

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035921

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.31

(21) Номер заявки
201800108

(22) Дата подачи заявки
2016.07.15

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)
C12N 7/06 (2006.01)

(54) ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ АРБОВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ

(31) 3652/CHE/2015

(32) 2015.07.16

(33) IN

(43) 2018.08.31

(86) PCT/IN2016/050241

(87) WO 2017/009873 2017.01.19

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БХАРАТ БАЙОТЕК ИНТЕРНЭШНЛ
ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
Суматхи Кандасвами, Элла Кришна
Муртхи (IN)

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(56) WO-A2-2008026225
WO-A1-2012172574
WO-A1-2009082002

(57) Изобретение предусматривает вакцинные композиции для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика, содержащие антигены вируса Зика в иммуногенных композициях и в комбинации антигенов Зика с одним или несколькими антигенами арбовируса, такими как антигены вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, способы получения и производства таких композиций для применения в качестве вакцины для индуцирования иммунного ответа у млекопитающих против указанных выше патогенов.

035921

B1

035921

B1

Область изобретения

Изобретение раскрывает вакцинные композиции содержащие антигены вируса Зика для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика у млекопитающих. Изобретение также раскрывает стабильные вакцинные композиции, содержащие антигены вируса Зика с одним или несколькими антигенами арбовируса, такими как вирусные агенты Чикунгунья и/или японского энцефалита. Настоящее изобретение также касается способов получения, формулирования и применения данного средства для одновременно вызывания иммунного ответа к каждому из указанных выше патогенов у млекопитающих и приемлемого для иммунизации субъектов-людей.

Предпосылки создания изобретения

В настоящее время в мире не существует доступной вакцины для профилактики или лечения против вирусных инфекций Зика. Таким образом, не существует никаких данных из предыдущего уровня техники, релевантных изобретению, раскрытому в данной заявке. Однако для общего понимания предпосылки и задачи, лежащие в основе данного изобретения, обсуждаются далее в данном документе в параграфах ниже.

Авторы изобретения данной патентной заявки предусматривали эпидемический потенциал вируса Зика в регионах с высокой распространенностью комаров *Aedes*, в частности *Aedes aegypti*, передающих вирус. Интерес к иницированию проекта вакцины Зика на ранней стадии, за несколько месяцев до того, как причинная связь вирусной инфекции Зика с синдромом Гиелла Берра и микроцефалией стала общедоступной в декабре 2015 г., заключалась в том, что ни в одной стране мира не было ни готовности, ни мероприятий, иницированных кем-либо в то время для разработки вакцины, чтобы остановить продолжающуюся передачу вируса в таких странах, как Бразилия, и предотвратить дальнейшую передачу в странах, находящихся под угрозой вируса Зика. Увеличение международных поездок в регионы и из регионов, из которых продолжается передача вируса, создает серьезный риск начала вспышки заболевания в странах с высокой распространенностью комаров *Aedes*, в частности *Ae. aegypti*, и тех, которые имеют большое наивное население, которое не подвергалось воздействию вируса. Клиническая картина вирусной инфекции Зика на ранних стадиях с характерной высокой температурой, макулопапулярной сыпью и артралгией удивительно похожа на ранние симптомы вирусных инфекций Чикунгунья и денге, что делает дифференциальную диагностику особенно сложной.

Проект вакцины против вируса Зика был иницирован в то время, когда было очень мало или не было никакой информации о вирусном патогенезе, генетическом разнообразии, передаче, диагностике, серологических коррелятах для защиты или модели животных для исследования концепций вакцины. С точки зрения вакцины, отсутствовали сведения о возможности культивирования вируса *in vitro* на клеточных субстратах, и если возможно, то какие клеточные субстраты наиболее приемлемы, механизм адаптации к клеткам, потенциальные титры вирусов и возможность осуществления производства вакцинного продукта для введения человеку, так как опубликованная информация в то время касалась прохождения вируса в мозг мыши, что не приемлемо для производства вакцины. В конце 2014 г. Bharat Bio-tech сделал шаги для запуска проекта вакцины Зика, и вскоре после этого начал экспериментальную работу, которая в результате привела к заявленной патентной заявке.

Инфекции арбовируса (распространяющиеся членистоногими) вызваны вирусами, которые распространяются членистоногими, такими как комары. Они вызывают значительные заболевания человека, начиная от мягкой, бессимптомной инфекции до острого энцефалита или геморрагической лихорадки, которые могут оказаться фатальными. Наиболее значимые арбовирусы, вызывающие заболевание человека, принадлежат к трем вирусным семействам, *Togaviridae*, *Flaviviridae* и *Bunyaviridae*. Арбовирусные инфекции являются "буйными" в развивающихся странах и вызывают серьезную заболеваемость особенно у пожилых людей. Общей характерной особенностью арбовирусных инфекций, вызванной вирусами денге, Чикунгунья, Зикой, японским энцефалитом и Западного Нила, среди других, является лихорадка, головная боль, миалгия, боли в суставах с отеком и макулопапулярная сыпь во время острой фазы вирусной инфекции. Артралгия является особенно характерным признаком для лихорадки вируса Чикунгунья, денге и Зика. Коинфекции являются общими, поскольку арбовирусы в основном распространяются одинаковыми комарами-переносчиками, такими как, например, вирусы денге, Чикунгунья и Зика, которые передаются комарами *Aedes*. Вирус японского энцефалита и вирусы Западного Нила передаются преимущественно комарами *Culex*. Проблема остро стоит в развивающихся странах, где программы борьбы с комарами-переносчиками были неэффективными и в основном неудачными. Проблема осложняется тем, что не существует надежных способов диагностики для диагностики заболевания, вызываемого вирусами с уверенностью. Международные путешествия способствовали широкому распространению данных инфекционных агентов, и заболевания, такие как денге и Чикунгунья, которые до сих пор ограничивались только тропическими странами, теперь распространяются географически на новые районы и в регион с умеренным климатом. Как сообщается, вирус Зика распространился на более чем 65 стран за последние два года. Профилактика аутохтонных эпидемий, о которых сообщают в нескольких странах в данных регионах, поддерживается местной популяцией комаров-переносчиков.

Вирус Зика (ZIKV) представляет собой возникающий зоонозный арбовирус, который относится к семейству *Flaviviridae*. Подобно вирусам денге и Чикунгунья, вирус Зика также может передаваться ко-

марами *Aedes*, в частности *A. fuscifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus*, *A. albopictus* и преимущественно *A. aegypti*. Туристические поездки в страны, где сообщалось о недавних эпидемиях, такие как Полинезия, способствовали географическому распространению вирусной инфекции в Бразилию, Колумбию, Италию и другие страны. Сообщалось о аутохтонных вспышках вируса в Италии, вызванных локализованными комарами *Aedes*. В Азии вирусная инфекция Зика наблюдалась эпизодически в Камбодже, Таиланде, Индонезии, Малайзии и Бангладеш, хотя в данных регионах не сообщалось о больших эпидемических вспышках.

Вирус Чикунгунья (CHIKV) представляет собой Alpha вирус семейства *Togaviridae*. Вирус вызывает самоограничивающую фебрильную инфекцию, которая характеризуется острым началом с высокой температурой, головной болью, миалгией, артралгией, отеками суставов и макулопапулярной сыпью. Сильные симптомы, такие как геморрагия, фульминантный гепатит и неврологические симптомы, были зарегистрированы в последних эпидемиях. Вирус Чикунгунья передается как комарами *Aedes aegypti*, так и *Aedes albopictus*.

Вирус японского энцефалита (JEV) также представляет собой флавивирус семейства *Flaviviridae* и передается преимущественно комарами *Culex*. JEV связан с денге, вирусом желтой лихорадки, вирусами Зика и Западного Нила. Инфекция JEV является очень бессимптомной, но в целом она вызывает недомогание с лихорадкой, головной болью и другими гриппоподобными симптомами. Редко клиническая инфекция развивается до энцефалита с приступами, спастическим параличом, комой и смертью. Дети особенно чувствительны. В странах, эндемических для JEV, большинство взрослых имеют естественный иммунитет после детской инфекции. Взрослые, которые не подвергались инфекции в детстве, чувствительны в любом возрасте. Частота смертности от JEV, вызванная энцефалитом, может составлять до 30%. Неврологические осложнения или психиатрические симптомы возникают в большинстве случаев с энцефалитом. Во всем мире примерно 3 миллиарда населения находится под угрозой заражения JEV. Несколько вакцин для профилактики инфекции JEV были успешно проданы.

Вирус денге (DENV) является членом семейства *Flaviviridae*. Арбовирусная инфекция больше не может рассматриваться как специфическая для региона, поскольку сейчас она широко географически распространена и является значительной проблемой общественного здоровья во многих частях мира. Заболеваемость, вызванная упомянутыми выше арбовирусными инфекциями, обычно высокая, и артралгия, в частности, неблагоприятно влияет на физическую мобильность пациентов. Вирус Зика вызывает более серьезные врожденные деформации при рождении, во время инфицирования, во время беременности, и Зика, связанные с синдромом Гиелла Берра, были подтверждены в текущих эпидемиях. Как и любые другие вирусные инфекции, не существует специальных терапевтических средств. Профилактическая вакцинация может эффективно прерывать передачу вируса Зика, и вакцина будет фронтом защиты от вирусного заболевания Зика.

Учитывая это, была разработана эффективная стратегия предотвращения дальнейшей передачи вируса Зика для защиты наивного населения в странах, где наблюдается эпидемия, и в странах, где еще не было сообщено об активной передаче вируса Зика. Комбинированная вакцина для арбовирусных инфекций представляет собой хорошую стратегию защиты уязвимых групп населения от изнурительных заболеваний, вызванных денге, Чикунгунья, Зика, японским энцефалитом, вирусами Западного Нила и желтой лихорадки. Вакцины для JEV, желтой лихорадки и одного из серотипов денге есть в продаже, и вакцины для Западного Нила и CHIKV находятся в клинической разработке. Пока не существует вакцины для вирусной инфекции Зика, и в данном изобретении раскрываются способы разработки первой вакцины кандидата Зика.

Однако выбор антигенов для включения в такой комплект вакцины зависит от нескольких факторов. Зависящее от антитела усиление вируса, вызванное серотипами лихорадки денге, хорошо исследуемо и опубликовано, также кросс-реактивность флавивирусных антител. Но непонятно то, как такая интерференция или перекрестная реактивность распространенности антител Чикунгунья в одной и той же популяции подверглась экспозиции вируса Зика. Аналогичным образом не было известно, могут ли антитела к вирусу японского энцефалита вызвать антигенные вмешательства в развитие иммунитета к вирусу Зика, было интересно думать о том, что они также изучаются. Предлагаемая работа также дает представление о любой возможной иммунной интерференции, вызванной распространенными антителами JE и CHIKV к вакцине кандидату Зика.

В данном изобретении вакцины с вирусом кандидата Зика были разработаны и испытаны относительно эффективности с использованием различных композиций для обнаружения соответствующего уровня иммунного ответа для защиты от вирусного заболевания Зика. Поскольку отсутствие значительной антигенной интерференции к Зика, вызванной иммунной реакцией вакцины против вируса японского энцефалита и вакцины против вируса Чикунгунья при одновременном введении или в комбинации в качестве комбинированной вакцины, препараты были эффективными для выявления высокого уровня нейтрализующих антител, способных обеспечить защиту против каждого из вирусов.

Задачи изобретения

Одна из задач изобретения заключается в обеспечении стабильных иммуногенных композиций для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика.

Другая задача изобретения заключается в обеспечении способов адаптации и роста вируса Зика в клетках Vero.

Иная задача изобретения заключается в обеспечении способов получения инактивированной вакцины против вируса Зика и очистки вирусного объемного антигена Зика.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов инактивации вируса Зика химическими средствами с формалином, β -пропиолактоном и пероксидом водорода.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов инактивации вируса Зика физическими средствами, такими как нагревание, γ -излучение и ультрафиолетовое излучение.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов получения и формулирования рекомбинантных вирусных антигенов Зика, включающих протеин ргМЕ, и исследования относительно иммуногенности у животных.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении способов формулирования антигенов вируса Зика с различными адъювантами и оценке иммунного ответа на композиции у животных.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении кинетики иммунного ответа на однократную дозу, две и три дозы формалина и BPL инактивированной вакцины против вируса Зика у животных.

Еще одна задача изобретения заключается в обеспечении иммуногенных композиций для профилактики вирусных инфекций Зика и Чикунгунья.

Другая задача изобретения заключается в обеспечении иммуногенных композиций для профилактики вирусных инфекций Зика, Чикунгунья и японского энцефалита.

Сущность изобретения

Представленное изобретение касается композиций и способов изготовления вакцинных композиций для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика, а также инфекций, вызванных другими арбовирусами, такими как вирус Чикунгунья и вирус японского энцефалита.

В одном аспекте изобретение касается вакцинных композиций для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика, где указанные композиции содержат антигены вируса Зика в иммуногенных композициях и также могут содержать один или более антигенов арбовируса, такого как вирус Чикунгунья и антигены вируса японского энцефалита, вместе с приемлемыми адъювантами и эксципиентами. В другом аспекте изобретение касается способа получения вакцинных композиций согласно процессу, который включает:

(a) применение клеточной линии Vero в качестве клеточного субстрата для культивирования вируса Зика,

(b) масштабирование культивирования вируса Зика вплоть до объема сбора клеток 10 л,

(c) инактивирование вирусной культуры,

(d) очистка вирусной культуры,

(e) в другом аспекте рекомбинантное клонирование и экспрессирование протеина рRME вируса Зика.

В одном варианте осуществления изобретения клеточную линию Vero использовали в качестве клеточного субстрата для культивирования вируса Зика и выращивали в культуральной среде с или без применения сыворотки. В другом варианте осуществления изобретения вирус Зика был адаптирован путем повторного серийного пассажа в клетках Vero для получения более высоких титров.

В другом варианте осуществления изобретения вирус Зика был пассирован в клетки C6/36 Ae. Al-borictus с последующим ростом в клетках Vero для увеличения титра.

В другом варианте осуществления изобретения раскрыты способы масштабирования вирусной культуры и последующей очистки масштабируемых вирусных культур, причем объем сбора клеток составлял примерно 8-10 л. Собранные вирусные клетки были инактивированы с использованием различных способов. Вирус затем чистили.

В другом варианте осуществления изобретения способ инактивации выбирают из группы инактивации формалином, инактивации β -пропиолактоном (BPL), инактивации нагреванием, инактивации УФ, γ -инактивации, в присутствии или при отсутствии стабилизирующих агентов и аминокислот. В предпочтительном варианте осуществления изобретения аминокислоты были отобраны индивидуально или в комбинации из группы L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-глицина и L-аспарагиновой кислоты и L-глутамина и альбумина сыворотки человека.

В другом предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, способ очистки выбирают с помощью использования целюфинсульфата, DEAE-сефадекса CM-сефадекса с градиентом соли, с использованием гель-фильтрации на Sartocore-700, Sepharose CL-4B, керамической гидроксипатитной колонки с градиентом от 0,2 до 0,8М фосфата, с последующей диафильтрацией и ультрацентрифугированием на 20-60% градиента сахарозы, наиболее предпочтительно с использованием колонки Capto core 700.

Другой вариант осуществления изобретения касается рекомбинантного клонирования, и предполагается экспрессия протеина рRME вируса Зика. Способ рекомбинантного клонирования использует сайт-специфическую транспозицию экспрессионной кассеты с клонированными вставками в бакуловирусный шаттл-вектор, который распространяется в E.coli и экспрессируется в клетках насекомых. В другом ва-

рианте осуществления изобретения предусмотрены вакцинные композиции. Вакцина может содержать один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вирусов японского энцефалита. В другом варианте осуществления адъюванты могут быть выбраны из группы из алюминиевых солей, инулина, альгамулина, комбинации из инулина и гидроксида алюминия, монофосфориллипида A (MPL), резиквимоида, мурамилдипептида (MDP), N-гликолилдипептида (GMDP), поли-IC, CpG олигонуклеотида, резиквимода, гидроксида алюминия с MPL, любой эмульсии вода-в-масле, любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги, или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбитана триолеат, α -токоферол, холекальциферол или любой из аналогов и производных их молекул или фосфата кальция или любой комбинации адъювантов.

В другом варианте осуществления изобретения композиции получают с эксципиентами и консервантами.

В другом варианте осуществления изобретения стабилизирующие агенты в вакцинных препаратах использовались индивидуально или в комбинациях с сорбитом, L-глицином, маннитом, L-глутаминовой кислотой и альбумином сыворотки человека, в различных концентрациях использовались для исследования вакцинного препарата.

