

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091398** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2020.09.01**

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61K 47/26* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/14* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.12.03**

**(54) СОСТАВЫ ВАКЦИННЫХ КОМПОЗИЦИЙ ОТ ВИРУСА ДЕНГЕ**

(31) **62/595,842**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.12.07**

**Райан Майкл С., Мартин Шерри-**

(33) **US**

**Энн П., Джоунз Морриса, Станбро**

(86) **PCT/US2018/063541**

**Джастин, Бхамбхани Акхилеш, Блю**

(87) **WO 2019/112921 2019.06.13**

**Джеффри Томас, Пиксли Хайди**

(71) Заявитель:

**Джоан, Грин-Трекслер Эрин Дж.,**

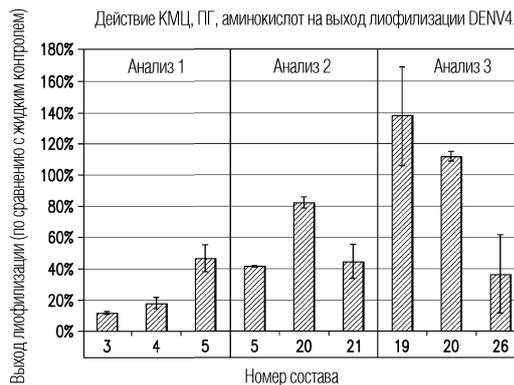
**МЕРК ШАРП И ДОУМ КОРП. (US)**

**Исопи Линн Энн (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к составам вакцины от вируса денге, содержащим по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге или живой аттенуированный химерный флавивирус, буфер, сахар, производное целлюлозы или гликоль или сахарный спирт, необязательно щелочную или щелочноземельную соль и аминокислоту; и составы вакцины от вируса денге, содержащие по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге или живой аттенуированный химерный флавивирус, буфер, сахар в количестве по меньшей мере 150 мг/мл, носитель и, необязательно, щелочную или щелочноземельную соль и аминокислоту.



**202091398**  
**A1**

**202091398**  
**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563108EA/032

### СОСТАВЫ ВАКЦИННЫХ КОМПОЗИЦИЙ ОТ ВИРУСА ДЕНГЕ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к составам вакцины от вируса денге, содержащим по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге или живой аттенуированный химерный флавивирус, буфер, сахар, производное целлюлозы и сахарный спирт или гликоль и, необязательно, аминокислоту и щелочную или щелочноземельную соль; и составы вакцины от вируса денге, содержащие по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге или живой аттенуированный химерный флавивирус, буфер, сахар, по крайней мере, 150 мг/мл, носитель и, необязательно, щелочную или щелочноземельную соль или щелочную или щелочноземельную соль и аминокислоту.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Семейство *Flaviviridae* включает прототип вируса желтой лихорадки (YF), четыре серотипа вируса денге (DENV-1, DENV-2, DENV-3 и DENV-4), вирус японского энцефалита (JE), вирус клещевого энцефалита (TBE), вирус Западного Нила (WN), вирус энцефалита Сент-Луис (SLE) и около 70 других вирусов, вызывающих болезни. *Флавивирусы* являются маленькими вирусами в оболочке, содержащими один геном с положительной нитью РНК. Десять генных продуктов кодированы одной рамкой считывания и транслируются в виде полипептида, организованного в порядке: капсид (С), “премембрана” (prM, которая обрабатывается до “мембраны” (М) непосредственно перед выделением вириона из клетки), “оболочка” (Е), затем неструктурные (NS) белки NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и NS5 (рассматриваются в Chambers, T. J. et al., *Annual Rev Microbiol* (1990) 44:649-688; Henschel, E. A. and Putnak, J. R., *Clin Microbiol Rev.* (1990) 3:376-396). Отдельные флавивирусные белки затем образуются через точные события процессинга, медирированные хозяином, а также кодированные вирусом протеазы.

Оболочка флавивирусов образуется из мембраны клетки хозяина и содержит кодированную вирусом мембрану, закрепленную на мембране (М), и гликопротеины оболочки (Е). Гликопротеин Е является наибольшим вирусным структурным белком и содержит функциональные домены, ответственные за присоединение к поверхности клетки, и интра-эндосомальные слитые активности. Он также является основной целью иммунной системы хозяина, вызывая образование нейтрализующих вирус антител, которые ассоциированы с защитным иммунитетом.

Вирусы денге передаются человеку комарами рода *Aedes*, в первую очередь, *A. aegypti* и *A. albopictus*. Заражение вирусами денге приводит к различной клинической практике от неочевидного или умеренного лихорадочного заболевания, через классическую лихорадку денге (DF) до геморрагической лихорадки денге/шокового синдрома денге (DHF/DSS). Лихорадка денге характеризуется высокой температурой, болью в суставах и мышцах, сыпью, лимфаденопатией и лейкопенией (Gibbons, R. V. and

D. W. Vaughn, *British Medical Journal* (2002) 324:1563-1566). DHF/DSS является более тяжелой формой инфекции, наиболее часто возникающей у детей, отмеченной сосудистой проницаемостью и/или тяжелыми геморрагическими проявлениями, варьирующими от присутствия петехии и кровоподтеков до спонтанного тяжелого кровоизлияния и глубокого шока. Без диагностики и быстрого медицинского вмешательства неожиданное наступление и быстрое развитие DHF/DSS может быть смертельным при отсутствии лечения.

