антигеном.

5 3. Способ по п.1 или 2, согласно которому антиген является бактериальным антигеном, выбранным из группы, состоящей из  
белкового антигена из *N. Meningitidis*,  
препарата везикул наружной мембраны (OMV) из *N. Meningitidis*,  
сахаридного антигена из *N. Meningitides*.

10 4. Способ по п.3, согласно которому антиген получен из *Neisseria meningitidis* серогруппы В.

5. Способ по п.2 или 3, согласно которому сахаридный антиген является конъюгированным сахаридным антигеном.

15 6. Способ по п.5, согласно которому белковый антиген замещен нуклеиновой кислотой, кодирующей белок.

7. Способ по п.6, согласно которому антиген адсорбирован на соли алюминия.

8. Способ по п.7, согласно которому соль алюминия является гидроксидом, или фосфатом, или смесью двух или более из указанных солей.

20 9. Способ по п.8, согласно которому соль алюминия является гидроксифосфатом алюминия, а антиген является кислым антигеном.

10. Способ по п.1, согласно которому концентрация гистидина в композиции составляет от 1 до 100 мМ.

11. Способ по п.10, согласно которому концентрация гистидина составляет приблизительно от 5 до 10 мМ.

25 12. Способ по п.1, согласно которому композиция дополнительно содержит соль натрия.

13. Способ по п.12, согласно которому концентрация соли натрия составляет приблизительно от 2,5 до 5 мМ.

14. Способ по п.1, согласно которому рН композиции составляет от 6 до 7.

30 15. Способ по п.1, согласно которому композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ по п.1, согласно которому композиция дополнительно содержит более одного антигена.

17. Способ по п.16, согласно которому более одного антигена адсорбировано на соли алюминия.

35 18. Способ по п.16 или 17, согласно которому композиция содержит 2, 3, 4, 5, 6 или 7 [компонентов] из следующего: антиген из *Bordetella pertussis*; дифтерийный антиген; столбнячный антиген; антиген из вируса гепатита В; сахаридный антиген из *Haemophilus influenzae*; инактивированный полиовирус и сахаридный антиген из *N. meningitidis* серогруппы С.

40 19. Композиция, содержащая антиген, соль алюминия и гистидин, полученная способом по любому из пп.1-18, согласно которому антиген является бактериальным антигеном, выбранным из группы, состоящей из

белкового антигена из *N. Meningitides*,

препарата везикул наружной мембраны (OMV) из *N. Meningitides*,

45 сахаридного антигена из *N. Meningitides*.

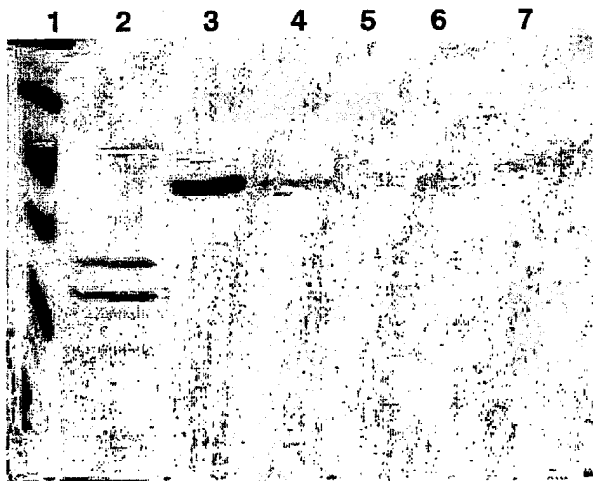
20. Композиция по п.19, предназначенная для использования в качестве лекарственного средства.

21. Композиция по п.20, где лекарственное средство представляет собой вакцину.

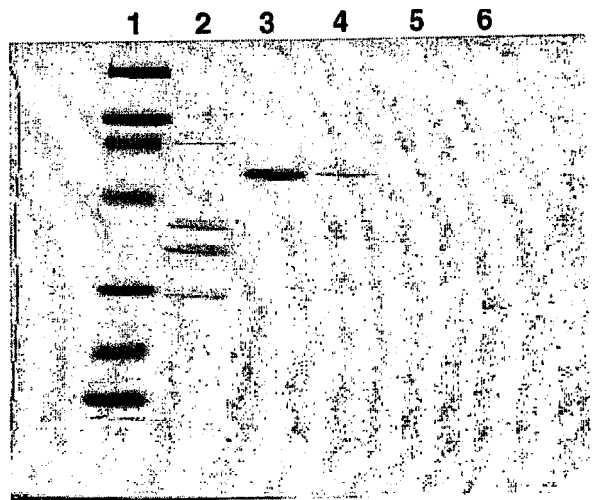
50 22. Применение композиции по п.19 в производстве лекарственного средства для повышения у млекопитающего иммунного ответа против антигена (антигенов).

23. Применение по п.22, где лекарственное средство представляет собой вакцину.

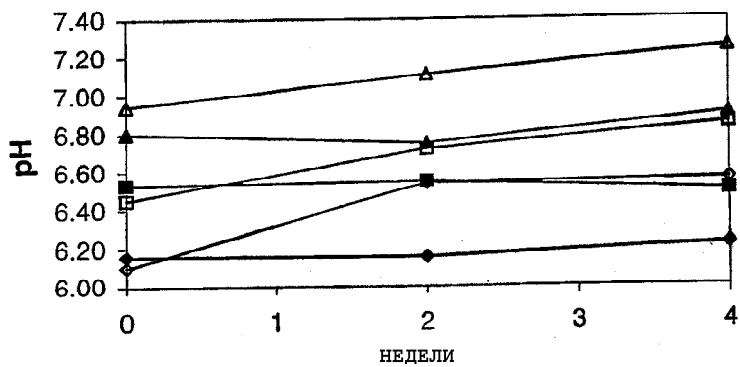
24. Применение по п.22, где млекопитающим является человек.