В другом варианте осуществления изобретения эффективность вакцинных композиций исследовалась в моделях на животных, для демонстрации полной защиты от вирусемии в широком диапазоне дозирования.

В другом варианте осуществления изобретения комбинированные вакцинные композиции были также эффективными для обеспечения адекватной защиты против японского энцефалита, а также вирусов Чикунгунья.

В другом варианте осуществления изобретения антисыворотка предоставляет пассивный иммунитет у кролика против инфекции вируса Зика, для обеспечения полной защиты от вирусемии, тогда как вирусемия была детектирована у контролируемых животных, которая персистировала вплоть до 6 дней после обнаружения вируса.

В другом варианте осуществления изобретения вакцина с кандидатным инактивированным вирусом Зика может вводиться или однократно, или двумя или более дозами внутримышечным способом.

В другом варианте осуществления изобретения анализы по нейтрализации титров антител проводили для проверки уровней антитела по отношению к вакцинным композициям по представленному изобретению, которые, как показано, вызывают высокий уровень нейтрализующих антител.

В другом варианте осуществления изобретения исследования кросс-нейтрализации демонстрировали, что инактивированные вакцинные композиции по представленному изобретению были бы одинаково защитными и эффективными против любого штамма вируса Зика.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения титры антител как для BPL инактивированных, так и инактивированных формалином Зика вакцинных композиций были выше с гидроксидом алюминия, чем с антигеном самостоятельно.

В другом варианте осуществления изобретения качество ответа антител к вакцинной композиции по представленному изобретению с помощью анализов avidности антител показало, что антитела с высокой аффинностью были разработаны в течение времени с повторными иммунизациями.

Соответственно, изобретение обеспечивает стабильную вакцинную композицию, содержащую один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, причем указанные антигены формулируются с или без адъюванта в фармацевтически приемлемом буфере, где вакцинная композиция вызывает защитный иммунный ответ к каждому из вирусов у млекопитающих. Вирусный антиген Зика композиции является эффективным для лечения, диагностики и профилактики по отношению к любому генотипу/генотипным вариантам/штаммам вируса Зика, причем композиция является эффективной против любого генотипа/генотипных вариантов/штаммов/синтетических вирусов Зика, которые распространяются где-либо от 50 до 100% идентичности на аминокислотном уровне в любом участке генома. Композиция по изобретению содержит антигены вируса Зика любого генотипа/генотипического варианта/штаммов/синтетического вируса Зика, причем антитела против любого из указанных выше типов вируса Зика перекрестно нейтрализуют гомологический вирус или любой гетерологичный штамм вируса Зика, которые распространяются по меньшей мере по 50-100% аминокислотной идентичностью в любой области всего его генома, в частности протеина оболочки E.

Антигены вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита композиции инактивированы целыми вирионными (вирусными) антигенами. В свою очередь, антигены вируса Зика и Чикунгунья представляют собой очищенные рекомбинантные антигены.

Вирусный антиген Зика по изобретению получают с использованием клеток Vero в качестве клеточного субстрата путем адаптации вируса к клеткам Vero.

Вирусный антиген Зика композиции по изобретению представляет собой очищенный и концентрированный антиген, полученный по одному или нескольким способам, выбранными из

а) ультрацентрифугирования;

- b) центрифугирования по градиенту плотности;
- c) осветления собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации, с последующей очисткой с использованием колоночной хроматографии; и
- d) тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 до 300 кДа, причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед, или после инактивации вируса.

При этом очистка с использованием колоночной хроматографии включает гель-фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, ионообменную колоночную хроматографию, аффинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями. Колоночная хроматография элюирует предпочтительное большинство вирусного антигена в потоке, таком как Capto Core 700, наиболее предпочтительно Capto Core 700, где образец вируса очищен на Capto Core 700 колонке и является элюированным в потоке.

Вирус Зика композиции инаktivирован по меньшей мере одним или несколькими из химического инаktivирующего агента, физического инаktivирующего агента и облучающего агента, где инаktivация вируса Зика осуществляют перед или после очистки вируса. В иллюстративном варианте осуществления вирус Зика инаktivирован с использованием химического инаktivирующего агента, выбранного из формалина (формальдегида), β -пропиолактона (BPL) и пероксида водорода.

В одном предпочтительном варианте осуществления вирус Зика инаktivирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из

- a) обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус, при от 8 до 37°C, предпочтительно 25±3°C, в течение по меньшей мере от 1 до 7 дней;
- b) обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус, при от 2 до 8°C в течение по меньшей мере от 10 до 30 дней;
- c) β -пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. BPL:вирус, в течение по меньшей мере от 24 до 48 ч при температурах, которые находятся в диапазоне от 8 до 30°C, предпочтительно 25±3°C, в течение 48 ч;
- d) β -пропиолактона при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 (BPL:вирус, об./об.), при от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 3-7 дней;
- e) комбинации из BPL и формалина при любых из указанных выше условий, предпочтительно инаktivация BPL при 1:3000 (BPL:вирус, об./об.) в течение 24 ч с последующей инаktivацией формалином при 1:3000 (формалин:вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 ч при от 15 до 30°C, предпочтительно 25±3°C;
- f) пероксида водорода при любой концентрации от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30°C в течение от 5 до 120 мин.

В одном варианте осуществления инаktivация вируса Зика с использованием облучающего агента включает инаktivацию γ -облучением путем экспозиции от 20 кГр вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 до 30 кГр из ^{60}Co источника.

В другом варианте осуществления инаktivация вируса Зика с использованием облучающего агента включает инаktivацию облучением УФ путем экспозиции до 254 нм в течение 30-60 мин.

В следующем варианте осуществления вирус Зика инаktivирован путем термической обработки при температуре от 50 до 65°C в течение от 30 мин до 2 ч.

Буфер, используемый в данном изобретении, может быть выбран из списка, включающего фосфатный буфер, цитратный буфер, фосфатно-цитратный буфер, боратный буфер, буфер, содержащий три(гидроксиметил)аминометан (Tris), сукцинатный буфер, буферы, содержащие глицин или гистидин, в качестве одного из буферирующих агентов, где фосфатный буфер представляет собой натрий-фосфатный буфер при концентрации от 5 мМ вплоть до 200 мМ фосфатных ионов с любым pH от 6,50 до 9, и необязательно содержащие натрия хлорид при концентрации от 50 до 200 мМ. Буфер поддерживает pH в жидкой композиции выше 6,5, предпочтительно выше 7,0 в течение всего биологического процесса от вирусной культуры до получения очищенного инаktivированного вируса.

В одном варианте осуществления инаktivацию вируса Зика осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, не ограничиваясь этим, изомальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций. Однако в одном предпочтительном варианте осуществления стабилизирующий агент может быть выбран из

- a) 2% сорбита и 1% L-глицина;
- b) 1% сорбита и 0,5% L-глицина;
- c) 1% маннита и 0,5% L-глицина;
- d) 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты и
- e) 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.

В иллюстративном варианте осуществления инаktivация вируса Зика включает инаktivацию любого

генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц, несущих любые антигены вируса Зика, в частности протеин Е в любом гетерологическом вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo*, используя последовательность любого генома вируса Зика.

Очищенный рекомбинантный вирус Зика по изобретению содержит антигены вируса Зика, содержащие протеин оболочки (Е), мембранный (М) протеин и необязательно неструктурный 1 (NS1) протеин в качестве вакцинных антигенов для индуцирования иммунного ответа для профилактики вирусных инфекций Зика, причем вирус Зика имеет структурные протеиновые последовательности, как раскрыто в SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4, что соответствует нуклеотидной последовательности SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2 соответственно, для применения в качестве вакцинных антигенов против вирусных инфекций Зика, вызванных генотипами или их вариантами. Рекомбинантные ДНК конструкторы содержат (i) вектор, (ii) по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, соответствующей SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2, кодирующий аминокислотную последовательность протеинов SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4 соответственно, который является применяемым к любой протеиновой последовательности вируса Зика, которая имеет по меньшей мере 70% аминокислотную идентичность с указанными выше SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4. Композиция по изобретению содержит рекомбинантный ДНК конструктор, причем вектор представляет собой эукариотический плазмидный вектор, который является клонированным в эукариотическом хозяине, таком как бакуловirus для экспрессии в клетках насекомых как вирусоподобных частицах (VLP).

Рекомбинантный протеин вируса Зика получают способом, включающим следующие стадии:

- a) трансфекция рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;
- b) сбор клеток и выделение рекомбинантного протеина из них;
- c) очистка протеина способом, выбранным из ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, аффинной хроматографии, гидрофобной колоночной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом смол, диафильтрации, ультрацентрифугирования, центрифугирования по градиенту плотности и фракционирования с солью.

Структурные антигены вируса Зика экспрессируются в любой прокариотической или эукариотической системе экспрессирования, включающей экспрессию, опосредованную бакуловirusом в клетках насекомых.

Вакцинная композиция по изобретению получается способом, в котором нейтрализующие антитела в значительной степени индуцированы против протеина оболочки, такого как оптимально инактивированный вирус, живой ослабленный вирус, дезактивированный вирус, ДНК вакцина, вирусоподобные частицы, химерные вирусные частицы, показывающие протеин Е вируса Зика в любом гетерологическом вирусном скелете, таком как в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.

Вакцинная композиция по изобретению может дополнительно содержать адъювант, причем адъювант выбран из группы, состоящей из a) солей алюминия, содержащих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию инулина и алюминия гидроксида; d) монофосфорилипид А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) алюминия гидроксида с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, α -токоферол, холекальциферол и водный буфер или любой из аналогов и производных их молекул; i) двух или более комбинаций любого из указанных выше адъювантов, когда они формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. В одном предпочтительном варианте осуществления композиция содержит гидроксид алюминия в концентрации в диапазоне от 0,1 до 1,5 мг алюминия на дозу вакцины, предпочтительно от 0,25 до 0,5 мг алюминия на дозу вакцины.

Адъювант композиции по изобретению обеспечивает мукозный иммунитет и системный иммунитет при введении млекопитающим.

Вакцинная композиция с антигеном вируса Зика вводится в любой дозе, которая находится в диапазоне от 0,125 до 100 мкг на дозу с или без адъюванта, либо в виде однократной дозы или двух или более доз для индуцирования иммунного ответа у млекопитающего.

В одном варианте осуществления изобретение предусматривает способ индуцирования защитного иммунного ответа у млекопитающих, включая людей, включающий введение вакцинной композиции по п.1 любым способом, который включает внутримышечный, интрадермальный, подкожный, внутривенный, пероральный, интраназальный или транскутанный способы введения.

Композиция по изобретению может вводиться любым способом, включающим иглы и шприцы, включая предварительно заполненные шприцы, микроигольный пластырь, безыгольный пластырь, ингаляционные и назальные спреи.

Изобретение также предусматривает способ *in vitro* или *in vivo* применения антител вируса Зика композиции для приготовления иммунодиагностических и иммунотерапевтических агентов для вирус-

ных инфекций Зика.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция содержит вирус Зика и антигены вируса японского энцефалита в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов, причем вирусный антиген Зика и инаktivированные антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине при концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемом препарате без адьюванта или с адьювантом.

Адьювант может быть выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, содержащих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, α -токоферол, холекальциферол и водный буфер или любой из аналогов и производных их молекул; i) двух или более комбинаций любого из указанных выше адьювантов, когда они формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. В одном предпочтительном варианте осуществления адьювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,0 мг на вакцинную дозу.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вирус Зика и антигены вируса Чикунгунья в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов, причем антигены вируса Зика и Чикунгунья присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемом препарате без адьюванта или с адьювантом.

Адьювант может быть выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, α -токоферол, холекальциферол и водный буфер или любой из аналогов и производных их молекул; i) двух или более комбинаций из любого из указанных выше адьювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. В одном предпочтительном варианте осуществления адьювант представляет собой гидроксид алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,5 мг на вакцинную дозу.

В другом варианте осуществления вакцинная композиция содержит вирус Зика, вирус Чикунгунья и антигены вируса японского энцефалита в комбинированной вакцине, вызывающей защитный иммунный ответ у млекопитающих против каждого из вирусов, причем вирус Зика, вирус Чикунгунья и антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине при концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемом препарате без адьюванта или с адьювантом.

Адьювант может быть выбран из группы, состоящей из а) солей алюминия, включающих гидроксид алюминия, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат; b) инулина; c) альгамулина, представляющего собой комбинацию из инулина и гидроксида алюминия; d) монофосфориллипида А (MPL); e) резиквимода; f) мурамилдипептида (MDP); g) N-гликолилдипептида (GMDP); h) поли-IC; i) CpG олигонуклеотида; j) гидроксида алюминия с MPL; k) любой эмульсии вода-в-масле; l) любой эмульсии масло-в-воде, содержащей один или несколько из следующих компонентов: сквален или его аналоги или любое фармацевтически приемлемое масло, твин-80, сорбиантриолеат, α -токоферол, холекальциферол и водный буфер, или любой из аналогов и производных их молекул; i) двух или более комбинаций из любого из указанных выше адьювантов, когда формулируются с антигенами вируса Зика, вызывает иммунный ответ против вируса. Предпочтительно адьювант представляет собой алюминия гидроксид с содержанием алюминия от 0,25 до 1,0 мг на вакцинную дозу.

Вакцинная композиция по изобретению необязательно содержит 2-феноксиэтанольный консервант в концентрации от 2,5 до 5 мг/мл.

Вакцинная композиция при введении в однократной дозе или двумя или более дозами у млекопитающих вызывает как Th1, так и Th2 иммунный ответ против любого из антигенов арбовируса, содержащий вирус Зика, вирус Чикунгунья и вирус японского энцефалита и являются приемлемыми для введения людям.

В одном варианте осуществления изобретение предусматривает способ получения вакцинной композиции, содержащей один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из вируса Зика, вируса Чикунгунья и вируса японского энцефалита, где способ включает одну или несколько стадий инаktivации, продуцирования рекомбинантного протеина, экспрессирования структурных антигенов, очистки и кон-

центрации вирусного антигена, причем указанные очистка и концентрация вируса Зика включает одну или несколько стадий, выбранных из

- а) ультрацентрифугирования;
- б) центрифугирования по градиенту плотности;
- в) осветления собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации;
- г) очистки с использованием колоночной хроматографии;
- е) тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 до 300 кДа,

причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед, или после инактивации вируса.

Способ колоночной хроматографии включает гель-фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, любую ионообменную колоночную хроматографию, аффинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями, причем колоночный хроматографический способ элюирует большую часть вирусного антигена в потоке, таком как Capto Core 700, наиболее предпочтительно Capto Core 700, причем вирусный образец очищен на колонке Capto Core 700 и элюирован в потоке.

Вирус Зика инактивирован одним или несколькими инактивирующими агентами, выбранными из химического инактивирующего агента, физического инактивирующего агента и облучающего агента.

Способ получения включает инактивацию вируса Зика, которая может быть осуществлена до или после очистки вируса, причем вирус Зика может быть инактивирован химическим инактивирующим агентом, выбранным из формалина (формальдегида), β -пропиолактона (BPL) и пероксида водорода.

В одном варианте осуществления способ получения включает инактивацию объемного вируса Зика, который инактивирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из

- а) обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус, при от 8 до 37°C, предпочтительно 25±3°C, в течение по меньшей мере от 1 до 7 дней;
- б) обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус, при от 2 до 8°C в течение по меньшей мере от 10 до 30 дней;
- в) β -пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. BPL:вирус, в течение по меньшей мере от 24 до 48 ч, если не более, при температурах, которые находятся в диапазоне от 8 до 30°C, предпочтительно 25±3°C, в течение 48 ч;
- г) β -пропиолактона при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 (BPL:вирус, об./об.), при от 2 до 8°C в течение по меньшей мере от 3 до 7 дней;
- е) комбинации BPL и формалина при любых из указанных выше условий, предпочтительно BPL инактивация при 1:3000 (BPL:вирус, об./об.) в течение 24 ч с последующей инактивацией формалином при 1:3000 (формалин:вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 ч при от 15 до 30°C, предпочтительно 25±3°C;
- ф) пероксида водорода при любой концентрации, от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30°C в течение от 5 до 120 мин.

В варианте осуществления способа получения вирус инактивирован γ -облучением путем экспозиции от 20 кГр вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 до 30 кГр от источника ^{60}Co .

В другом варианте осуществления способа получения вирус Зика инактивирован облучением УФ путем экспозиции на 254 нм в течение 30-60 мин.

В другом варианте осуществления способа получения вирус Зика инактивирован путем термической обработки от 50 до 65°C в течение от 30 мин вплоть до 2 ч, предпочтительно при 65°C в течение 1 ч.