Вирусы денге являются наиболее значительной группой передаваемых членистоногими вирусов в смысле глобальной заболеваемости и смертности при около ста миллионах случаев инфекции денге ежегодно, включающих, по крайней мере, 36 миллионов случаев лихорадки и 250000-500000 случаев DHF/DSS (Gubler, D. J., *Clin. Microbiol. Rev.* (1998) 11:480-496; Gibbons, *supra*). В связи с глобальным ростом населения, урбанизацией населения, особенно в тропиках, и отсутствием устойчивых мер борьбы с комарами, комары-переносчики денге расширили свое распространение в тропиках, субтропиках и некоторых умеренных областях, что привело к риску заражения денге для более половины населения мира. Современные передвижения на реактивных самолетах и эмиграция людей способствовали глобальному распространению серотипов денге так, что множественные серотипы денге в настоящее время являются эндемичными во многих регионах. Имеется увеличение частоты эпидемий денге и случаев DHF/DSS последние 20 или более лет. Например, в Юго-Восточной Азии DHF/DSS является ведущей причиной госпитализации и смерти среди детей (Gubler, *выше*; Gibbons and Vaughn, *выше*).

В настоящее время развитие вакцин от флавивирусов достигается с переменным успехом. Существует четыре основных подхода, которые используют в попытке получить возможные вакцины для защиты от заболевания, вызванного флавивирусами: живой аттенуированный, инактивированный нативный вирус, рекомбинантный субъединичный белок и вакцины на основе ДНК. Живая аттенуированная вакцина от вируса желтой лихорадки доступна в течение десятилетий, и в последнее время живая ослабленная вакцина от японского энцефалита была зарегистрирована в различных странах мира. Применение вакцин на основе инактивированных нативных вирусов было продемонстрировано для вирусов TBE и JE в виде нескольких доступных зарегистрированных продуктов. Heinz et al. *Flavivirus and flavivirus vaccines. Vaccine* 30: 4301-06 (2012).

Несмотря на успех вакцин от YF, JE и TBE, описанных выше, использование способов живого аттенуированного вируса и инактивированного вируса для разработки вакцина от вируса денге столкнулось с значительными трудностями. Существует четыре серотипа вируса денге (DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4), и было обнаружено, что штаммы каждого серотипа циркулируют по всем эндемическим денге регионами по всему миру. Природная инфекция придает долговременный иммунитет к инфицирующему серотипу, но не к другим серотипам денге. Более тяжелые формы заболевания (DHF/DSS)

возникают наиболее часто после вторичной инфекции денге, когда после заражения одним серотипом вируса денге следует второе заражение другим серотипом. Считается, что более частая связь DHF и DSS с вторичным заражением денге возникает из-за не нейтрализующих антител, вызванных заражением вирусом одного типа, усиливающих инфекционность вторым типом вируса денге (антитело-зависимое усиление - АЗУ).

В настоящее время большинством клинически тестируемых вакцин являются живые, ослабленные вакцины. Использование инактивированных возможных вакцин также изучено. Например, в Ivy et al. (патент США 6,432,411) описана четырехвалентная субъединичная вакцина, содержащая DEN1-4 80% E (пептидная область DEN1-4, соответствующая аминокислотам 1-395 DENV-2 полипептида в оболочке) белки. В Ivy et al, *выше*, также описаны композиции, содержащие DENV 1-4 80% E и адъювант ISCOMATRIX®. В Collier et al. (WO 2012/154202) описаны четырехвалентные составы, содержащие DEN1-4 80% E из DEN 1-4. Инактивированные вирусы также могут использоваться в качестве потенциальных кандидатных вакцин или в качестве компонентов эффективной вакцины (Putnak et al. Vaccine 23: 4442-4452 (2005), US 6190859, US 6254873 и Sterner et al. WO 2007/002470). Композиции, содержащие живую аттенуированную вакцину от вируса денге и инактивированную вакцину от денге описаны в международной заявке на патент № PCT/US14/042625 (WO2014/204892).

Нативные вирусы являются одними из наиболее часто используемых антигенов в нескольких вакцинных продуктах из-за их способности вызывать гуморальные и клеточные иммунные ответы. Вакцинные продукты, содержащие нативные вирусы, сложно стабилизировать, так как они чувствительны к теплу, замораживанию/оттаиванию и другим стрессам во время обработки, что приводит к значительным потерям эффективности. Эти продукты обычно хранят замороженными (ниже -20°C) или в виде высушенного порошка. Замороженные продукты нелегко хранить и распространять, так как они требуют строгого соответствия требованиям холодной цепи для предотвращения потери эффективности. Сушка нативных вирусов, особенно оболочечных вирусов, часто приводит к значительным потерям эффективности из-за стрессов замораживания и сушки, встречающихся в процессе сушки. Поэтому в данной области техники существует необходимость в создании стабильных составов вируса денге.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к стабильным составам живой аттенуированной вакцины денге. Добавление производного целлюлозы и сахарного спирта или гликоля улучшает стабильность и/или выход после сушки. Альтернативно, добавление сахара в количестве по меньшей мере 150 мг/мл улучшает стабильность и/или выход после микроволновой сушки.

В одном аспекте изобретение относится к составу, содержащему живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус (ЖОХВ), буфер при pH от около 6,5 до 8,5, сахар, гликоль или

сахарный спирт и производное целлюлозы, выбранное из группы, состоящей из карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), 2-гидроксиэтилцеллюлозы (2-ГЭЦ), кросскармеллозы и метилцеллюлозы или их фармацевтически приемлемой соли; необязательно щелочную или щелочноземельную соль и, необязательно, аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их сочетание.