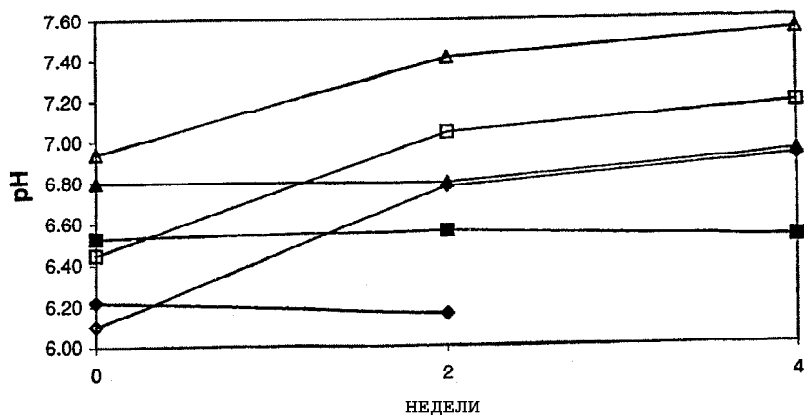
ФИГ. 2



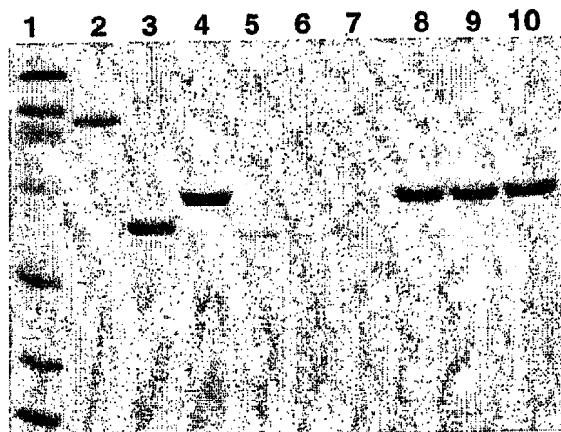
ФИГ. 3



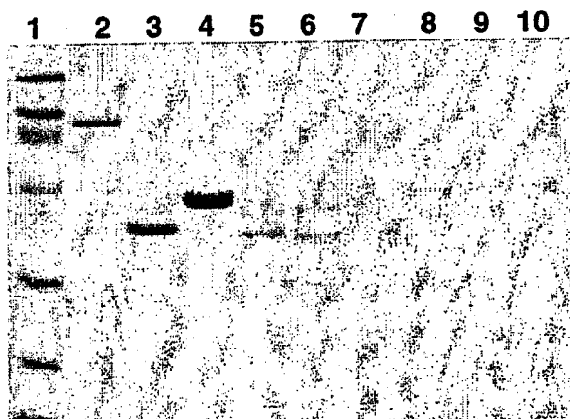
ФИГ. 4



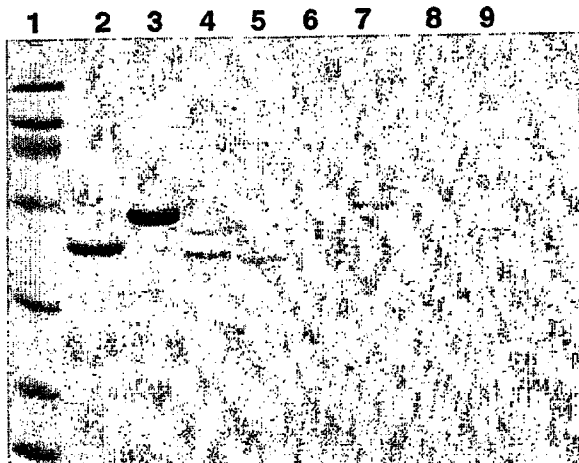
ФИГ. 5



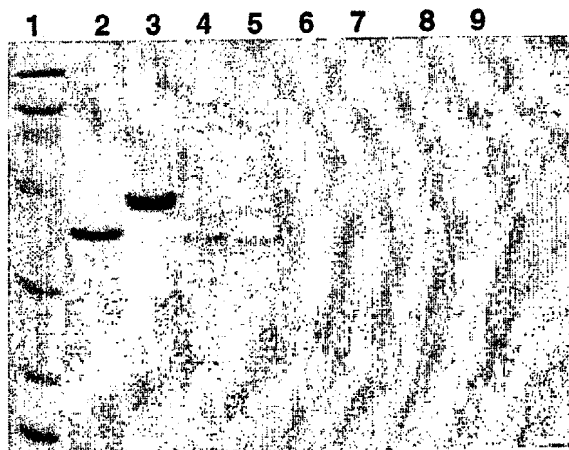
ФИГ. 6



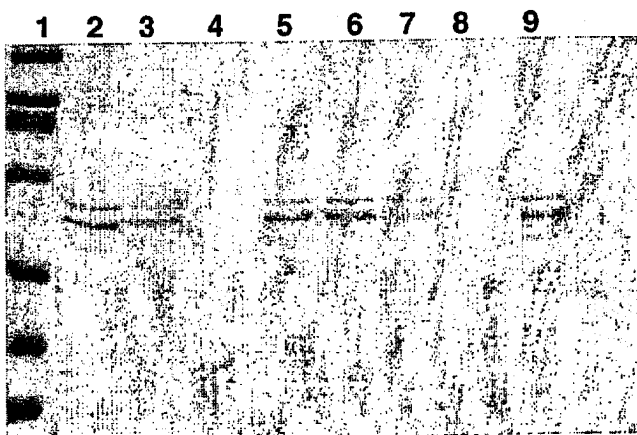
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10