В одном варианте осуществления способа получения инактивацию осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, не ограничиваясь этим, изомальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций. В одном предпочтительном варианте осуществления стабилизирующий агент выбран из

- а) 2% сорбита и 1% L-глицина;
- б) 1% сорбита и 0,5% L-глицина;
- в) 1% маннита и 0,5% L-глицина;
- г) 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты и
- е) 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.

Способы инактивации, описанные выше в данном документе, применяются к вирусу Зика любого генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц, несущих любые антигены вируса Зика, в частности Е протеин в любом гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности любого генома вируса Зика.

В одном варианте осуществления изобретение раскрывает способ продуцирования рекомбинантного протеина, включающий стадии

- а) трансфекция рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;

б) сбор клеток и выделение рекомбинантного протеина из них;

с) очистка протеина по меньшей мере одним из способов, включающим ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию, аффинную хроматографию, гидрофобную колоночную хроматографию, хроматографию со смешанным режимом смол, диафильтрацию, ультрацентрифугирование, центрифугирование по градиенту плотности, фракционирование с солью.

В другом варианте осуществления изобретение раскрывает способ экспрессирования структурных антигенов вируса Зика, включающий систему экспрессирования, представляющую собой любую прокариотическую или эукариотическую систему экспрессирования, включающий экспрессию, опосредованную бакуловирусом, в клетках насекомых.

В другом варианте осуществления изобретение раскрывает способ, причем способ включает нейтрализующие антитела, предпочтительно индуцирующиеся против протеина оболочки, такого как в оптимально инактивированном вирусе, живом ослабленном вирусе, дезактивированном вирусе, ДНК вакцине, вирусоподобных частицах, химерных вирусных частицах, демонстрирующих протеин Е вируса Зика в любом гетерологичном вирусном скелете, таком как в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.

Вакцинная композиция по изобретению может вводиться в прайм-буст стратегии, причем первичной является кандидатная инактивированная вакцина, и вторичной является или такая же вакцина или любая другая вакцина, такая как ДНК вакцина, вакцина химерного вируса Зика, вирусоподобные частицы, дезактивированная вакцина Зика, вакцина с живым ослабленным вирусом, рекомбинантная субъединичная вакцина, векторная вакцина или любая вакцина, полученная из синтетического вируса Зика, причем нейтрализующие антитела в каждой из них индуцируются против протеина оболочки вируса Зика.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Очищенный вирус Зика масса в 12,5% SDS-PAGE геле, обнаруженный с использованием окрашивания серебром. Протеин оболочки (Е) и мембранные (М) протеины являются основными протеинами, обнаруженными в очищенном антигене.

Фиг. 2. 2А - кинетика инактивации вируса Зика формалином в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 1:1000 об./об. формалин:вирус вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус при $25 \pm 3^\circ\text{C}$; 2В - кинетика инактивации вируса Зика β -пропиолактоном в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 1:1000 вплоть до 1:3500 об./об. BPL:вирус при $25 \pm 3^\circ\text{C}$. В обоих процедурах инактивации в качестве стабилизаторов добавляли 1% сорбита и 0,5% L-глицина (конечная концентрация), которые не имели экспозиции на кинетику инактивации. Инактивированные образцы серийно амплифицировали три раза *in vitro* в клетках Vero и анализировали в конце трех пассажей с помощью TCID₅₀.

Фиг. 3. 3А - ~2,1 т.п.н. гена ргМЕ вируса Зика SEQ ID NO. 1 амплифицировали ген-специфическими праймерами для инициирования клонирования в pFastBac вектор для экспрессии в клетках насекомых; 3В - образец Sf9 клеточный лизат исследовали вестерн-детектированием экспрессии протеина ргМЕ с использованием Зика кроличьей поликлональной антисыворотки по стандартным процедурам. Протеин оболочки ~55 кДа может быть обнаружен в качестве основной полосы.

Фиг. 4. Оценка нейтрализующих титров антител, индуцированных вакцинными композициями Зика с различными адъювантами. Адъюванты сокращаются следующим образом: pIC (поли-IC); С-холекальциферол; MPL (липид А; монофосфорил); RP (резиквимонид + поли-IC); RM (резиквимонид + OWEM2); I (инулин); OWEM2 (эмульсия масло-в-воде 2); AI (гидроксид алюминия + инулин); MDP (муреилдипептид); OWEM1 (эмульсия масло-в-воде 1). Ни одни значимые титры антител не могут быть выявлены в соответствующих контрольных группах и поэтому не показаны на фигуре. Во всех случаях 10 мкг двух доз вакцинного антигена Зика было сформулировано для введения мышам Balb/c в.м. способом.

Фиг. 5. 5А - оценка нейтрализующих титров антител с использованием PRNT₅₀ в исследовании дозой, находящейся в диапазоне от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг на дозу адъювантного гидроксида алюминия инактивированного формалином вакцины вируса Зика, которую вводят в.м. способом мышам Balb/c в двух дозах; 5В - вакцинированных животных подвергали контрольному заражению внутривенно 10^5 PFU/вируса Зика штамма на животное через 7 дней после бустерной дозы, и вирусемию контролировали каждые 24 ч в течение 7 дней (изображено на графике в течение 6 дней). Все животные продемонстрировали полную защиту от вирусемии, тогда как животные, которым вводили контрольное плацебо, показали вирусемию, которая сохранялась вплоть до 6 дней. Инфекционный вирус оценивали в образцах крови с помощью TCID₅₀.

Фиг. 6. Вирусное контрольное заражение мышей Balb/c возрастом 4-6 недель после введения от 1 до 40 мкг BPL инактивированной алюмокалиевыми квасцами адсорбированной вакцины вируса Зика. Животные из всех групп вакцинной дозы и группы плацебо подвергались контрольному заражению 10^5 PFU вируса Зика штамма MR766 через 7 дней после введения бустерной дозы. Вирусемию контролировали каждые 24 ч после вирусного контрольного заражения и титры инфекционных частиц в крови оценивали с помощью TCID₅₀. Кандидатная вакцина Зика предоставляла полную защиту от вирусного контрольного заражения во всех группах дозы.

Фиг. 7. Пассивная иммунизация, осуществляющая полную защиту против вирусемии и инфекционного вируса, не могла быть обнаруженной с использованием TCID₅₀ у животных, получивших внутрибрюшинно кроличью поликлональную антисыворотку Зика и были контрольно заражены 24 ч спустя 10⁶ PFU вируса Зика. Инфекционные вирусные частицы не могли быть выявлены с использованием TCID₅₀ в крови, при контроле каждые 24 ч в течение 6 дней, тогда как контрольные животные, получающие одинаковый объем PBS показали устойчивую вирусемию вплоть до 6 дней, когда были контрольно заражены одинаковой дозой вируса.

Фиг. 8. Инактивированные формалином адсорбированные на алюмокалиевых квасцах антисыворотки вакцины вируса Зика из вакцинированных мышей, нейтрализованных гомологичным штаммом вируса Зика MR766 (фиг. 8B) и перекрестно нейтрализованных гетерологичным штаммом 13025 FSS азиатского генотипа (фиг. 8A) с одинаковой эффективностью с титрами PRNT50 18105 и 18325 соответственно. Значения для плацебо (только алюмокалиевые квасцы) также изображены на графике рядом.

Фиг. 9. Титры антител, выраженные как log₁₀ обратных разбавлений сыворотки от дозы, которая находится в диапазоне исследований (фиг. 9A) с однократной дозой (фиг. 9B), двумя дозами (фиг. 9C), тремя дозами инактивированной формалином вакцины, которая вводится мышам Balb/c возрастом 4-6 недель, как описано в примере 7; фиг. 9D представляет собой титры антител с одной, двумя и тремя дозами 10 мкг вакцинного антигена без алюмокалиевых квасцов. Все значения выражаются как геометрические средние титры с 95% ДИ. На 9A-9D нанесены отдельные данные животных. Вирусный антиген Зика был иммуногенным даже без адъюванта. Данные из других диапазонов доз оценивались, но не были включены в график.

Фиг. 10. Антитела высокой аффинности могут быть обнаружены с использованием однократной дозы инактивированной формалином адсорбированной на алюмокалиевых квасцах вакцины вируса Зика у мышей Balb/c даже при низких дозах вакцинного антигена вплоть до 1 мкг. Авидность антител выражается как индекс авидности и оценивается способами, описанными в примере 12.

Фиг. 11. Оценка Th1 цитокинов (фиг. 11A) IFN-γ и (фиг. 11B) IL-2 у мышей, вакцинированных вакцинными композициями Зика с различными адъювантами. Во всех случаях она составляла 10 мкг вакцинного антигена на дозу. Адъюванты сокращаются следующим образом: pIC (поли-IC); С - холекальциферол; MPL (липид А; монофосфорил); RP (резиквимойд + поли-IC); RM (резиквимойд + OWEM2); I (инулин); OWEM2 (эмульсия масло-в-воде 2); AI (гидроксид алюминия + инулин); MDP (мумарилдипептид); OWEM1 (эмульсия масло-в-воде 1); как описано в примере 5. Адъювант на основе масла и поли-IC индуцировали сильный Th1 ответ по сравнению с другими испытанными адъювантами.

Фиг. 12. Оценка Th2 цитокинов (фиг. 12A) IL-4 и (фиг. 12B) IL-10 у мышей, вакцинированных вакцинными композициями Зика с различными адъювантами. Во всех случаях она составляла 10 мкг вакцинного антигена на дозу. Адъюванты сокращаются следующим образом: pIC (поли-IC); С - холекальциферол; MPL (липид А; монофосфорил); RP (резиквимойд + поли-IC); RM (резиквимойд + OWEM2); I (инулин); OWEM2 (эмульсия масло-в-воде 2); AI (алюминия гидроксид + инулин); MDP (мумарилдипептид); OWEM1 (эмульсия масло-в-воде 1), как описано в примере 5. Адъюванты на основе масла и поли-IC индуцировали сильный Th2 ответ в дополнение к Th1 ответу.

Детальное описание изобретения

Данное раскрытие касается формулирования иммуногенных композиций. Изобретение раскрывает, в частности, получение и формулирование вакцинных антигенов вируса Зика в моновалентных композициях и в комбинациях с другими арбовирусами, такими как вирусы Чикунгунья и/или японского энцефалита. В частности, изобретение раскрывает композиции для профилактики и лечения вирусных инфекций Зика.

Один из аспектов изобретения заключается в том, что способы получения, формулирования и применения антигенов Зика в качестве вакцины для индуцирования иммунного ответа применяют к любому генотипу, генотипным вариантам или любому штамму вируса Зика, причем один генотип вируса Зика эффективно перекрестно нейтрализует гетерологичный штамм. Вирус Зика может быть выбран из азиатского, западноафриканского или восточноафриканского генотипа вируса. Поэтому способы, описанные в представленном изобретении в данном документе, применяются к вирусу Зика любого генотипа/штамма, живому ослабленному вирусу Зика, дезактивированному вирусу, вирусоподобным частицам, химерным вирусным частицам, несущим любые антигены вируса Зика, в частности Е протеин и М протеин в любом гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности любого генома вируса Зика. Химерный вирус имеет нуклеиновую кислоту гетерологичного вируса и нуклеиновую кислоту вируса Зика.

В контексте иммуногенных композиций, раскрытых в данном документе, в частности основной антиген, используемый для получения иммуногенных композиций, способы получения, формулирования и применения вакцинных антигенов Зика, применяются к любому из указанных выше типов вируса Зика, которые имеют по меньшей мере от 50% аминокислотной идентичности и вплоть до 100% аминокислотной идентичности в любом участке генома. В контексте иммуногенных композиций, раскрытых в данном документе, последовательность штамма MR766 вируса Зика африканского генотипа (SEQ ID NO. 5

для геномной нуклеотидной последовательности и SEQ ID NO. 6 для полного ORF) имеет более чем 96,5% аминокислотную идентичность по структурному протеину оболочки со штаммом FSS13025 азиатского генотипа, и чья последовательность раскрыта в SEQ ID NO. 7 и SEQ ID NO. 8 для нуклеотидных и протеиновых последовательностей соответственно. Вакцина антисыворотки штамма MR766 перекрестно нейтрализовала штамм FSS13025 со 100% эквивалентной эффективностью, как гомотипный штамм MR766. Кроме того, в контексте раскрытия в данном документе антисыворотка вируса Зика prME (SEQ ID NO. 3) эффективно перекрестно нейтрализовала штамм MR766, что подтверждает, что все вирусы Зика являются серотипно подобными. В контексте раскрытия в данном документе способы получения вакцины, разработанные с использованием какого-либо одного штамма вируса Зика, применимы к гомологичным и любым гетерологичным штаммам вируса Зика для использования в качестве кандидатной вакцины.

Клеточная линия, которая может быть распространена *in vitro* в культуре, может использоваться в качестве хозяина для вирусной культуры Зика. Для распространения штаммов вируса Зика предпочтительно выбранными могут быть перmissive клетки, позволяющие вирусу хорошо расти. Например, могут использоваться диплоидные клеточные линии, такие как MRC-5 и WI-38, и серийно пассированные клеточные линии, такие как Vero, BHK-21, CHO клетки и т.п. Например, клетки Vero (ATCC No. CCL-81), BHK-21 (ATCC No. CCL-10), C6/36 (ATCC No. CRL-1660) и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления одна такая клеточная линия, используемая в представленном изобретении, представляет собой клетки Vero (ATCC No. CCL-81), которые были валидированы для применения в качестве клетки-хозяина для получения вакцины. Валидированные клеточные линии Vero соответствуют требованиям для биологических веществ No. 50 относительно требований по использованию клеток для производства биологических препаратов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), тем самым подтверждая, что данные клеточные линии являются надлежащего качества для получения вакцины (WHO Technical report Series, No. 878, pp. 19-52, 1998).

В одном аспекте изобретения способ адаптации вируса Зика к клеткам Vero увеличивает титр вируса. Повторно пересеянный вирус Зика в клетках Vero увеличивает титр вируса. В контексте роста вируса в клетках Vero, раскрытых в данном документе, вирус Зика первоначально пассировали в мышинный мозг или клетки *Ae.albopictus* C6/36 (ATCC No. CRL-160) и затем адаптировали к клеткам Vero, что увеличивает титры вируса, приемлемые для получения вакцины.

Для поддержания клеточной культуры указанных выше клеточных линий адаптированными могут быть клетки Vero, в частности стационарная культура в монослоях, культура перфузионной системы, колбы для встряхивания, культура роллера для пробирок/флакона, суспензионная культура с и без микронесителей, клеточные фабрики и клеточные стеки, биореакторы и одноразовые биореакторы, волновые биореакторы и подобные. Например, различные типы микронесителей коммерчески доступны. Коммерчески доступные устройства для животной клеточной культуры могут использоваться для облегчения роста клеток до высокой плотности клеток.

В одном аспекте изобретения и как раскрыто в данном документе, вирус Зика является очищенным для применения в качестве кандидатной вакцины. Очистка достигается комбинацией как физических, так и химических способов или перед или после инактивации вируса. Физические способы включают любую из следующих техник, но не ограничиваются этим, ультрацентрифугирование, центрифугирование по градиенту плотности, ультрафильтрацию, диалфильтрацию и концентрацию с использованием полупроницаемых мембран с приемлемыми размерами молекулярного отсека. Очистка химическими средствами использует способы, такие как адсорбция/десорбция за счет химических или физико-химических реакций, таких как ионообменная хроматография, аффинная хроматография, хроматография с гидрофобными взаимодействиями, гель-фильтрационная хроматография, такая как, например, Capto core700TM, гидроксиапатитная матрица, сольвация с неорганическими солями, одним из таких примеров является сульфат аммония.

В предпочтительном варианте осуществления вирус очищают с использованием колоночной хроматографии на Capto core 700 (GE Healthcare Life Sciences). Инактивация вируса достигается или перед очисткой, или после очистки на колонке Capto core 700. Собранные вирусные клетки перед колонкой Capto core 700 могут быть осветленными с использованием мембранных фильтров с различными размерами пор, преимущественно не менее 0,45 мкм для связывания на мембране низших протеинов. В предпочтительном варианте осуществления собранные вирусные клетки могут быть осветленными с использованием двойных мембран с двумя различными размерами пор, например 1,2 мкм с последующей 0,45 мкм или 0,8 мкм с последующей 0,45 мкм. Осветленные собранные вирусные клетки являются приемлемыми для очистки на колонке Capto Core 700. Буферы, используемые для очистки на Capto core 700, имеют оптимальный уровень pH и ионную силу для максимизации связывания примесей на колонке и элюирования вируса в потоке. Вирусный образец дополнительно концентрируют с использованием диалфильтрации перед или после инактивации вируса. Диалфильтрационный образец вируса после инактивации удаляет вирус инактивирующего агента из основного антигена и является приемлемым для формулирования.