В одном варианте буфер выбирают из группы, состоящей из сукцината, гистидина, фосфата, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, ацетата и цитрата, или их сочетания. В другом варианте, щелочной или щелочноземельной солью является хлорид магния, хлорид кальция, хлорид калия, хлорид натрия или их сочетание. В дополнительном варианте, сахаром является трегалоза или сахароза. В одном варианте, производным целлюлозы является фармацевтически приемлемая соль карбоксиметилцеллюлозы. В другом варианте, гликоль выбирают из группы, состоящей из пропиленгликоля, полипропиленгликоля, этиленгликоля, полиэтиленгликоля и монометиловых эфиров полиэтиленгликоля. В дополнительном варианте, сахарным спиртом является глицерин.

В другом аспекте, состав содержит живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 100-10000000 БОЕ/мл, буфер при pH от приблизительно 6,5 до 8,5, приблизительно 50-300 мг/мл сахара, приблизительно 2,5-10,0 мг/мл пропиленгликоля (ПГ) или глицерина, и приблизительно 0,3-10 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия (КМЦ натрия), необязательно приблизительно 10-150 мМ NaCl и, необязательно, приблизительно 10-100 мМ аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их комбинацию; живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 100-100000 БОЕ/мл, приблизительно 5-300 мМ гистидина, TRIS, Bis-Tris или фосфатный буфер или их комбинацию при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 50-300 мг/мл сахара, приблизительно 3-10 мг/мл пропиленгликоля или глицерина и приблизительно 3-10 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, необязательно, приблизительно 15-75 мМ NaCl, и, необязательно приблизительно 10-75 мМ аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их комбинацию; живую аттенуированную вакцину денге при приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-300 мМ буфера на основе фосфата калия при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 60-120 мг/мл сахарозы или трегалозы или их комбинации, приблизительно 3-7 мг/мл пропиленгликоля или глицерина, и приблизительно 3-7 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, и приблизительно 30-90 мМ NaCl, и необязательно приблизительно 10-75 мМ аминокислоты Leu, Lys или Glu, или их комбинацию; живую аттенуированную вакцину денге при приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при pH приблизительно

7,0-8,0, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля или глицерина, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90,000, и приблизительно 75 мМ NaCl; живую аттенуированную вакцину денге при приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфер на основе фосфата калия при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, приблизительно 50 мМ NaCl, и приблизительно 25 мМ Leu; живую аттенуированную вакцину денге при приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при pH приблизительно 7,5, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, и приблизительно 30 мМ NaCl. В одном аспекте представленных выше вариантов, состав дополнительно содержит приблизительно 90-200 мг/мл трегалозы.

В предпочтительном варианте изобретения, состав содержит живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при pH приблизительно 7,5-8, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 110 мг/мл трегалозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, приблизительно 50 мМ NaCl и приблизительно 25 мМ Leu. В одном аспекте представленных выше вариантов, состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, выбранное из полоксамера 188 и полоксамера 407 при приблизительно 0,0001-5% масс./об.

Изобретение также относится к составу, который содержит живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 100-10000000 БОЕ/мл, буфер при pH приблизительно 6,5-8,5, сахар в количестве приблизительно 150-300 мг/мл, носитель, выбранный из группы, состоящей из поливинилпирролидона (ПВП), карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), 2-гидроксиэтилцеллюлозы (2-ГЭЦ), кроскармеллозы, метилцеллюлозы или их фармацевтически приемлемой соли, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и желатина; необязательно, щелочную соль или щелочноземельную соль в количестве приблизительно 5-100 мМ; необязательно, аминокислоту Gln, Pro или Glu, или их комбинацию.

В одном варианте, буфер выбирают из группы, состоящей из сукцината, гистидина, фосфата, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, ацетата и цитрата, или их комбинации. В другом варианте, щелочной или щелочноземельной солью является хлорид магния,

хлорид кальция, хлорид калия, хлорид натрия или их комбинация. В дополнительном варианте, сахаром является трегалоза или сахароза, или их комбинация. В одном варианте, отношение сахарозы к трегалозе составляет 1:1-1:4. В другом варианте, носителем является карбоксиметилцеллюлоза натрия, ГПМЦ, ЧСА или желатин.

В другом аспекте, изобретение относится к составам живой аттенуированной вакцины денге, содержащей по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 200-100000 БОЕ/мл, буфер при рН приблизительно 6,5-8,0, приблизительно 150-300 мг/мл сахара в виде комбинации сахарозы и трегалозы, приблизительно 0,3-40 мг/мл КМЦ натрия, ЧСА, ГПМЦ или желатина, необязательно, приблизительно 10-100 мМ щелочной или щелочноземельной соли, и, необязательно приблизительно 5-25 мМ глутаминовой кислоты; живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-300 мМ гистидина, TRIS или фосфатного буфера или их сочетание при рН приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 50-100 мг/мл сахарозы, приблизительно 90-200 мг/мл трегалозы, приблизительно 0,3-10 мг/мл КМЦ натрия или приблизительно 10-40 мг/мл желатина, и приблизительно 30-90 мМ щелочной или щелочноземельной соли; живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-20 мМ фосфата калия при рН приблизительно 7-8, приблизительно 75 мг/мл сахарозы, приблизительно 175 мг/мл трегалозы, приблизительно 5 мг/мл КМЦ натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, и приблизительно 30 мМ NaCl; живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-20 мМ фосфата калия при рН приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 75 мг/мл сахарозы, приблизительно 175 мг/мл трегалозы, приблизительно 25 мг/мл желатина и приблизительно 30 мМ NaCl; живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-20 мМ фосфата калия при рН приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 250 мг/мл сахарозы и приблизительно 50 мг/мл ПВП К12. В одном аспекте представленных выше вариантов, состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, выбранное из полоксамера 188 и полоксамера 407 в количестве приблизительно 0,0001-5% масс./об.

В некоторых аспектах представленных выше вариантов состав дополнительно содержит алюминиевый адъювант. Указанные выше составы могут быть заморожены или лиофилизированы, или восстановлены в растворе. В одном варианте, восстановление проводят приблизительно 0,5-1,0 мл физиологического раствора, воды или бактериостатической воды для инъекций (БВДИ) и, необязательно, разбавителем, содержащим алюминиевый адъювант. В другом варианте, составом является водный раствор до лиофилизации или микроволновой сушки в вакууме.

В одном варианте, живая ослабленная вакцина денге содержит четырехвалентный живой аттенуированный вирус денге или живой аттенуированный химерный флавивирус. В другом варианте, ЖАВ или ЖОХВ содержит вирусный геном, который содержит

делецию приблизительно 30 нуклеотидов, соответствующую TL-2 структуре петля на стебле 3' нетранслируемой (НТР) области; который снижает репликативную способность вируса. В дополнительном варианте, живым аттенуированным вирусом денге является ЖАВ, который содержит вирусный геном, который содержит делецию приблизительно 30 нуклеотидов, соответствующую TL-2 структуре петля на стебле 3' нетранслируемой (НТР) области, и является иммуногенным против серотипа денге 3, где вирусный геном ЖАВ дополнительно содержит делецию нуклеотидов против хода транскрипции от  $\Delta 30$  делеции, соответствующей TL-3 структуре 3'НТР.

В предпочтительных вариантах изобретения, живой аттенуированной вакциной денге является живая аттенуированная четырехвалентная вакцина, содержащая DEN1 $\Delta$ 30 вирус, DEN2/4 $\Delta$ 30 вирус (DEN2  $\Delta$ 30ЖОХВ на DEN4 острове), DEN3 $\Delta$ 30 вирус и DEN4 $\Delta$ 30 вирус. В другом предпочтительном варианте, живым аттенуированным вирусом денге является ЖАВ, содержащий гDEN1 $\Delta$ 30-1545, гDEN2/4 $\Delta$ 30 (ME)-1495,7163, гDEN3 $\Delta$ 30/31-7164 и гDEN4 $\Delta$ 30-7132,7163,8308.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1: Действие КМЦ натрия, ПГ, аминокислот на DENV4 выход лиофилизации для DEN4 составов.

ФИГ. 2: Действие КМЦ натрия, ПГ, аминокислот на DENV4 стабильность для DEN4 составов. Состав 26 (\*) не тестируют из-за разрушения лепешки после хранения при 25°C.

ФИГ. 3: Действие сахарного спирта на DENV4 выход лиофилизации для DEN4 составов.

ФИГ. 4: Действие сахарного спирта на DENV4 стабильность для DEN4 составов.

ФИГ. 5: Действие pH на DENV4 выход лиофилизации для DEN4 составов.

ФИГ. 6: Действие pH на DENV4 стабильность для DEN4 составов.

ФИГ. 7: Действие буфера на DENV4 выход лиофилизации для DEN4 составов.

ФИГ. 8: Действие буфера на DENV4 стабильность для DEN4 составов.

ФИГ. 9: Действие NaCl концентрации на DENV4 выход лиофилизации для DEN4 составов.

ФИГ. 10: Действие NaCl концентрации на DENV4 стабильность для DEN4 составов.

ФИГ. 11: Действие пропиленгликоля и глицерина на выход лиофилизации серотипов Денге.

ФИГ. 12: Действие пропиленгликоля и глицерина на стабильность серотипов Денге.

ФИГ. 13: Действие L-15 концентрации на относительную эффективность замороженных, высушенных микроволнами (МВС) и лиофилизированных (лио.) DEN1 составов.

ФИГ. 14: Действие L-15 концентрации на относительную эффективность замороженных, высушенных микроволнами (МВС) и лиофилизированных (лио.) DEN2

составов.

ФИГ. 15: Действие L-15 концентрации на относительную эффективность замороженных, высушенных микроволнами (МВС) и лиофилизированных (лио.) DEN3 составов.

ФИГ. 16: Действие L-15 концентрации на относительную эффективность замороженных, высушенных микроволнами (МВС) и лиофилизированных (лио.) DEN4 составов.

ФИГ. 17: Относительная эффективность замороженных, высушенных микроволнами (МВС) и лиофилизированных (лио.) DEN1 составов.

ФИГ. 18А-В: А) Стабильность четырехвалетных составов при 37°C через одну неделю. В) Стабильность четырехвалетных составов при 25°C через один месяц.

ФИГ. 19А-Д: Стабильность четырехвалетных составов (DEN1-DEN4) при 2-8°C, тестируемая каждые 3 месяца вплоть до 18 месяцев.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

Ссылка на «или» указывает одну или обе возможности, если контекст явно не диктует одну из указанных возможностей. В некоторых случаях «и/или» используют для выделения одной или обеих возможностей.