В одном варианте осуществления изобретения вирус Зика является инактивированным (убит) для

применения в качестве вакцинного антигена. Инактивацию могут осуществлять или перед, или после очистки вируса. В предпочтительном варианте осуществления инактивацию вируса Зика осуществляют после очистки вируса.

Вирус Зика может быть инаktivирован или с использованием нагревания, γ -облучения, ультрафиолетового света или химических средств. В предпочтительном варианте осуществления раскрытый в данном документе вирус Зика химически инаktivирован. Химические инаktivированные агенты были выбраны из следующего перечня, который включает, но не ограничивается этим, формалин, β -пропиолактон, глутаральдегид, N-ацетилэтиленимин, бинарный этиленимин, третичный этиленимин, аскорбиновую кислоту, каприловую кислоту, псоралены, детергенты, включающие неионные детергенты, и т.п., причем химический инаktivирующий агент добавляется в вирусную суспензию для инаktivации вируса.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения химический инаktivирующий агент выбирают из формалина и/или β -пропиолактона (BPL). Формалин используют в любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:1000 до 1:4000 об./об. формалин:вирус. β -пропиолактон используют в любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:1000 до 1:4000 об./об. BPL:вирус. Температура и продолжительность инаktivации оптимизированы для полной инаktivации вируса с минимальным вредным воздействием на иммуногенность. Это может быть достигнуто при более короткой продолжительности экспозиции минимальным количеством инаktivирующего агента. В контексте инаktivации вируса раскрытие в данном документе описывает концентрацию, температуру и время экспозиции на вирус Зика формалином и BPL. В предпочтительном варианте осуществления изобретения температура инаktivации составляет $25\pm 3^\circ\text{C}$, наиболее предпочтительно 22°C в течение 7 дней. При более низких температурах от 2 до 8°C , продолжительность экспозиции формалина дольше, чем 7 дней, для достижения полной инаktivации вируса при указанных выше диапазонах концентрации. Продолжительность экспозиции на вирус формалином может быть уменьшена до менее 48 ч за счет повышения температуры экспозиции вплоть до 37°C . Следовательно, эффективная инаktivация формалином вируса Зика может быть достигнута при любой концентрации в диапазоне формалина от 1:1000 об./об. формалин:вирус вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус за счет выбора любой температуры в диапазоне от 2 до 37°C и варьируя время экспозиции от 24 ч до более чем 10 дней при любой из указанных выше концентраций, времени и температуры экспозиции.

В одном варианте осуществления раскрытия BPL используют в качестве вирусного инаktivирующего агента для вируса Зика. В предпочтительном варианте осуществления изобретения BPL используют в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 1:1000 об./об. BPL:вирус вплоть до 1:4000 об./об. BPL:вирус. При более низких температурах от 2 до 8°C , продолжительность экспозиции BPL составляет преимущественно от 3 до 7 дней для достижения полной инаktivации вируса при указанных выше диапазонах концентраций. Продолжительность экспозиции вируса BPL может быть уменьшена до 48 ч или менее путем повышения температуры экспозиции вплоть до $25\pm 3^\circ\text{C}$ или даже вплоть до 37°C . Следовательно, эффективная инаktivация BPL вируса Зика может достигаться за счет какой-либо концентрации в диапазоне BPL от 1:1000 об./об. BPL:вирус до 1:4000 об./об. BPL:вирус за счет выбора любой температуры в диапазоне от 2 до 37°C и варьируя временем экспозиции от 24 ч до более чем 10 дней при каких-либо указанных выше концентрациях, времени и температуры экспозиции.

Один из вариантов осуществления представленного изобретения, раскрытого в данном документе, представляет собой применение комбинации BPL и формалина при каких-либо из указанных выше условий, предпочтительно BPL инаktivация при 1:3000 об./об. BPL:вирус в течение 24 ч с последующей инаktivацией формалином при 1:3000 об./об. формалин:вирус в течение от 24 до 48 ч при от 15 до 30°C , предпочтительно $25\pm 3^\circ\text{C}$. Применение комбинации BPL и формалина для инаktivации вируса Зика заключается в том, что механизм инаktivации разный для формалина и BPL, их комбинированное применение снижает их общую концентрацию и экспозицию как инаktivирующими агентами, так и применение низких концентраций формалина, способствует стабильности основного вируса, способствуя перекрестному связыванию вирусных эпитопов. В другом варианте осуществления изобретения пероксид водорода используют для инаktivации вируса Зика в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1% при любой температуре от 20 до 30°C в течение от 5 до 120 мин, если не более.

Вариант осуществления представленного изобретения раскрывает применение антигена ргМЕ вируса Зика в качестве антигена кандидатной вакцины для индуцирования иммунного ответа против вируса Зика. Раскрытие применимо к любому способу разработки вакцины, причем ргМЕ или Е протеин экспрессируется таким образом, что нейтрализующие антитела Зика направлены против указанных антигенов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения ргМЕ протеин экспрессируется как рекомбинантные вирусоподобные частицы (VLP) в экспрессии, опосредованной бакуловирусом в клетках насекомых. Каждый квалифицированный специалист в данной области будет получать дополнительные варианты осуществления с использованием описанного выше раскрытия для разработки кандидатной вакцины с использованием протеина ргМЕ в качестве мишени антигена Зика, такого как ДНК вакцина,

вирусоподобные частицы, содержащие протеины rgME, субъединичная вакцина, содержащая антиген оболочки (Е), живые векторные вакцины, химерные вакцины с использованием rgME Зика на гетерологичном скелете нуклеиновой кислоты, причем все указанные выше анти-Зика антитела направлены против Е протеина.

В представленном изобретении, раскрытом в данном документе, представлены иммуногенные композиции, содержащие очищенные рекомбинантные антигены вируса Зика, содержащие протеин оболочки (Е), мембранный (М) протеин и необязательно неструктурный 1 (NS1) протеин в качестве вакцинных антигенов для индуцирования иммунного ответа для профилактики вирусных инфекций Зика. В предпочтительном варианте осуществления применение вируса Зика, имеющего ген rgME последовательности SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2, кодирующего структурный протеин SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4 соответственно, причем экспрессированный и очищенный протеин rgME может использоваться в качестве вакцинного антигена для профилактики вирусных инфекций Зика.

В предпочтительном варианте осуществления ген rgME вируса Зика используют для генерирования рекомбинантного генного конструкта, который может использоваться для экспрессирования протеина rgME в прокариотической или эукариотической системах экспрессирования в качестве вирусоподобных частиц (VLPs), предпочтительно экспрессия, опосредованная бакуловирусом в клетках насекомых. Способы, раскрытые в данном документе, применимы к любому штамму вируса Зика, имеющему по меньшей мере 70% аминокислотную идентичность к указанным выше SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4.

Вариант осуществления представленного раскрытия представляет собой выбор фармацевтически приемлемого буфера в течение биопроцесса, причем буферный агент выбирают из перечня, состоящего из какого-либо одного или нескольких из последующих, но не ограничивается этим, фосфатный буфер; цитратный буфер; фосфатно-цитратный буфер; боратный буфер; буфер, содержащий три(гидроксиметил)аминометан (Tris); сукцинатный буфер; буферы, содержащие глицин или гистидин в качестве одного из буферных агентов. В наиболее предпочтительном варианте осуществления используют фосфатный буфер, причем фосфатный буфер представляет собой натрий-фосфатный буфер в концентрации от 5 mM вплоть до 200 mM фосфатных ионов, предпочтительно от 10 до 100 mM фосфатный буфер, наиболее предпочтительно от 10 до 50 mM фосфатный буфер любого pH выше 6,50 до 9, предпочтительно от pH 6,8 до 7,8 используют для процессов в обратном направлении и в прямом направлении. В предпочтительном варианте осуществления 10 mM натрий-фосфатный буфер pH 7,4±0,2 используют в получении очищенной инактивированной вакцины основного вирусного антигена Зика, и, необязательно, содержащие натрия хлорид в концентрации от 50 до 200 mM. В другом предпочтительном варианте осуществления сорбит и L-глицин необязательно добавляют до конечной концентрации 1% и 0,5% соответственно.

Вариант осуществления представленного изобретения также раскрывает выбор адъювантов, совместимых для формулирования с вирусным антигеном Зика.

Антигенные композиции вируса Зика как моновалентная вакцина и с вирусом Чикунгунья и вирусами японского энцефалита в комбинированной вакцине были сформулированы в фармацевтически приемлемом носителе для иммунизации. Применение адъюванта(ов) может снизить количество антигена, необходимого для формуляции. Кроме того, для адъювантной вакцинной композиции, приемлемый(е) адъювант(ы) были выбраны из следующего перечня, включающего, но не ограничивающегося этим, алюмокалиевые квасцы, такие как гидроксид алюминия, алюминия фосфат или аморфный алюминия сульфатфосфат; фосфат кальция; инулин какой-либо полиморфной формы, предпочтительно γ -инулин; адъюванты, содержащие инулин в комбинации с другими органическими и неорганическими соединениями, такие как алюминия гидроксид, алюминия фосфат, алюминия сульфатфосфат и фосфат кальция; липосомы, хитозан и сложные углеводы, такие как декстран, декстрины, крахмал, маннаны и глюкоманнаны, галактоманнаны, β -глюканы, гепарин, целлюлоза, гемицеллюлоза, пектины и пектиниты, лектины и какие-либо другие углеводы или синтетические, или полученные из любого источника, какие-либо способные к биологическому разложению и биосовместимые полимеры, такие как полилактид и полилактид согликолиды, (PLG или PLGA); какие-либо эмульсии, включающие, но не ограничивающиеся этим, эмульсии масло-в-воде, причем одним таким примером является сквален или аналоги сквалена, содержащие масло в воде адъюванты, эмульсии масло-в-воде, содержащие растительные масла; любые эмульсии вода-в-масле; липосомы, полученные из холекальциферола в качестве одного из ингредиентов вместе с другими липидными растворимыми соединениями; липосомы других композиций; RIBI адъювантные системы, сапонины, включающие, но не ограничивающиеся этим, QS-21, QuilA, томатин, ISCOM, ISCOMATRIX и т.п., липопептиды, гликопептиды и их аналоги, резиквимоиды, липополисахариды, липид А, мурамилдипептиды или их аналоги и любые адъюванты на основе пептида, олигонуклеотиды, любые TLR лиганды и их аналоги в качестве адъювантов, любой цитокин, витамины и нетоксичные бактериальные токсины, практически любые аналоги всех указанных выше адъювантов и комбинация из двух или более из указанных выше адъювантов или их аналогов, которые совместимы в вакцинной композиции(ях) и исследованы относительно повышенной иммуногенности. В дополнение к указанному выше какие-либо другие органические и неорганические вещества, обладающие хорошей иммунопотенциальной активностью, являются приемлемыми для применения в качестве адъюванта либо само-

стоятельно, либо в адъювантных комбинациях для повышения иммуногенности арбовирусных антигенов. Применение адъюванта в вакцинных композициях может уменьшить необходимое количество антигена.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения гидроксид алюминия использовали для исследования диапазона дозирования как формалина, так и BPL, инаktivированных антигенов Зика, а также в вакцинных комбинациях вакцин Зика, CHIKV и JEV через их профиль безопасности для применения в целевой популяции. Эмульсии на основе масла и поли-IC давали хороший иммунопотенциальный эффект относительно антигена Зика, при использовании в качестве адъювантов. В одном варианте осуществления изобретения поли-IC и другие адъюванты, осуществляющие системный мукозный иммунитет, особенно предпочтительны для защиты против заболевания, вызванного вирусной инфекцией Зика. Поли-IC и эмульсии на масляной основе и адъювантные комбинации, раскрытые в изобретении, индуцировали как Th1, так и Th2 ответы, оцененные путем измерения цитокинов Th1 и Th2 после вакцинации.

В одном варианте осуществления представленного изобретения вакцинный консервант используют в вакцинных композициях. Предпочтительный вариант осуществления представляет собою 2-феноксиэтанол в концентрации от 2,5 до 5 мг на дозу.

В одном аспекте представленного изобретения, раскрытого в данном документе, применяются стабилизирующие агенты, выбранные из одного или нескольких из следующих, но не ограничиваются этим, лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, изомальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, альбумина сыворотки человека и их комбинаций, в какой-либо приемлемой концентрации, которая используется для обеспечения стабильности во время инаktivации вируса Зика каким-либо из указанных выше способов. В предпочтительном варианте осуществления стабилизирующие агенты выбраны из любой из следующих комбинаций, но не ограничиваются этим, 2% сорбита и 1% L-глицина; 1% сорбита и 0,5% L-глицина; 1% маннита и 0,5% L-глицина; 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты; 1% сорбита, 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека. В предпочтительном варианте осуществления комбинация из 1% сорбита и 0,5% L-глицина и 1% маннита и 0,5% L-глицина представляют собой предпочтительные комбинации, наиболее предпочтительно 1% сорбита и 0,5% L-глицина. Квалифицированный специалист в данной области будет принимать во внимание дополнительные варианты осуществления, основанные на указанных выше раскрытиях.

Лиофилизированные композиции являются одним из способов получения вакцинного продукта. Лиофилизированные препараты вакцины против вируса Зика, как правило, содержат очищенный инаktivированный вирус Зика, сахарные полиолы, предпочтительно сорбит и маннит, наиболее предпочтительно сорбит в комбинации со стеклообразующим сахаром, который преимущественно представляет собой дисахариды или олигосахариды. Предпочтительные дисахариды выбраны из следующего перечня, но не ограничиваются этим, сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, лактозы, рафинозы, изомальтозы, стахиозы и т.п. Предпочтительный вариант осуществления раскрытия представляет собой комбинацию из 1% сорбита с 5% сахарозы, 1% маннита и 5% сахарозы, 3% сахарозы и 2% трегалозы, 1% маннита с 1% L-глицина и/или 2% трегалозы. Любой обычный специалист в данной области разработает дополнительные варианты осуществления, основываясь на раскрытиях, указанных выше.

Лиофилизированные композиции могут быть повторно суспендированы в воде для инъекций или в водном буфере, фармацевтически приемлемом для введения, например, в качестве инъекционной жидкости для субъекта человека. Лиофилизированная композиция также может использоваться в качестве ингаляционного порошка, который будет приемлемым для индуцирования мукозного иммунитета. Кроме того, лиофилизированная композиция вируса Зика может содержать адъювант, обеспечивающий мукозный иммунитет предпочтительно из перечня тех адъювантов, которые были исследованы в представленном изобретении для вируса Зика, такого как, например, поли-IC.

В представленном изобретении раскрытие, представленное в данном документе, относительно оптимального использования вирусного антигена Зика для индуцирования сильного иммунного ответа, вакцинный антиген может использоваться в количестве от 0,10 мкг вплоть до 100 мкг на дозу, причем предпочтительный вариант осуществления представляет собой любую концентрацию от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг на дозу, таким образом, что введенные вакцинные дозы индуцируют титры антител, которые можно измерить с помощью анализов, таких как ELISA и PRNT50. Вакцина может вводиться с и без адъюванта, поскольку как инаktivированная вакцина, так и адъювантные композиции индуцируют хороший иммунный ответ.

В еще одном раскрытии изобретения инаktivированная кандидатная вакцина Зика, инаktivированная по какому-либо из раскрытых способов, может вводиться в качестве однократной дозы или двумя или более дозами для индуцирования иммунного ответа. Способы, раскрытые в изобретении, обеспечивают кинетику иммунного ответа после каждой дозы вакцины, в дозах в диапазоне от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг на дозу, что обеспечивает гибкость в выборе дозы вакцины в диапазоне концентраций и количестве доз для соответствия целевой популяции для вакцинации.

Путь введения вакцины может быть каким-либо путем, выбранным из, но не ограничиваясь этим,

внутримышечного, интрадермального, подкожного, внутривенного, перорального, интраназального и транскутанного способов введения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, предпочтительным путем введения вакцины является внутримышечный (в.м.) путь.

Вакцинные композиции могут быть представлены в стеклянных флаконах и вводиться с помощью иглы и шприцев, представленные в заранее заполненных шприцах в виде готовой к использованию презентации или введенных путем электропорации, микроигольных пластырей безыгольного пластыря, в виде ингаляционного или назального спреев.