Термин "приблизительно", при модификации количества (например, мМ, или М) вещества или композиции, доли (об./об. или масс./об.) компонента состава, рН раствора/состава, значения параметра, характеризующего стадию в способе, или подобного, относится к изменению численного количества, которое может возникнуть, например, при типовом измерении, манипуляциях и отборе образцов, применяемых при приготовлении, характеризации и/или применении вещества или композиции; при инструментальной ошибке в этих методиках; при различиях в производстве, источнике или чистоте ингредиентов, применяемых для получения или применения композиций, или проведении методик; и подобных. В определенных вариантах, "приблизительно" может означать изменение на  $\pm 0,1\%$ ,  $0,5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$ ,  $3\%$ ,  $4\%$ ,  $5\%$  или  $10\%$ .

Термин «объемообразующие агенты» включает агенты, которые обеспечивают структуру сублимированного продукта. Обычные примеры, используемые для объемообразующих агентов, включают маннит, глицин и лактозу. В дополнение к получению фармацевтически эстетической лепешки, объемообразующие агенты могут также придавать полезные свойства в отношении изменения температуры разрушения, обеспечения защиты от замерзания-оттаивания и повышения стабильности белка в течение длительного хранения. Эти агенты также могут служить модификаторами тоничности.

“Ссылочный образец вируса денге” имеет тот же состав компонентов вируса денге и соотношение компонентов, как и тестируемый образец состава вируса денге, и относится к твердой композиции сразу же после сушки состава вируса денге в тех же

условиях, что и тестируемый образец состава вируса денге (т.е. лиофилизация, сушка микроволнами, сушка лиосферами), или указанной выше высушенной твердой композиции, хранящейся в условиях, где имеется отсутствие или минимальная потеря инфекционности вируса денге (т.е. хранится при или ниже  $-70^{\circ}\text{C}$ ); или замороженному твердому составу вируса денге при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

“Гликоль” относится к химическому соединению с двумя гидроксильными группами.

“Потеря инфекционности” относится к сравнению потери вирусной репликации тестируемого образца вируса денге к ссылочному образцу вируса денге с применением способов, известных в данной области техники. В одном варианте, потерю инфекционности измеряют с применением анализа относительной инфекционности денге. В другом варианте, потерю инфекционности измеряют с применением анализа бляшкообразования.

Термины "лиофилизация", "лиофилизированный" и "сублимированный" относятся к способу, который продукт сушат сначала замораживанием с последующим удалением льда или замороженного растворителя сублимацией в вакуумной среде. Эксципиент может быть добавлен в составы перед лиофилизацией для улучшения стабильности лиофилизированного продукта при хранении.

“Лиосфера” в данном описании относится к высушенным замораживанием единым телам, содержащим терапевтически активный агент, который по существу является сферическим или яйцеобразным. В некоторых вариантах, диаметр лиосферы составляет от приблизительно 2 до приблизительно 12 мм, предпочтительно, от 2 до 8 мм, например, от 2,5 до 6 мм или от 2,5 до 5 мм. В некоторых вариантах, объем лиосферы составляет от приблизительно 20 до 550 мкл, предпочтительно, от 20 до 100 мкл, например, от 20 до 50 мкл. В вариантах, где лиосфера по существу не является сферической, размер лиосферы может быть описан относительно ее соотношения сторон, которое представляет собой отношение наибольшего размера к наименьшему размеру. Соотношение сторон лиосфер может составлять от 0,5 до 2,5, предпочтительно, от 0,75 до 2, например, от 1 до 1,5.

“Вакуумная сушка микроволнами” в настоящем описании относится к способу сушки, при котором используют облучение микроволнами (также известное как радиационная энергия или не ионизирующее облучение) для образования высушенных вакцинных продуктов (предпочтительно,  $<6\%$  влаги) вакцинного состава сублимацией. В некоторых вариантах, микроволновую сушку проводят как описано в US2016/0228532. В одном варианте, микроволновое облучение проводят в формате распространяющихся волн.

"Восстановленным раствором" является такой, который получен растворением высушенного вируса в твердой форме (такой как лиофилизированная лепешка) в разбавителе так, что вирус диспергируется в восстановленном растворе. Восстановленный раствор подходит для введения (например, внутримышечного введения), и необязательно может подходить для подкожного введения.

"Соль(и)" в настоящем описании означают кислые соли, полученные с неорганическими и/или органическими кислотами, а также основные соли, полученные с неорганическими и/или органическими основаниями. Фармацевтически приемлемые (т.е. не токсичные, физиологически приемлемые) соли являются предпочтительными, хотя другие соли также используют. Типовые основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия, лития и калия, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли цинка, соли с органическими основаниями (например, органические амины), такие как N-Me-D-глюкамин, холин, трометамин, дициклогексиламины, трет-бутиламины и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и тому подобное.

“Сахарный спирт” относится к многоатомным спиртам, полученным из сахара, и имеющим общую формулу  $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10$ . Примеры включают, но не ограничены ими, маннит, сорбит, эритрит, ксилит и глицерин.

В настоящем описании “x% (масс./об.)” эквивалентно x г/100 мл (например, 5% масс./об. равно 50 мг/мл).

Термин “живой аттенуированный вирус денге”, также называемый здесь “ЖАВ”, означает пониженную способность вируса денге вызывать заболевание по сравнению с диким типом вируса денге. Специалист в данной области техники поймет, что вирусы могут претерпевать мутацию при культивировании, пассировании или распространении. ЖАВ может содержать природные мутации, в дополнение к мутациям, вызванным в целях клонирования. ЖАВ может быть гомогенной или гетерогенной популяцией с отсутствием, одной или более такими мутациями.