Представленное изобретение раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих один или несколько антигенов арбовируса, выбранных из перечня, включающий вирус Зика, вирус Чикунгунья (CHIKV) и вирус японского энцефалита (JEV). При применении в вакцинной комбинации вакцина может индуцировать иммунный ответ против каждого из вирусов, присутствующего в комбинированной вакцине. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, включающем вакцинную композицию, причем антигены вируса Зика и антигены вируса японского энцефалита присутствуют в комбинированной вакцине в концентрациях, которые находятся в диапазоне от 5 до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или предпочтительно с адъювантом, выбранным из перечня адъювантов, раскрытых в представленном изобретении, предпочтительно гидроксида алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,5 мг на вакцинную дозу являются раскрытыми. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения раскрыта вакцинная композиция, содержащая антигены вируса Чикунгунья и Зика в композиции, содержащей от 5 до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или предпочтительно с адъювантом, выбранным из перечня адъювантов, раскрытых в представленном изобретении, предпочтительно гидроксида алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,5 мг на вакцинную дозу.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения раскрыта вакцинная композиция, содержащая антигены вируса Чикунгунья, Зика и JEV в композиции, содержащей от 5 до 50 мкг каждого антигена в фармацевтически приемлемой композиции без адъюванта, или предпочтительно с адъювантом, выбранным из перечня адъювантов, раскрытых в представленном изобретении, предпочтительно гидроксида алюминия с содержанием алюминия от 0,25 до 1,5 мг на вакцинную дозу. Применение вакцинной комбинации обеспечивает исключительное экономическое преимущество для производства и распределения вакцин, при условии, что иммунный ответ индуцируется против каждого из антигенов в композиции и никакой антигенной интерференции не наблюдается ни к одному из антигенов при наличии дополнительного антигена. Вакцинные антигены могут или вводиться из одной композиции, или вводиться отдельно в одно и то же время или в приемлемые временные интервалы, таким образом, чтобы индуцировать иммунный ответ на общий антиген.

Представленное изобретение также раскрывает применение антител к вирусу Зика для выявления вируса Зика с помощью ELISA или какими-либо иммунодиагностическими способами, где антитела находят применение для выявления или диагностики вирусных инфекций Зика.

Представленное изобретение также раскрывает в данном документе применение антител к вирусу Зика для профилактики и лечения вирусного заболевания Зика.

Сокращения, используемые в изобретении: в.м. - внутримышечный; мкг - микрограмм; TCID₅₀ - 50% инфекционная доза культуры ткани; PFU - бляшкообразующая единица.

Примеры

Пример 1. Вирусная культура Зика в клетках Vero.

Клеточная линия Vero (ATCC No. CCL-81) использовалась в качестве клеточного субстрата для культивирования вируса Зика. Широко охарактеризованные клетки Vero, полученные от BioReliance, USA, использовались в полупромышленных масштабах производства. Клетки Vero выращивали в DMEM (среда Игла, модифицированная способом Дульбекко; Sigma-Aldrich Catalog # D5523, и использовали в соответствии с инструкциями производителя) или EMEM (минимальная питательная среда Игла), содержащие 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS) или сыворотки новорожденного теленка (NBCS) и инкубировали при 35-37°C до достижения 80-100% слияния монослоя. После инфицирования использовали такую же среду, содержащую 1% сыворотку, или альтернативно вирус культивировали в клетках Vero, адаптированных к свободной от сыворотки среде. Вирус Зика также может быть выращен в монослое клеток MRC-5, который получали в среде для роста, состоящей из EMEM, от буферного до нейтрального pH буфером Нерес с 5% сывороткой и статически инкубировали при от 35 до 37°C в течение от 6 до 8 дней. Вирус Зика культивировали обычным образом в клетках Vero. Вирус Зика штамма MR766 (ATCC VR-84) был адаптирован к клеткам Vero с помощью непосредственной инокуляции в клетках Vero. Альтернативно, вирус был адаптирован в клетках C6/36 Ae.albopictus дважды за счет серийного пассажирования, и вирус Зика в супернатанте культуры по данным клеток использовался для инфицирования клеток Vero. Серийный пассаж вируса Зика в клетках C6/36 культивировали при от 25 до 28°C, что увеличивало титр вируса выше чем 10e8,0 TCID₅₀/мл или 10e8,0 PFU/мл. Это также исключает необходимость следующих повторных пассажей в клетках Vero для получения высоких титров. Адаптация вируса данным способом полезна для достижения высоких титров и последующего более высокого выхода в производстве. После культивирования в C6/36 клетках вирус был серийно дважды бляшкоочищен от

клеток Vero, и вирус из одной лунки выделенной бляшки амплифицировали и широко характеризовали в отношении отсутствия занесенного агента (все известные РНК и ДНК вирусы, бактерии, грибы, микоплазмы и т.п.) с использованием NGS (Next Generation Sequencing) платформы. Вирусная геномная РНК была секвенирована с использованием NGS платформы, и полная нуклеотидная последовательность штамма MR766 представлена в SEQ ID NO. 5, соответствующая расшифрованная аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO. 6. Секвенирование показало сайт интактного гликозилирования в протеиновой оболочке, который в противном случае теряется, если клетки экстенсивно пассированы в клетках млекопитающих. Вирус Зика продуцирует цитопатический эффект (CPE) в клетках Vero, и при оптимальной кратности инфекции (MoI) и условиях сбора клеток могут быть достигнуты титры вирусов выше $10e8,5$ TCID₅₀/мл или $10e8,5$ PFU/мл.

Пример 2. Очистка вируса Зика.

Для вирусной культуры Зика в полупромышленном масштабе вирусная культура была систематически масштабирована из колб T-175 в CS1 (клеточный стек 1), CS10 (клеточный стек 10) и CS40 (клеточный стек 40). Количество CS40, одновременно инфицированных вирусом в стандартизированном MoI, использовали для масштабирования производства. Использование коэффициентов CS40 позволяет быстро и линейно масштабировать вплоть до желаемых объемов производства. Объем сбора клеток от каждого CS40 составлял приблизительно 8-10 л. Вирус собирали через 4-6 дней или когда было достигнуто более чем 90% CPE. Альтернативно, одноразовые биореакторы в хорошо стандартизированных условиях температуры от 35 до 37°C, pH не менее чем 7,0 и оптимально при pH 7,4, при растворенном кислороде в количестве от 45 до 75 м.ч., предпочтительно 60 об/мин и перемешивании от 240 до 280 об/мин и оптимально контролируемой скорости входящего потока и исходящего потока, оптимизированной в соответствии со шкалой объема культуры от 1 до 100 л использовались для увеличения плотности клеток и сбора вируса. Собранные вирусные клетки осветляли или применяя микрофильтрацию, или с использованием двойных фильтров с отсечением 1,2 мкМ и 0,45 мкМ. Осветленные собранные вирусные клетки затем пропускали через колонку Capto Core700 (GE healthcare Life Sciences) в фосфатном буферном солевом растворе, pH 7,4. Фракции, содержащие вирус Зика, в потоке необязательно концентрировали, применяя диафильтрацию с использованием или 100 кДа, или 300 кДа отсечения мембран. Концентрированную вирусную фракцию использовали для инактивации вируса. Альтернативным способом осветленные собранные вирусные клетки были инактивированы или BPL, или формалином согласно способам, описанных в следующих разделах, и затем загружали в колонку. Чистоту вируса проверяли на 12,5% SDS-PAGE. Отсутствие существенной разницы в выходе или в чистоте при инактивации вируса до и после очистки. Вирус также может быть очищен с использованием целюфинсульфата, DEAE-Сефадекс CM-сефадекс с градиентом соли и с использованием гель-фильтрации на сефарозе CL-4B, керамической гидроксипатитной колонки с градиентом от 0,2 до 0,8М фосфата и во всех случаях с последующей диафильтрацией с использованием мембран с отсечением 100 или 300 кДа. Чистоту препарата вируса проверяли с помощью окрашивания серебром образца вируса в 12,5% SDS-PAGE геле (см. фиг. 1). Вирус Зика с использованием указанных выше способов может быть очищен до высокой чистоты, приемлемой для использования в качестве вакцинного основного антигена. Вирус также может быть очищен путем ультрацентрифугирования на 20-60% градиенте сахарозы с использованием ротора P28S Hitachi NIMACultra-centrifuge после центрифугирования при 100000xg в течение от 6 до 8 ч.

Пример 3. Инактивация вируса Зика.

Образец вируса Зика был инактивирован (убит) различными способами для применения в качестве вакцинных антигенов. Инактивацию формалином исследовали при различных концентрациях, находящихся в диапазоне от 1:1000 (формалин:вирус, об./об.) до 1:4000 (формалин:вирус, об./об.) при температуре 25±5°C, более конкретно при 22°C и кинетику инактивации вируса контролировали каждые 24 ч в течение вплоть до 10 дней, обычным образом инактивацию вируса осуществляли при 25±3°C, предпочтительно при 22°C в течение 7 дней. Инактивация вируса была эффективной при всех концентрациях от 1:1000 об./об. формалин:вирус вплоть до 1:3500 об./об. формалин:вирус, при указанных выше температурах и временных интервалах. Соотношение 1:4000 об./об. формалин:вирус было эффективным при инактивации вируса при более высоких температурах вплоть до от 30 до 37°C в течение от 3 до 7 дней. Инактивация формалином была эффективной при всех указанных выше соотношениях формалина к вирусу при температурах, находящихся в диапазоне от 2 до 8°C, при инкубировании в течение временных интервалов длиннее чем 10 дней. Следовательно, инактивация формалином обеспечивает гибкость инактивации вируса при любой температуре от 2 до 37°C в временных интервалах, находящихся в диапазоне от 24 ч до более чем 10 дней в зависимости от условий, используемых для инактивации. Инактивация вируса Зика β-пропиолактоном (BPL) исследовалась в различных условиях. Вирус Зика был полностью инактивирован при концентрациях BPL, находящихся в диапазоне от 1:1000 (BPL:вирус, об./об.) вплоть до 1: 3500 (BPL:вирус, об./об.) при температуре 25±5°C в течение от 24 до 48 ч. При более высокой концентрации BPL или при более высоких температурах вплоть до 37°C полная инактивация достигалась через 24 ч или меньше и может использоваться в качестве способа для быстрой инактивации вируса. Вирус Зика мог также быть инактивирован при указанных выше концентрациях BPL, при инкубировании

при от 2 до 8°C в течение от 3 до 7 дней. Инактивация комбинацией BPL при 1:3500 (BPL:вирус, об./об.) при 22-25°C в течение 48 ч, с последующей обработкой с низкими концентрациями формалина от 1:3000 до 1:4000 об./об. формалин:вирус в течение 24 ч была эффективной как при инаktivации, так и стабилизации вируса. Любая концентрация BPL и формалина могла бы использоваться как для инаktivации, так и стабилизации вируса, при условии, что инаktivация является полной без негативного влияния на иммуногенность. Инаktivацию исследовали от 0,005% вплоть до 3% конечной концентрации пероксида водорода при от 20 до 25°C в течение периода времени 2 ч. Не существовало никакого негативного влияния на иммуногенность вируса при более низких концентрациях пероксида водорода с очень коротким временем экспозиции в пределах минут, но негативное влияние существовало при длительной концентрации при более высоких дозах исследуемых диапазонов. Инаktivированные вирусные образцы после экспозиции в течение разного времени и концентрации дозы титровали в отношении инфекционных вирусных частиц, если такие были, по TCID₅₀/мл от 5 мин вплоть до 6 ч с интервалами 5, 10, 20, 30 и 60 мин и при 2, 4 и 6 ч. При более высоких концентрациях вирус был инаktivирован в пределах секунд. В каждый момент времени реакция была остановлена путем добавления 10 ед./мл каталазы, которая быстро гидролизует пероксид водорода. Оптимальная концентрация для инаktivации составляла 0,01% конечной в течение продолжительности 60 мин или меньше, чем определялось титрованием для инфекционных частиц с использованием TCID₅₀/мл и последующей иммуногенности. Инаktivация вируса Зика пероксидом водорода обеспечивает гибкость продолжительности экспозиции в различных концентрациях в течение разных временных точек в соответствии с концентрацией вирусных частиц в образце.

Образец очищенного вируса Зика был инаktivирован нагреванием при температурах от 50 до 65°C в течение вплоть до 60 мин. Инаktivацию вируса УФ осуществляли экспозицией УФ при 254 нм в течение вплоть до 120 мин.

Вирус Зика был инаktivирован γ -облучением путем экспозиции от 20 кГр вплоть до 35 кГр из ⁶⁰Со источника в Gamma Agro Medical Processing Facility в Hyderabad. Все указанные выше способы инаktivации осуществляли в присутствии и при отсутствии стабилизирующих вирус агентов, таких как различные концентрации сахаров, таких как сахароза, лактоза, трегалоза, мальтоза, манноза, среди прочего. Сахарные спирты, используемые для обеспечения стабилизирующего эффекта, представляли собой сорбит и маннит. Исследуемые аминокислоты были выбраны из L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-глицина и L-аспарагиновой кислоты и L-глутамина и также альбумина сыворотки человека и комбинации с одним или несколькими из указанных выше стабилизирующих агентов. Наиболее эффективные стабилизирующие агенты представляли собой сорбит при от 0,5 до 2%, предпочтительно 1,0% в комбинации с L-глицином от 0,5 до 2%, предпочтительно при 0,5%. Маннит и L-глицин в комбинации были эффективными относительно стабилизирующего вирусного образца во время инаktivации в отличии от маннита и L-глицина самостоятельно.

Образцы вируса Зика, инаktivированные всеми указанными выше способами для применения вакцинных антигенов, исследовали в отношении завершенности инаktivации путем серийного пассирования инаktivированных образцов три раза серийно в клетках Vero и исследование относительно инфекционного вируса в конце периода инаktivации с помощью TCID₅₀. Кроме того, образец инаktivированного вируса после трех серийных пассажей *in vitro* вводили инъекционно внутричерепно мышам в возрасте 2 дня и наблюдали за смертностью или аномалиями роста в течение 21 дня и считались полностью инаktivированными в случае, когда они не показывали никаких неблагоприятных эффектов в исследовании *in vitro* и *in vivo*. Никакая инфекционность не наблюдалась с инаktivированными формалином и β -пропиолактоном вирионами при указанных выше в диапазоне концентраций и в течение различных исследуемых периодов времени. Кинетика инаktivации вируса Зика формалином и BPL как репрезентативный пример одного из способов, раскрытых выше, представлена на фиг. 2 (фиг. 2A и 2B).

Пример 4. Рекомбинантное клонирование и экспрессия протеина prME вируса Зика.

Синтетический ген нуклеотидной последовательности SEQ ID NO. 1, кодирующей открытую рамку считывания (ORF) prME протеина SEQ ID NO. 3 вируса Зика, был синтезирован в GenScript, NJ, USA. Ген ПНР амплифицировали с использованием праймеров, перечисленных ниже, для получения ~2,1 т.п.н. фрагмента SEQ ID NO. 1 кодирующего протеин prME SEQ ID NO. 3. См. фиг. 3A.

FVFP: 5' AACTGCTCGAGGAATTCGGATCCAAC 3'

FVRP: 5' AATGGGCATGCCTGCAGGCGGCCGCTC 3'

Амплифицированные ПНР фрагменты были расщеплены рестрикционными ферментами EcoR1 и Not1 и клонированы в сайтах EcoR1 и Not1 плазмидного вектора pFastBac (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) под контролем полиэдрального промотора способами, описанными в руководстве пользователя Bac-Bac бакуловирусной системы экспрессирования ("An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins", Life Technologies, USA). Коротко говоря, способ использует сайт-специфическую транспозицию экспрессионной кассеты, такой как рекомбинантный вектор pFastBac с клонированными вставками, как описано выше, в бакуловирусный шаттл-вектор (bacmid), который распространяется в E.coli. Рекомбинантный вектор pFastBac, содержащий одну из вставок SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2, клонированных под контролем полиэдрального промотора, трансформируется в компетентные клетки E.coli с максимальной эффективностью

DN10Vac™, содержащий бакуловирусный шаттл-вектор (bMON14272) и хелперную плазмиду (pMON7124), облегчающую транспозицию, чтобы разрешить эффективное повторное получение рекомбинантной bacmid. Рекомбинантные bacmid были выбраны относительно ампициллина, гентамицина и канамицина, содержащие планшеты с использованием голубого/белого отбора с использованием bluо-gal или X-gal и IPTG. Рекомбинантные bacmids после подтверждения с использованием ПЦР относительно присутствия генных вставок были выделены по стандартным протоколам, описанным в указанном выше руководстве пользователя. Приблизительно 1 мкг bacmid ДНК использовали для трансфекции с липофектамом в *Spodoptera frugiperda* Sf9 клетках насекомых (Life Technologies, Carlsbad, USA), выращенных в сыворотке свободной от клеток насекомых среде. Способы, используемые для трансфекции, выделения и титрования P1 вирусных исходных растворов точно описаны в руководстве пользователя относительно Vac-Vac бакуловирусной системы экспрессирования, как указано выше. P1 исходные растворы серийно амплифицировали дважды для получения P3 исходных растворов с высоким титром для экспрессии рекомбинантных prME протеинов в Sf9 клетках. Бакуловирусные исходные растворы с высоким титром для экспрессии протеина prME SEQ ID NO. 3 экспрессировали в 25 мл суспензии культуры Sf9 клетки и затем систематически масштабировали вплоть до 125 мл на 500 мл колбу. Бакуловирусные инфицированные клетки из нескольких колб собирали через 72 ч после инфицирования, объединяли, промывали один раз 1×PBS, pH 7,6 и лизировали буфером для лизиса клеток, содержащим 10 mM фосфата, pH 7,6 с 50 mM NaCl, 1 mM PMSF и 5 mM ЭДТУ. Клеточный лизат центрифугировали при 20000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточного дебриса и супернатант концентрировали с использованием протеиновых концентраторов с 10 кДа мембранным отсечением. Концентрированный образец наслаивали на предварительно уравновешенном градиенте сахарозы от 20 до 60% и центрифугировали при 100000×g в течение 6-8 ч. Фракции, содержащие рекомбинантный мембранный протеин и протеин оболочки, выделяли и подтверждали, применяя вестерн-блоттинг (фиг. 3B) с использованием кроличьей MR766 поликлональной антисыворотки. Очищенный рекомбинантный протеин представляет собой последовательность современного азиатского генотипа вируса Зика, экспрессирующего с использованием гена последовательности SEQ ID NO. 1, кодирующего протеин SEQ ID NO. 3. Рекомбинантный ME протеин перекрестно взаимодействовал с MR766 антителами в Вестерн-блоттинге и в ELISA и был сформулирован как вакцинный антиген для исследования на мышах Balb/c, как описано в разделах ниже.

Пример 5. Вакцинные композиции.

Антиген вакцины против вируса Зика любого из указанных выше способов в предыдущих примерах исследовался относительно иммуногенности на лабораторных животных с и без адъювантов. Наблюдался высокий уровень связывания (>95%) с гидроксидом алюминия (Alhydrogel® 2%, Brenntag) как адъювантом, используемым в дозе в диапазоне от 0,1 до 1,5 мг алюминия (представлен в качестве гидроксида алюминия) на дозу даже в исследовании с высокой дозой антигена 40 мкг. Связывание было полным во всех концентрациях антигенов вируса Зика, а также вакцинных комбинациях с CHIKV и JE антигенами, обсуждаемых в следующих разделах, которые использовались для исследования на мышах. Связывание с гидроксидом алюминия осуществляли в течение 3 ч при температуре окружающей среды. Аликвоту композиции центрифугировали при 5000×g в течение 5 мин и супернатант исследовали относительно полноты связывания антигеном ELISA. Связывание антигена было полным, поскольку не был обнаружен в супернатанте с использованием ELISA. Буфер для адъювантных композиций представлял собой 10 mM фосфатный буфер, содержащий 154 mM NaCl, pH 7,40±0,2 и необязательно содержащий 1% сорбита и 0,5% L-глицина. Другие буферы, используемые для специфических композиций, приведены ниже. Адъюванты, представленные ниже, исследовались относительно сравнительной иммуногенности и во всех случаях концентрации предусмотрены на дозу вакцины. Инактивированный вирусный антиген Зика исследовали при 10 мкг на дозу:

- а) инулин (Orafti-HPX, Beneo) исследовали при 0,5 мг на дозу; γ-инулин получали способами, описанными в (Cooper и Steele, 1988);
- б) комбинация гидроксида алюминия и инулина. Комбинацию инулина и гидроксида алюминия, альгамулина, получали в соотношении 10:1 (10 мг/мл инулина:1 мг/мл алюминия в виде гидроксида алюминия), исследовали при 0,5 мг на дозу;
- в) мумарилдипептид (L18-MDP) (tlrl-Imdp, Invivogen) при 10 мкг на дозу;
- д) MPL (липид А, монофосфорил из *Salmonella enterica*, L-6895-1 МГ, Sigma Aldrich) при 25 мкг на дозу;
- е) комбинация с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) и 25 мкг MPL на дозу;
- ф) эмульсия масло-в-воде (OWEM1), содержащая 9,75 мг сквалена (S3626-100ML, Sigma Aldrich), 11,86 мг α-токоферола (T3251-5G, Sigma Aldrich), 4,58 мг твин-80 (61771205001730, Merck) в 10 mM фосфатного буфера, pH 7,4±0,2;
- г) эмульсия масло-в-воде 3 (OWEM2), содержащая 9,75 мг сквалена, 1,175 мг твин-80, 1,175 мг Span-85 (S7135-250ML, Sigma Aldrich) в 10 mM цитратном буфере, pH 7,0;
- х) поли-IC (полиинозиновая полицитидиловая кислота, калиевая соль, Cat. NO. P9582-5МГ, Sigma Aldrich) при 25 мкг на дозу;

- i) холекальциферол (Arachitol, Abbot) при 0,75 мг на дозу;
- j) резиквимод (SMJI0196-10МГ, Sigma Aldrich) + поли-IC, 25 мкг каждого;
- k) резиквимод (25 мкг) + эмульсия масло-в-воде 2, содержащая 9.75 мг сквалена, 1,175 мг твин-80, 1,175 мг Span-85 (S7135-250МЛ, Sigma Aldrich) в 10 Мм цитратном буфере, pH 7,0;
- l) алюминия 0,25 мг и 0,5 мг на дозу, предоставленную в виде гидроксида алюминия.

Все указанные выше композиции индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител, результаты изображены на фиг. 4. Отдельные компоненты указанных выше адъювантов и любого из их аналогов, производных, замещенных боковых цепей и каких-либо модификаций любого из указанных выше компонентов при варьировании концентраций могут использоваться в качестве нетоксичных вакцинных адъювантных компонентов при условии, что они имеют иммунопотенциальный эффект. Инактивированные формалином и рекомбинантные вакцинные антигены Зика, как описано в указанных выше разделах, каждый в концентрации от 10 мкг на дозу, были лиофилизированы в комбинации с одним из следующих эксципиентов: 1% маннит и 0,5% глицин, 5% сахароза и 1% трегалоза, 5% сахароза и 1% мальтоза, 2% маннит и 0,5% глицин. Сухая лиофилизированная композиция может быть легко восстановлена в водном растворе с водой, нормальным солевым раствором и 10 мМ фосфатным буферным солевым раствором, pH 7,4±0,2. Стабильность композиции исследовали при 37°C в течение двух недель. Никаких изменений в характеристиках коржа не наблюдалось, что свидетельствует о стабильности композиций. Содержание влаги составляло ниже 1%.

Пример 6. Влияние стабилизирующих агентов.

Стабильность инактивированной формалином вакцины, основной для применения в качестве неадъювантного вакцинного антигена, исследовали относительно стабильности с последующей концентрацией стабилизирующих агентов: а) 2% сорбит и 1% L-глицин; б) 1% сорбит и 0,5% L-глицин; в) 1% маннит и 0,5% L-глицин; г) 1% маннит и 0,5% L-глутаминовая кислота; е) 1% сорбит и 0,5% L-глицин, 1% альбумин сыворотки человека. Исследования стабильности осуществляли при 37°C в течение 2 недель, концентрацию антигена исследовали с использованием ELISA перед и после экспозиции при 37°C. 1 мкг и 10 мкг неадъювантной композиции с 1% сорбита и 0,5% L-глицина исследовали относительно иммуногенности на мышах Balb/c, как обговаривалось в следующих разделах.

Пример 7. Исследование эффективности вакцинных композиций в моделях на животных.

Вакцинный антиген Зика, инактивированный указанными выше способами, исследовали на мышах Balb/c с дозами в диапазоне от 0,125 мкг вплоть до 40 мкг антигена на дозу с 0,25 мг алюминия на дозу (в виде гидроксида алюминия) в объеме 100 мкл (инъекции в два места по 50 мкл на место) внутримышечным способом в дни 0, 14, 28. Первоначальное исследование относительно эффекта алюминия (представленного в виде гидроксида алюминия) показало, что адсорбированная на алюмокалиевых квасцах вакцина давала более высокий титр нейтрализующих антител, чем неадъювантная вакцина. Приблизительно 1 и 10 мкг инактивированного вакцинного антигена без алюмокалиевых квасцов содержал 1% сорбита и 0,5% L-глицина в качестве эксципиентов, для обеспечения стабильности вакцинных антигенов. Кровь была взята из ретроорбитального синуса на 13, 21 и 35-й день для оценки титров нейтрализующих антител с использованием PRNT50, общий Ab титр с использованием ELISA, Ab avidность и профили цитокинов. Отбор крови и исследование после каждой дозы давало данные относительно эффективности и безопасности однократного введения, двух доз и трех доз вакцинных препаратов. Животные в каждом случае были контрольно заражены на 36-й день 10e5 PFU вирусом Зика внутривенным способом. Образцы крови контролировали в течение вплоть до 7 дней с 24-часовыми интервалами для группы формалина и в двух точках в 48 ч и 96 ч для группы инактивации BPL для защиты от вирусемии TCID₅₀ (50% доза инфекции культуры ткани) и вирусные титры, если какой-либо присутствует, были выражены как TCID₅₀/мл. Исследование контрольного заражения животных показали полную защиту от вирусемии при от 1 до 40 мкг дозы в исследуемых группах. Следовательно, инактивированные BPL и формалином вакцинные композиции дополнительно исследовали в количестве 0,5, и 0,25, 0,125 мкг на дозу в.м. способом мышам Balb/c и, как было обнаружено, является иммуногенным даже при малых разведениях. Для адъювантных алюмокалиевыми квасцами композиций 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу использовалась в качестве контроль-плацебо и для неадъювантных композиций, 10 мМ фосфатный буфер, содержащий 154 мМ NaCl, 1% сорбита и 0,5% L-глицина, pH 7,40 использовался в качестве контроля носителем. Все инактивированные формалином и BPL композиции индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител и защищали от вирусемии, как показано на фиг. 5А, 5В и 6. Только антигенные композиции также индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител и защищали при вирусном контрольном заражении. Рекомбинантный протеин prME, экспрессированный в клетках насекомых, был сформулирован в двух дозах 10 и 20 мкг на дозу с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу у Balb/c (8 мышей) и инъекционно вводили внутримышечно на 0-й день и 21-й день индуцировали нейтрализующие антитела, данные представлены в таблице. γ-Облученный и инактивированный пероксидом водорода вирусный антиген Зика в дозовой концентрации 10 мкг, сформулированный с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу, инъекционно вводили в.м. способом мышам Balb/c на 0-й и 21-й день, кровь брали на 28-й день для оценки нейтрализующих антител с помо-

щью PRNT50. Инактивированный формалином вирусный антиген в количестве 10 мкг был сформулирован с каждым из адъювантов, раскрытых в примере 5, и его инъекционно вводили внутримышечно мышам Balb/c в возрасте 4-6 недель (5 мышей на группу дозирования), кровь брали через 21 день после введения вакцины для оценки нейтрализующих антител и цитокинов. Контрольные группы были включены для каждого из адъювантов, и никакие нейтрализующие антитела (≤ 10 по PRNT50) не могли быть детектированы, данные не отображаются. Нейтрализующие титры антител по PRNT50 различных адъювантных композиций, использованные сгруппированные сыворотки из каждой группы, представлены на фиг. 4. Высокий уровень нейтрализующих антител был индуцирован указанными выше адъювантными композициями.

Комбинированные вакцины антигенов арбовируса получали со следующими концентрациями и исследовали на мышах Balb/c: а) 10 мкг инактивированного формалином вирусного антигена Зика, 20 мкг инактивированного BPL антигена вируса Чикунгунья и 6 мкг инактивированного формалином антигена JE в трехвалентной вакцинной комбинации; б) 10 мкг инактивированного формалином вирусного антигена Зика и 20 мкг инактивированного BPL антигена вируса CHIKV; с) 10 мкг инактивированного формалином вирусного антигена Зика и 6 мкг антигена вируса JE. Все перечисленные выше вакцинные комбинации исследовали с 0,25 мг алюминия (в виде гидроксида алюминия) на дозу мышам Balb/c (8 мышей каждая) с соответствующими контролями, в которые включены или указанные выше антигены самостоятельно и также контрольные животные, получающие эквивалентное количество алюмокалиевых квасцов. Животных повторно иммунизировали на 14-й и 21-й день после первой иммунизации. Кровь брали через 7 дней после последней инъекции. Образцы сыворотки использовали для оценки нейтрализующих антител с помощью PRNT50 для Зика, CHIKV и JE. Буфер, используемый во всех композициях, представлял собой 10 мМ фосфатный буфер, pH от 7,2 до 7,6, содержащий 154 мМ NaCl. Все способы, раскрытые выше, применимы к любому генотипу/генотипных вариантов/серотипов и штаммов вируса Чикунгунья, вируса Зика и вирусов японского энцефалита. См. таблицу относительно результатов.

Нейтрализующие антитела индуцировали с использованием различных антигенных композиций, как раскрыто в примерах

Группы исследования	Титры нейтрализующих антител как Log10PRNT ₅₀		
	Зика а	CHIKV	JE
Рекомбинантный rgME Зика – 10 мкг x 2 дозы	2,8	-	-
Рекомбинантный rgME Зика – 20 мкг x 2 дозы	3,22	-	-
Инактивированный пероксидом водорода антиген Зика – 10 мкг x 2 дозы	2,6	-	-
Гамма облученный антиген Зика 10 мкг x 2 дозы	2,71	-	-
Зика адсорбированный на алюмокалиевых квасцах – 10 мкг x 3 дозы	3,06	-	-
Чикунгунья адсорбированный на алюмокалиевых квасцах – 20 мкг x 3 дозы	-	2,808	-
JE адсорбированный на алюмокалиевых квасцах – 6 мкг x 3 дозы	-	-	3,06
Зика (10 мкг) + CHIKV (20 мкг) x 3 дозы	2,95	2,68	-
Зика (10 мкг) + JE (6 мкг) x 3 дозы	2,80	-	3,28
Зика (10 мкг) + CHIKV(20 мкг) + JE (6 мкг) x 3 дозы	2,79	2,63	3,21

Таблица. Легенда. Очищенный рекомбинантный rgME антиген вируса Зика и инактивированные пероксидом водорода и γ -облученные антигены вируса Зика, сформулированные с 0,25 мг алюминия на дозу, индуцировали нейтрализующие антитела у мышей Balb/c. Титры выражаются в виде значения Log10PRNT50. Вакцинные комбинации индуцировали нейтрализующие антитела, когда два или более антигенов были введены в одну композицию, и никакой значительной антигенной интерференции не наблюдалось между вирусами JE, Зика и CHIKV.

Пример 8. Исследование пассивной иммунизации.

Доказательство концепции, что нейтрализующие антитела являются важными иммунными коррелятами защиты против вирусной инфекции Зика, было продемонстрировано однократной инъекцией кроличьей поликлональной антисыворотки Зика с известным титром, приблизительно 200 мкл антисыворотки, разбавленного 1:1 с PBS инъекционно внутрибрюшинно вводили мышам Balb/c и были контрольно заражены через 8-24 ч после 10^5 PFU вируса Зика внутривенным способом в объеме 100 мкл. Одинаковое количество контрольных животных получало PBS, pH 7,4 и получало инъекцию вируса в качестве

исследуемых животных. Кровь брали через 24, 48, 72, 96 и 144 ч после вирусного контрольного заражения для обнаружения вирусемии в обеих группах животных. Пассивная иммунизация осуществляла полную защиту против вирусемии, и инфекционный вирус не мог быть обнаружен с использованием TCID₅₀. См. фиг. 7. Вирусемия была обнаружена у контрольных животных, которые сохранялись в течение вплоть до 6 дней после вирусного контрольного заражения. Антитела Зика могут использоваться в качестве терапевтических средств для смягчения, уничтожения или предотвращения вирусных инфекций Зика.

Пример 9. Анализы титров нейтрализующих антител.