Термин “живой аттенуированный химерный вирус” (альтернативно, “живой аттенуированный химерный флавивирус”) или “ЖАХВ” относится к живому ослабленному химерному вирусу, где вирусный геном содержит остов первого флавивируса (включая С, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 гены) и предмембранный (prM) и оболочечный (E) гены второго флавивируса, где второй флавивирус выбирают из DENV1, DENV2, DENV3 или DENV4. Первым флавивирусом может быть отличающийся серотип денге или другой флавивирус, такой как вирус желтой лихорадки.

Термин “Δ30 ЖАВ” относится к живому аттенуированному DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4 вирусу, где ЖАВ содержит вирусный геном, который содержит делецию приблизительно 30 нуклеотидов (nt), соответствующую TL2 структуре петля на стебле 3' нетранслируемой (НТР) области от приблизительно nt 143 до приблизительно nt 172, что снижает репликативную способность вируса (см. WO 03/092592 и Whitehead et al., патент США № 8,337,860).

Термин “Δ30 ЖАХВ” относится к живому аттенуированному химерному флавивирусу (ЖАХВ) из DENV 1-4, где ЖАХВ содержит вирусный геном, который содержит делецию приблизительно 30 nt, соответствующую TL2 структуре петля на стебле 3' нетранслируемой (НТР) области от приблизительно nt 143 до приблизительно nt

172, что снижает репликативную способность вируса (см. WO 03/092592 и Whitehead et al., патент США № 8,337,860).

Термин “Δ30/Δ31 ЖАВ” относится к живому аттенуированному DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4 вирусу, где вирусный геном содержит делецию приблизительно 30 nt в TL2 структуре петля на стебле 3' НТР, и дополнительно содержит отдельную, несообщающуюся делецию против хода транскрипции приблизительно 31 nt на приблизительно nt 258-228 3' НТР, которая удаляет последовательность вплоть до, и включая TL-3 гомологичную структуру так, что делеция распространяется до 5' границы TL-3 гомологичной структуры денге 3'НТР. См. Whitehead et al., патент США 8,337,860. В предпочтительных вариантах изобретения, DEN3 ЖАВ содержит Δ30/Δ31 мутации.

Термин “Δ30/Δ31 ЖАХВ” относится к живому аттенуированному химерному DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4 вирусу, как описано выше, где вирусный геном химерного вируса содержит 30 nt делецию TL2 структуры петля на стебле 3' НТР, и дополнительно содержит отдельную, несообщающуюся делецию против хода транскрипции 31 nt 3' НТР, которая удаляет TL-3 структуру, как описано выше.

Термин “ЖАЧВ” или “живая ослабленная четырехвалентная вакцина денге” или “ЖАЧВ вакцина” относится к вакцине, содержащей эффективное количество DEN1 ЖАВ или ЖАХВ, DEN2 ЖАВ или ЖАХВ, DEN3 ЖАВ или ЖАХВ и DEN4 ЖАВ или ЖАХВ. В одном варианте по меньшей мере один из ЖАВ или ЖАХВ денге содержит Δ30 мутацию TL-2 структуры в 3' НТР, как описано выше и в WO 03/092592. В некоторых предпочтительных вариантах, ЖАЧВ содержит следующие признаки: (1) rDEN1Δ30, который является DENV1 ЖАВ, где DENV1 вирусный геном содержит 30 nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР; (2) rDEN2/4Δ30, который является DENV2 ЖАХВ, содержащим DENV2 ргМ и Е гены на DENV4 острове, где DEN4 остров содержит 30-nt делеции, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР; (3) rDEN3Δ30/Δ31, который является DENV3 ЖАВ, где DENV3 вирусный геном содержит 30 nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР и отдельную, несообщающуюся делецию против хода транскрипции 31 nt, соответствующую TL-3 структуре 3' НТР; и (4) rDEN4Δ30, который является DENV4 ЖАВ, где DENV4 вирусный геном содержит 30 nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР (см. Фигуру 1 из WO2016106107).

“Нерепликационная вакцина” относится к вакцине от вируса денге для профилактики или лечения заражения вирусом денге или его клинических симптомов, выбранной из рекомбинантной субъединичной вакцины, инактивированной вакцины, конъюгированной вакцины или ДНК вакцины.

“Инактивированная вакцина” относится к вакцине, содержащей эффективное количество убитого или не активного цельного вируса денге и фармацевтически приемлемый носитель, где вирус инактивирован любыми средствами, включая химические соединения, тепло или облучение. Инактивированная вакцина имеет низкую остаточную инфекционность после инактивации, например <5 бляшкообразующих

единиц (БОЕ)/мл после инактивации. В предпочтительных вариантах, имеется очень низкое количество остаточной инфекционности после инактивации, например  $\leq 4$  БОЕ/мл,  $\leq 3$  БОЕ/мл или  $\leq 2$  БОЕ/мл,  $< 1$  БОЕ/мл,  $\leq 0,5$  БОЕ/мл или  $\leq 0,1$  БОЕ/мл. БОЕ конкретной вакцины может быть определено, например, с использованием анализа бляшкообразования, анализа иммуноокрашиванием или другого способа, известного в данной области техники для определения инфекционности вируса.

“Конъюгированная вакцина” относится к вакцине, содержащей денге антиген, ковалентно присоединенный к белку носителя.

“ДНК вакциной” является вакцина, содержащая последовательность нуклеотидов, которая кодирует антиген белка денге, включая белки денге, фрагменты белка денге и слитые белки денге, и их варианты. ДНК вакцины содержат плазмид (например, ДНК или вирусный плазмид), содержащий последовательность нуклеотидов, которые кодируют целевой антиген, функционально связанный с промотором.