Сыворотки животных из всех указанных выше исследований вакцины у мышей, описанных в примере 7, включающие все моновалентные вакцины Зика, инаktivированные различными инаktivирующими агентами и сформулированные с различными адъювантами, вакцинные антисыворотки из дозы, находящейся в диапазоне от исследований, а также комбинированные вакцины с CHIKV и JEV, описанные в предыдущих разделах, анализировали для нейтрализующих антител относительно 50% реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT₅₀) по стандартизированным процедурам. Коротко говоря, за один день до анализа 6-луночные планшеты высевали с $2,5 \times 10^3$ клетками Vero (ATCC CCL-81) на лунку и планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. До 4-кратных разбавлений образцов сыворотки в MEM, содержащие одинаковый объем стандартизированного штамма вируса Зика (10 pfu/мл), добавляли и инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 90 мин. Клетки промывали дважды 1×PBS pH 7,4 (10 mM фосфата с 150 mM NaCl) и добавляли 0,30 мл каждого разбавления смеси сыворотка-вирус в соответствующие лунки и инкубировали в течение 90 мин при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. Каждый анализ осуществляли в трех повторах. Клетки были наложенными на 2 мл 0,85% метилцеллюлозы в MEM с 1% пенициллина-стрептомицина и 1% L-глутамина. Планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 4 дней. В конце инкубирования бляшки фиксировали 10% формалина, промывали 1×PBS, pH 7,4 и визуализировали с 0,1% кристаллическим фиолетовым. Высшее разбавление сыворотки, что приводило к 50% уменьшению количества бляшек, сформированных контрольным образцом вируса оценивали как титр PRNT₅₀. Анти-CHIKV и анти-JEV антитела из вакцинных комбинаций также оценивали PRNT₅₀. Все указанные выше вакцинные антигены индуцировали высокий уровень нейтрализующих антител, как изображено на фиг. 5 и 6.

Пример 10. Исследование перекрестной нейтрализации вируса Зика.

Инаktivированные формалином вакцинные антисыворотки перекрестно нейтрализованы гомологичным штаммом вируса MR766 африканского генотипа и штаммом FSS13025 вируса Зика (GenBank Acc No. JN860885) азиатского генотипа с одинаковой эффективностью титров PRNT₅₀ 18105 и 18325 против штаммов MR766 и FS13025 соответственно (исследования BS-3018 были предусмотрены контрактом IBT Bioservices, Gaithersburg, MD, USA). Коротко говоря, как MR766, так и штаммы FS13025 вируса Зика разбавляли до ~250 PFU в среде без сыворотки. Как вакцинные антисыворотки, так и контрольные сыворотки (плацебо) серийно разбавляли в двукратных делениях. Вирусные образцы смешивали 1:1 с серийно разбавленными образцами сыворотки и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Клетки Vero, высеванные в 24-луночные планшеты, инфицировали разбавлениями в течение 1 ч и 0,85% метилцеллюлозы добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 3 дней. Клетки фиксировали и анализировали с использованием анализа бляшек. Планшеты сканировали и количество бляшек использовали для расчета титров PRNT₅₀ с использованием кривой 4PL. Следовательно, способ получения вакцинного антигена, формуляции и исследования вполне перекрестно применимы к любому генотипу вируса Зика, как вакцины с одним генотипом 100% перекрестно нейтрализуют гетерологичный штамм, и это также доказывает, что никаких серотипов вируса Зика не существует и что инаktivированная вакцина Зика с использованием любого штамма будет одинаково защитной и эффективной как вакцина, полученная с использованием любого генотипа, и генотипического варианта или, более того, любого штамма вируса Зика. Данный факт был дополнительно подтвержден, когда антитела, индуцированные против рекомбинантного протеина, экспрессировали как rgME (протеин SEQ ID NO. 3) в клетках насекомых, перекрестно нейтрализованных вирусом MR766 с высокой эффективностью. Протеин SEQ ID NO. 3 получен из rgME африканского генотипа штамма вируса Зика H/PF/013, который является более современным штаммом азиатского генотипа. Перекрестная нейтрализация вакцинной антисыворотки гомологического штамма MR766 нуклеотидной SEQ ID NO. 5, кодирующая полный ORF с SEQ ID NO. 6 и гетерологичный FSS13025 с SEQ ID NO. 7, кодирующая полный ORF с SEQ ID NO. 8, изображены на фиг. 8A и 8B.

Пример 11. ELISA для антител.

Коротко говоря, вирусный антиген Зика был нанесен со стандартизированной концентрацией в буфере для покрытия в 96-луночных планшетах в течение ночи при от 2 до 8°C. Содержание планшета отбрасывали и лунки блокировали блокирующим буфером и интенсивно промывали перед добавлением вакцинных антисывороток при серийных разбавлениях. Каждую вакцинную антисыворотку анализировали в трех повторах. Планшеты инкубировали в течение 90 мин при 37°C перед добавлением вторичного антитела (антимышиный-IgG HRPO конъюгат), разбавленного 1:2500 в буфере для разбавления анти-

тела. Каждую из лунок промывали пять раз промывочным буфером (PBST, pH 7,4) и три раза PBS (pH 7,4) каждые 30 с. Добавляли приблизительно 100 мкл/лунку свежеполученного субстратного раствора и инкубировали при температуре окружающей среды в течение 10 мин для развития цвета. Развитие цвета останавливали добавлением 50 мкл/лунку раствора для остановки. Поглощение считывали на 492 нм, результаты были записаны. Для каждого анализа были включены антигенный контроль, контроли первичного и вторичного антитела в качестве контролей. Значение отсечения сероконверсии=средний титр перед экспозицией + (3×стандартное отклонение). Идентифицированными были разбавления конечной точки положительно сероконвертированного образца, который показывает титр, эквивалентный уровню перед экспозицией. Обратная зависимость предпоследнего разбавления конечной точки положительно сероконвертированного образца интерпретировали как титр конечной точки антитела. Титры антител как инаktivированных BPL, так и инаktivированных формалином вакцинных композиций Зика были более высокими с гидроксидом алюминия, чем с антигенами самостоятельно. Вакцинные композиции, инаktivированная формалином вакцина во всех дозах (фиг. 9А-9С) и все дозы инаktivированной BPL вакцины (данные не показаны) индуцировали высокий уровень антитела после введения каждой дозы вакцины, что подтверждает, что вакцина может вводиться в качестве однократной дозы или двумя или более дозами для индуцирования надежного иммунного ответа против вируса Зика.

Пример 12. Авидности антител.

Качество антителных ответов на вакцину оценивали с использованием анализов авидности антител. Авидности связывания антиген-антитело представляют собой степень созревания аффинности в В-клетках. Более высокие авидности антитела коррелируют с нейтрализующими антителами в нескольких вакцинных исследованиях. Перед определением индекса авидности проводили титрование изотиоцианатом натрия (NaSCN) с концентрацией от 0 до 6 М в 0,25 М ступени от 0 до 2,0 М. После добавления и инкубирования первичной антисыворотки в планшеты, покрытые антигеном, планшеты инкубировали с калиброванными концентрациями NaSCN в течение 15 мин с периодическим перемешиванием, промывали и развивали, как в обычном ELISA. Полученные оптические плотности для каждой из концентраций наносили на график. Самый высокий показатель OD (A) был нанесен на график и поделен пополам (A/2), расстояние между кривыми OD при A/2 измерялось как значение смещения NaSCN. Смещение NaSCN было более высоким после первой бустерной дозы по сравнению с основной дозой и оставалось статичным или немного увеличивалось после введения второй бустерной дозы, что свидетельствует о том, что антитела с высокой аффинностью развиваются со временем и с инъекциями бустеров. Референтной точкой в титровании ELISA была взята для вычисления индекса авидности, (AI), которая представляет собой соотношение концентрации антитела (измеряемого поглощением) в ELISA, детектировали образцы сыворотки, обрабатывали с и без агента, который вызывает диссоциацию комплексов NaSCN. Даже при низкой концентрации однократной дозы 1 мкг инаktivированной формалином вакцины Зика детектировали антитела с высокой аффинностью связывания с антигеном, что свидетельствует о том, что вакцина является сильной даже при низких концентрациях вакцинного антигена (см. фиг. 10).

Пример 13. Профилирование цитокинов.

Как Th1, так и Th2 цитокины оценивали в мышинных сыворотках после введения двух доз инаktivированного формалином антигена Зика, сформулированного с различными адъювантами, включающими гидроксид алюминия и только в антигенных контролях для сравнения. Мышинный набор ELISA - Th1/Th2 (Catalog No. 88-7711-44, eBioscience) использовали для оценки IL-2, IFN- γ , IL-4 и IL-10 способами точно такими же, как в протоколах к набору с использованием стандартов, предоставляемых в наборе. Концентрация цитокинов выражается в пг/мл. Результаты относительно уровней цитокина Th1 изображены на фиг. 11А и 11В и цитокинов Th2 на фиг. 12А и 12В.

Пример 14. Оценка титров вирусов.

Количество инфекционных вирусных частиц в образцах биопроцесса в обратном направлении и в прямом направлении, титры вируса Зика для исследований контрольного заражения животных измеряли, применяя анализ TCID₅₀ (50% доза инфекции культуры ткани). Данный анализ измеряет разбавление образца вируса, который генерирует цитопатический эффект (CPE) у 50% клеток. Клетки Vero высевали в 96-луночные микропланшеты и инкубировали в 5% CO₂ при 37°C в течение ночи. Клетки инфицировали 10-кратными серийными разбавлениями образца вируса, с последующим инкубированием в течение 5 дней в 5% CO₂ при 33°C. Клетки визуально обследовали по CPE, титр TCID₅₀ рассчитывался согласно способу Рида и Мюнча (ссылка). Результаты представлены как log₁₀ титра (10×TCID₅₀ ед./мл). Альтернативно использовали анализы бляшек, и титры выражали в качестве бляшкообразующих единиц, PFU/мл.

Ссылки.

1. Cooper P.D., Steele E.J. The adjuvanticity of gamma inulin. *Immunol Cell Biol.* 1988, 66:345-52.
2. Reed L.J. Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* (1938) 27(3): 493-497.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция против вируса Зика, содержащая антиген вируса Зика в количестве от 0,125 до 100 мкг, где указанный антиген вируса Зика выбран из инаktivированного цельного вириона (вируса) и очищенного рекомбинантного антигена вируса Зика, фармацевтически приемлемый буфер и алюминия гидроксид в концентрации в диапазоне от 0,1 до 1,5 мг алюминия, где очищенный рекомбинантный антиген вируса Зика имеет структурные протеиновые последовательности, раскрытые в SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4.

2. Вакцинная композиция по п.1, причем композиция является эффективной против любого генотипа/генотипных вариантов/штаммов/синтетических вирусов Зика, имеющих в любом случае от 50 до 100% идентичности на аминокислотном уровне в любом участке генома.

3. Вакцинная композиция по п.2, содержащая антигены вируса Зика любого генотипа/генотипного варианта/штаммов/синтетического вируса Зика, причем антитела против какого-либо из указанных выше типов вируса Зика перекрестно нейтрализуют гомологический вирус или любой гетерологичный штамм вируса Зика, который имеет по меньшей мере 50-100% аминокислотную идентичность в любом участке всего своего генома, в частности протеина оболочки E.

4. Вакцинная композиция по п.1, причем вирусный антиген Зика получают с использованием клеток Vero в качестве клеточного субстрата путем адаптации вируса к клеткам Vero.

5. Вакцинная композиция по п.1, причем указанный вирусный антиген Зика представляет собой очищенный и концентрированный антиген, полученный одним или несколькими способами, выбранными из

- a) ультрацентрифугирования;
- b) центрифугирования по градиенту плотности;
- c) осветления собранных вирусных клеток с использованием мембранной фильтрации с последующей очисткой с использованием колоночной хроматографии;
- d) тангенциальной текущей фильтрации с использованием мембран с отсечением от 100 до 300 кДа, причем тангенциальную фильтрацию осуществляют или перед, или после инаktivации вируса.

6. Вакцинная композиция по п.5, причем указанная очистка с использованием колоночной хроматографии включает гель-фильтрацию, колоночную хроматографию со смешанным режимом смолы, ионообменную колоночную хроматографию, афинную матричную хроматографию и хроматографию с гидрофобными взаимодействиями.

7. Вакцинная композиция по п.6, причем колоночная хроматография элюирует большинство антигена вируса в потоке, таком как Carto Core 700, наиболее предпочтительно Carto Core 700, причем вирусный образец очищен на колонке Carto Core 700 и элюирован в потоке.

8. Вакцинная композиция по п.1, причем вирус Зика инаktivирован по меньшей мере одним или несколькими из химических инаktivирующих агентов, физическими инаktivирующими агентами и облучающими агентами.

9. Вакцинная композиция по п.8, причем инаktivацию вируса Зика осуществляют перед или после очистки вируса.

10. Вакцинная композиция по п.9, причем вирус Зика инаktivирован химическим инаktivирующим агентом, выбранным из формалина (формальдегида), β -пропиолактона (BPL) и пероксида водорода.

11. Вакцинная композиция по п.10, причем вирус Зика инаktivирован каким-либо одним из следующих способов, выбранных из

e) обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус, при от 8 до 37°C, предпочтительно 25±3°C, в течение по меньшей мере от 1 до 7 дней;

f) обработки формалином при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. формалин:вирус, при от 2 до 8°C в течение по меньшей мере от 10 до 30 дней;

g) β -пропиолактона (далее BPL) при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 об./об. BPL:вирус, в течение по меньшей мере от 24 до 48 ч при температуре, которая находится в диапазоне от 8 до 30°C, предпочтительно 25±3°C, в течение 48 ч;

h) β -пропиолактона при любой концентрации, которая находится в диапазоне от 1:500 вплоть до 1:4000 (BPL:вирус, об./об.), при от 2 до 8°C в течение по меньшей мере 3-7 дней;

i) комбинации с BPL и формалином при любом из указанных выше условий, предпочтительно BPL инаktivация при 1:3000 (BPL:вирус, об./об.) в течение 24 ч с последующей инаktivацией формалином при 1:3000 (формалин:вирус, об./об.) в течение от 24 до 48 ч при от 15 до 30°C, предпочтительно 25±3°C;

j) пероксида водорода при любой концентрации от 0,1 до 3%, предпочтительно от 0,1 до 1%, при любой температуре от 20 до 30°C в течение от 5 до 120 мин.

12. Вакцинная композиция по п.8, причем инаktivация вируса Зика облучающим агентом включает инаktivацию γ -облучением путем экспозиции от 20 кГр вплоть до 35 кГр, предпочтительно от 25 до 30 кГр из ^{60}Co источника.

13. Вакцинная композиция по п.8, причем инактивация вируса Зика облучающим агентом включает инактивацию облучением УФ за счет экспозиции на 254 нм в течение 30-60 мин.

14. Вакцинная композиция по п.8, причем вирус инаktivирован путем термической обработки при температуре от 50 до 65°C в течение от 30 мин вплоть до 2 ч.

15. Вакцинная композиция по п.1, причем буфер выбран из перечня, включающего фосфатный буфер, цитратный буфер, фосфатно-цитратный буфер, боратный буфер, буфер, содержащий три(гидроксиметил)аминометан (Tris), сукцинатный буфер, буферы, содержащие глицин или гистидин, в качестве одного из буферных агентов.

16. Вакцинная композиция по п.15, причем фосфатный буфер представляет собой натрий-фосфатный буфер в концентрации от 5 мМ вплоть до 200 мМ фосфатных ионов при любом pH от 6,50 до 9, необязательно, содержащий натрия хлорид в концентрации от 50 до 200 мМ.

17. Вакцинная композиция по п.1, причем буфер поддерживает pH в жидкой композиции выше 6,5, предпочтительно выше 7,0 по всему биопроцессу от вирусной культуры вплоть до получения очищенного и инаktivированного основного вируса.

18. Вакцинная композиция по п.8, причем инактивацию вируса Зика осуществляют в присутствии стабилизирующего агента, выбранного из лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, маннозы, изомальтозы, рафинозы, стахиозы, лактобиозы, сорбита, маннита, лактобионовой кислоты, декстрана, L-глицина, L-гистидина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и альбумина сыворотки человека или их комбинаций.

19. Вакцинная композиция по п.18, причем стабилизирующий агент выбран из

- a) 2% сорбита и 1% L-глицина;
- b) 1% сорбита и 0,5% L-глицина;
- c) 1% маннита и 0,5% L-глицина;
- d) 1% маннита и 0,5% L-глутаминовой кислоты;
- e) 1% сорбита и 0,5% L-глицина, 1% альбумина сыворотки человека.

20. Вакцинная композиция по п.8, причем инактивация вируса Зика включает инактивацию любого генотипа/штамма, живого ослабленного вируса Зика, дезактивированного вируса, вирусоподобных частиц, химерных вирусных частиц, несущих любые антигены вируса Зика, в частности E протеин, в каком-либо гетерологичном вирусном скелете, в векторных вакцинах и инфекционных синтетических вирусных частицах, полученных *in vitro* или *in vivo* с использованием последовательности генома любого вируса Зика.

21. Вакцинная композиция по п.1, причем очищенный рекомбинантный вирус Зика содержит антигены вируса Зика, содержащие протеин оболочки (E), мембранный (M) протеин и необязательно неструктурный 1 (NS1) протеин в качестве вакцинных антигенов для индуцирования иммунного ответа для профилактики вирусных инфекций Зика.

22. Вакцинная композиция по п.21, причем вирус Зика имеет структурные протеиновые последовательности, как раскрыто в SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4, что соответствует нуклеотидным последовательностям SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2 соответственно, для применения в качестве вакцинных антигенов против вирусных инфекций Зика, вызванных генотипами или их вариантами.

23. Вакцинная композиция по п.1, причем рекомбинантные ДНК конструкторы содержат (i) вектор, (ii) по меньшей мере один фрагмент нуклеиновой кислоты, который соответствует SEQ ID NO. 1 или SEQ ID NO. 2, кодирующей аминокислотную последовательность протеинов SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4 соответственно, который применим к какой-либо протеиновой последовательности вируса Зика, имеющей по меньшей мере 70% аминокислотную идентичность к указанным выше SEQ ID NO. 3 и SEQ ID NO. 4.

24. Вакцинная композиция по п.23, содержащая рекомбинантный ДНК конструктор, причем вектор представляет собой эукариотический плазмидный вектор, клонированный в эукариотическом хозяине, таком как бакуловирус для экспрессии в клетках насекомых, как в вирусоподобных частицах (VLP).

25. Вакцинная композиция по п.21, причем рекомбинантный протеин вируса Зика получен способом, включающим стадии

- a) трансфекция рекомбинантной плазмидной ДНК в клетках насекомых;
- b) сбор клеток и выделение рекомбинантного протеина из них;
- c) очистка протеина способом, выбранным из ионообменной хроматографии, гель-фильтрации, афинной хроматографии, гидрофобной колоночной хроматографии, хроматографии со смешанным режимом смол, диафильтрации, ультрацентрифугирования, центрифугирования по градиенту плотности и фракционирования с солью.

26. Вакцинная композиция по п.1, причем структурные антигены вируса Зика экспрессируются в какой-либо прокариотической или эукариотической системе экспрессирования, включающей экспрессию, опосредованную бакуловирусом в клетках насекомых.

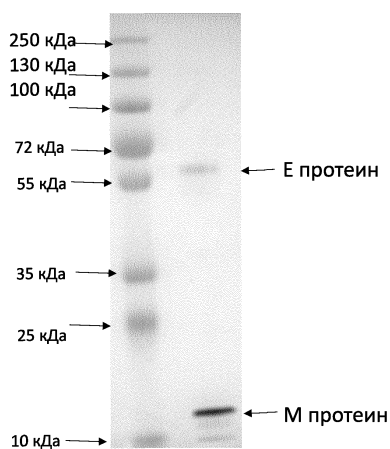
27. Вакцинная композиция по п.1, причем композиция получена способом, причем нейтрализующие антитела в значительной степени индуцируются против протеина оболочки, например, в оптимально инаktivированном вирусе, живом ослабленном вирусе, дезактивированном вирусе, ДНК вакцине, виру-

соподобных частицах, химерных вирусных частицах, демонстрирующих протеин Е вируса Зика в любом гетерологичном вирусном скелете, таком как в векторных вакцинах и синтетических вирусных частицах, полученных из любой геномной РНК последовательности вируса Зика.

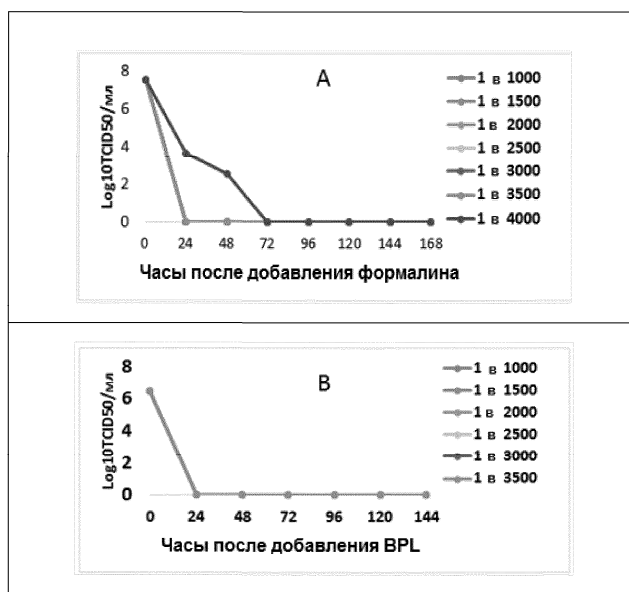
28. Вакцинная композиция по п.1, причем композиция является приемлемой для какого-либо из способов введения, включая внутримышечный, интрадермальный, подкожный, внутривенный, пероральный, интраназальный или транскутанный способы введения, с применением игл или шприцев, включая предварительно заполненные шприцы, микроигольный пластырь, безыгольный пластырь, ингаляционные и назальные спреи.

29. Вакцинная композиция по п.1 при введении в одноразовой дозе или двумя или более дозами у млекопитающих вызывает как Th1, так и Th2 иммунный ответ против вируса Зика.

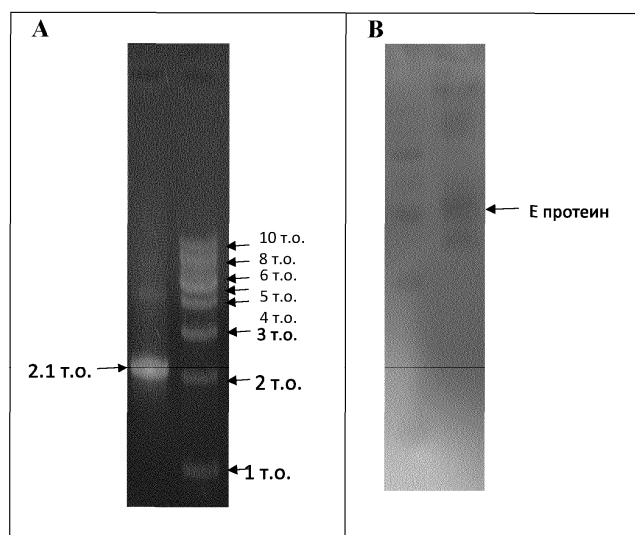
30. Вакцинная композиция по п.1, причем композиция вводится прайм-буст стратегией, причем первичной является кандидатная инактивированная вакцина, и буст является или той же вакциной, или какой-либо иной вакциной, такой как ДНК вакцина, вакцина химерного вируса Зика, вирусоподобная частица, дезактивированная вакцина Зика, живая ослабленная вирусная вакцина, рекомбинантная субъединичная вакцина, векторная вакцина или какая-либо вакцина, полученная из синтетического вируса Зика, причем нейтрализующие антитела в каждом из них индуцируются против протеина оболочки вируса Зика.



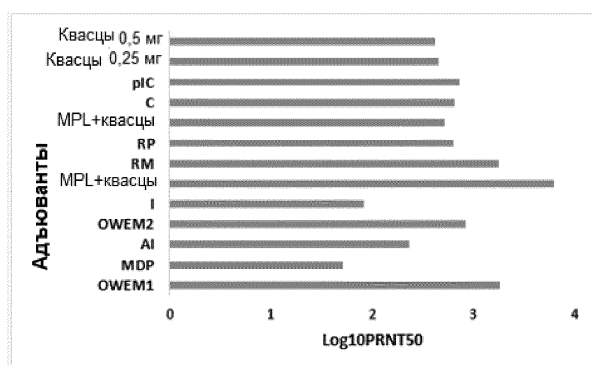
Фиг. 1



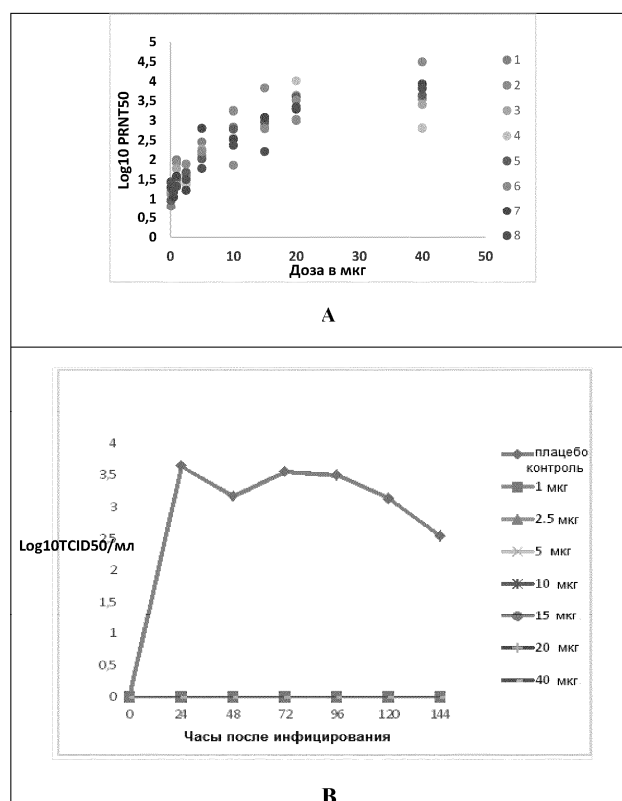
Фиг. 2



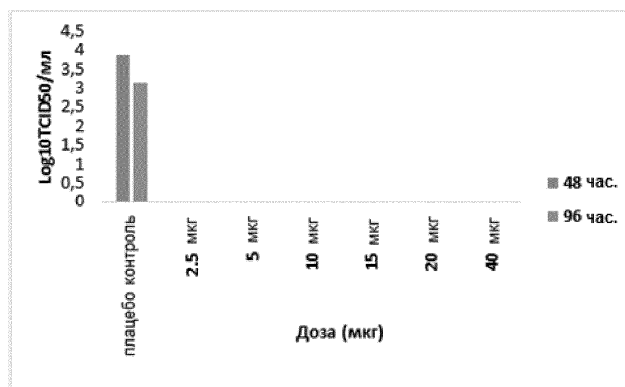
Фиг. 3



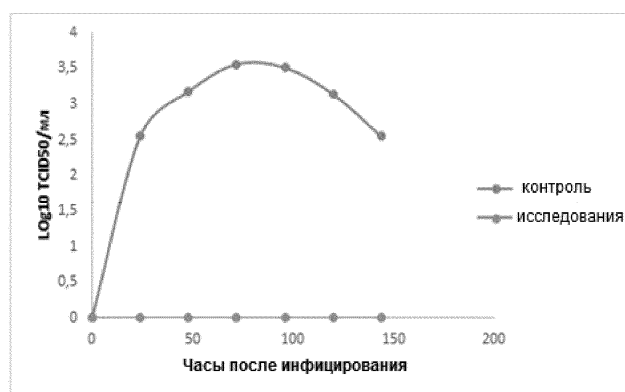
Фиг. 4



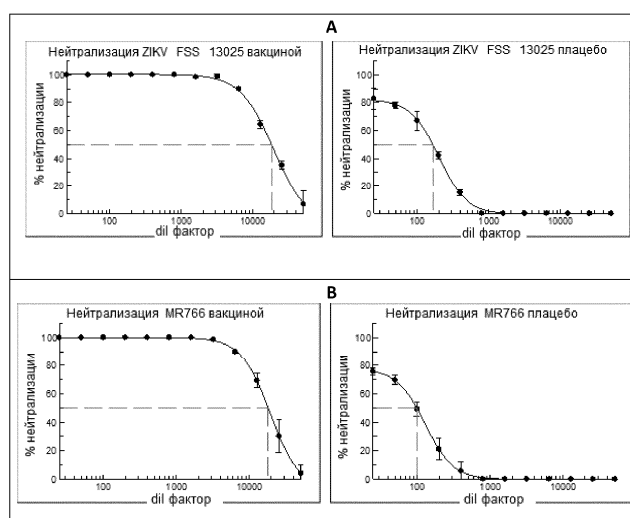
Фиг. 5



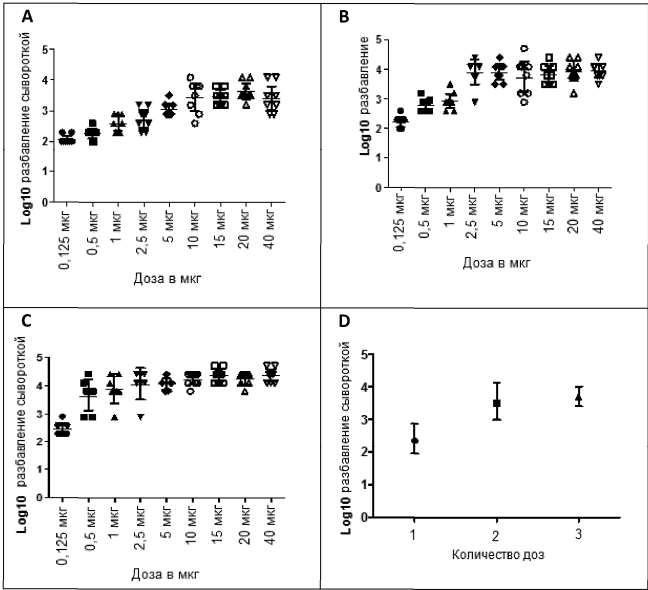
Фиг. 6



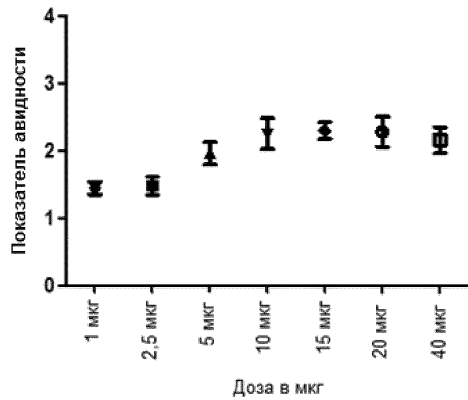
Фиг. 7



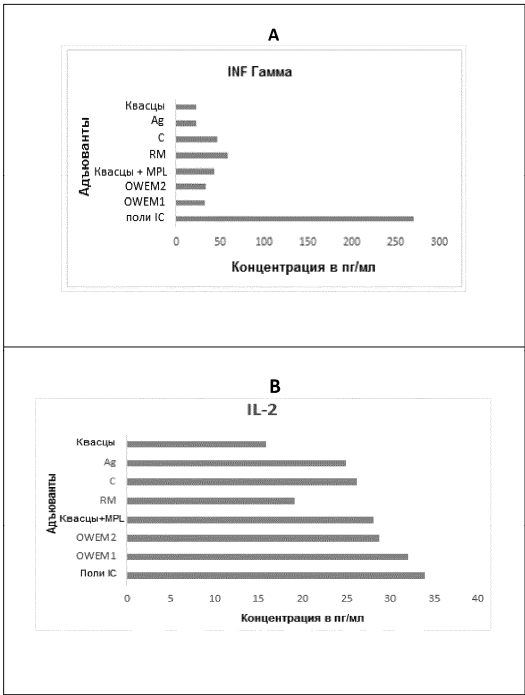
Фиг. 8



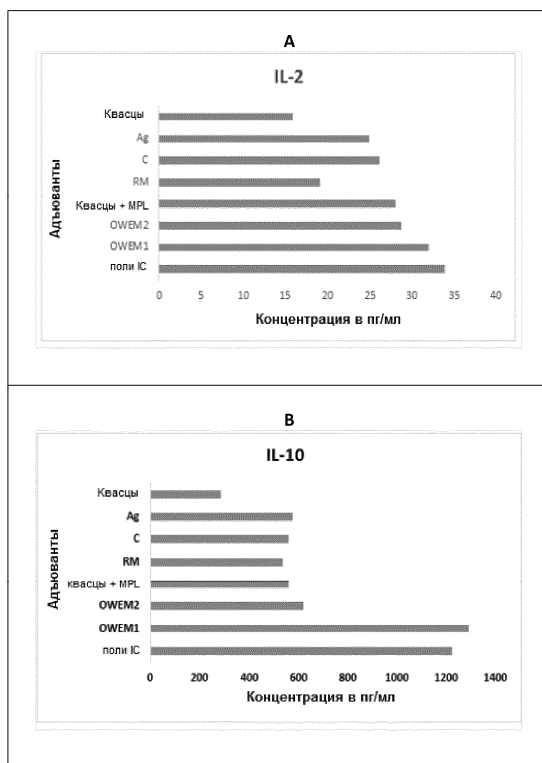
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