“Субъединичная вакцина” относится к вакцине, которая включает один или более компонентов антигена денге, но не полные вирусы денге, таких как иммуногенные эпитопы денге, белки денге, слитые белки антигена денге, включая слияния антигенов различных серотипов денге, или фрагменты белка денге. Субъединичные вакцины в настоящем описании могут быть одновалентными (содержать один антиген денге) или мультивалентными (содержать более одного компонента антигена). В предпочтительных вариантах, субъединичная вакцина является четырехвалентной.

Термин “прайм-буст” относится к терапевтическому режиму, включающему (1) введение пациенту, нуждающемуся в таковом, первой композиции вакцины от вируса денге, где композиция содержит (а) по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или живой аттенуированный химерный флавивирус (ЖАХВ), и (b) фармацевтически приемлемый носитель; (2) ожидание, пока пройдет определенное количество времени; и (3) введение пациенту второй композиции вакцины от вируса денге или инактивированной вакцины денге. Вторая композиция вакцины от вируса денге может быть такой же, или отличающейся от первой композиции вакцины от вируса денге. В одном варианте, второй вакциной от вируса денге является живая аттенуированная вакцина денге или рекомбинантная субъединичная вакцина денге. Вакцины от вируса денге, применяемые в композициях в соответствии с настоящим изобретением, используют для получения реакции нейтрализующих вирус антител на гомологичные вирусы денге у человека.

Термин «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. К лицам или пациентам, «нуждающимся» в лечении, относятся те, у кого уже имеется инфекция денге, с или без проявления каких-либо клинических симптомов, а также те, которым находятся в зоне риска заражения денге. Лечение пациента вакцинными композициями от денге в соответствии с настоящим изобретением включает одно или более из следующих: вызов/повышение иммунной реакции против денге у пациента, вызов реакции нейтрализующего вирус антитела против

одного или более вирусов денге, профилактика, облегчение, подавление или снижение вероятности клинических проявлений денге у пациентов, которые были заражены денге, профилактика или снижение вероятности развития лихорадки денге, DHF или DSS и/или другого заболевания или осложнения, связанного с заражением денге, снижение тяжести или длительности клинических симптомов заражения денге и/или других заболеваний или осложнений, связанных с денге, и профилактика или снижение вероятности заражения денге.

Термин "фармацевтически эффективное количество" или "эффективное количество" означает введение достаточного количества вакцинной композиции пациенту для получения желаемого эффекта, включая, но не ограничиваясь: вызов/повышение иммунной реакции против денге у пациента, вызов/повышение реакции нейтрализующего вирус антитела против денге у пациента, профилактика или снижение вероятности заражения денге, профилактика или снижение вероятности рецидива заражения денге, профилактика, облегчение или подавление клинических проявлений денге у пациентов, которые были заражены денге, профилактика лихорадки денге, DHF и/или DSS, или снижение тяжести или длительности заболевания, связанного с денге. Специалист в данной области техники поймет, что этот уровень может варьировать.

Термин "иммунный ответ" относится к опосредуемому клетками (Т-клетками) иммунному ответу и/или антительному ответу (В-клетки).

Термин "пациент" относится к млекопитающему, способному к инфицированию вирусом денге, таким как DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4, который получает вакцинные композиции от денге, описанные здесь, включая и иммунокомпетентных, и иммунокомпрометированных лиц. В предпочтительных вариантах, пациентом является человек. Как определено здесь, "пациент" включает либо тех, кто уже заражен лихорадкой денге, в результате естественного заражения или вакцинации, либо тех, которые могут быть подвергнуты воздействию в будущем.

"ISCOM-подобным адъювантом" является адъювант, содержащий иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), который состоит из сапонины, холестерина и фосфолипида, которые вместе образуют характерную заключенную частицу, имеющую уникальную сферическую клеткоподобную структуру, которая способствует ее функции (обзор см. в Barr and Mitchell, *Immunology and Cell Biology* 74: 8-25 (1996)). Этот термин включает как ISCOM™ адъюванты, которые получают с антигеном и содержат антиген внутри ISCOM™ частицы, так и ISCOM™ матричные адъюванты, которые являются полыми адъювантами типа ISCOM, которые получают без антигена. В предпочтительных вариантах композиций и способов, представленных здесь, адъювант типа ISCOM является ISCOM™ матричный частичный адъювант, такой как ISCOMATRIX™, который производят без антигена (ISCOM™ и ISCOMATRIX™ являются зарегистрированными торговыми марками CSL Limited, Parkville, Australia).

Обозначение "rDEN1Δ30-1545" относится к рекомбинантному денге 1 вирусу, где вирусный геном содержит (1) 30 nt делецию TL2 структуры петля на стебле 3' НТР и (2)

замещение на нуклеотидном положении 1545 на G, которое происходит после адаптации вируса к росту в клетках Vero.

Обозначение “rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163” относится к рекомбинантному химерному денге 2/4 вирусу, где вирусный геном содержит: (1) денге 4 остов (C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 гены), содержащий (i) 30 nt делецию TL2 структуры петля на стебле 3’ НТР, и (ii) замещения на нуклеотидном положении 1495 на U и 7163 на C, которое возникает после адаптации вируса к росту в клетках Vero, и (2) денге 2 ргМ и Е гены.

Обозначение “rDEN3Δ30/31-7164” относится к рекомбинантному денге 3 вирусу, где вирусный геном содержит: (1) 30 nt делецию TL2 структуры петля на стебле 3’ НТР, (2) отдельную 31 nt делецию в 3’НТР, против хода транскрипции Δ30 мутации, которая удаляет TL-3 структуру, и (3) замещение на нуклеотидном положении 7164 на C, которое возникает после адаптации вируса к росту в клетках Vero.

Обозначение “rDEN4Δ30-7132,7163,8308” относится к рекомбинантному денге 4 вирусу, где вирусный геном содержит: (1) 30 nt делецию TL2 структуры петля на стебле 3’ НТР и (2) замещения на нуклеотидном положении 7132 на U, 7163 на C и 8308 на G, которое возникает после адаптации вируса к росту в клетках Vero.

“V180” относится к четырехвалентной субъединичной вакцине, состоящей из усеченных оболочечных гликопротеинов (DEN-80E) из каждого из 4 серотипов вируса денге (DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4), где каждый из E белков составляет приблизительно 80% от длины дикого типа E, начиная от аминокислотного остатка 1 на его N-конце так, что указанный E белок секретируется в среду для выращивания при рекомбинантном экспрессировании в клетке хозяина. См. Collier et al. WO 2012/154202.

Следующие аббревиатуры используют здесь, и они имеют следующие значения: C означает ген капсида денге, DEN (альтернативно, DENV) означает вирус денге, DF означает лихорадку денге, DHF означает геморрагическую лихорадку денге, DSS означает шоковый синдром денге, h означает часы, СГТ означает среднее геометрическое титра, ВМ означает внутримышечно, IMX означает Iscomatrix™, JE означает японский энцефалит, ЖАВ означает живой аттенуированный вирус, NS (применяемый в NS1-NS5) означает неструктурный, nt означает нуклеотид, БОЕ означает бляшкообразующие единицы, ргМ означает ген предмембраны денге, ПК означает подкожно, ТВЕ означает клещевой энцефалит, НТР означает нетранслированную область, WN (альтернативно, WNV) означает вирус западного нила, YF (альтернативно, YFV) означает вирус желтой лихорадки, и wt означает дикий тип.

#### *Живая аттенуированная вакцина от вируса денге*

Как указано выше, композиции вакцины от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением содержат живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один ЖАВ, выбранный из группы, состоящей из вируса денге 1 типа (DEN1), вируса денге 2 типа (DEN2), вируса денге 3 типа (DEN3) и вируса денге 4 типа (DEN4), или ЖАХВ. В одном варианте, ЖАВ или ЖАХВ содержит вирусный геном,

который содержит TL-2 Δ30 модификацию в 3'НТР, и где ЖАВ или ЖАХВ: вызывает иммунный ответ против денге, вызывает ответ нейтрализующего вирус антитела против денге, защищает от или снижает вероятность заражения или снижает тяжесть или длительность его клинических проявлений. В вариантах изобретения, живая аттенуированная вакцина денге является одновалентной, двухвалентной, трехвалентной или четырехвалентной, т.е. вызывает иммунный ответ против или защищает от одного, двух, трех или четырех серотипов DEN 1-4, соответственно. В предпочтительных вариантах настоящего изобретения, живая аттенуированная вакцина денге является четырехвалентной, т.е. вызывает иммунный ответ против или защищает от серотипов 1-4 DEN, и содержит DEN1, DEN2, DEN3 и DEN4 компонент, где каждый компонент является ЖАВ или ЖАХВ.

В дополнительных вариантах изобретения, живая аттенуированная вакцина денге является четырехвалентной ЖАВ или “ЖАЧВ” (т.е. содержит живые ослабленные вирусы денге из DENV 1-4, или живые аттенуированные химерные флавивirusы из DENV 1-4, как определено здесь, или их комбинацию, где по меньшей мере один из ЖАВ или ЖАХВ является Δ30ЖАВ или Δ30ЖАХВ). В дополнительных вариантах изобретения, живая аттенуированная вакцина денге является четырехвалентной и содержит по меньшей мере один химерный флавивirus; где химерный флавивirus содержит вирусный геном, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ргМ и Е белки одного серотипа вируса денге, и нуклеотидную последовательность, кодирующую капсидный и неструктурный белки разных флавивirusов, где химерный флавивirus является аттенуированным. В некоторых вариантах изобретения, капсидный и неструктурный белки химерного флавивirusа происходят из других серотипов денге, чем ргМ и Е белки.

В некоторых вариантах изобретения каждый ЖАВ или ЖАХВ компонент ЖАЧВ в соответствии с настоящим изобретением содержит живой аттенуированный вирус, который независимо является либо аттенуированным химерным флавивirusом, либо аттенуированным вирусом денге, содержащим TL-2 Δ30 модификацию в 3'НТР вирусного генома. Аттенуация вируса денге достигается через TL-2 Δ30 модификацию. Однако дополнительные аттенуирующие мутации также могут быть включены в один или более компонентов вакцины, включая, но не ограничиваясь ими: мутации в положениях 1495, 1545, 7132, 7163, 7164 и 8308. Аттенуирующие мутации могут быть достигнуты различными методами, включая методы, известные в данной области техники, такие как серийное разведение на культуре ткани или более определенные генетические манипуляции. Мутации, используемые для аттенуации вирусов денге и химерных вирусов денге, известны в данной области техники. См., например, WO 02/095075, WO 2006/44857, патент США № 7,189,403, патент США № 8,337,860, WO 2003/103571, WO 2000/014245 и WO 2008/022196. Известные аттенуированные штаммы денге также могут использоваться в композициях здесь, такие как штаммы, описанные в WO 06/134433, WO 2006/134443, WO 2007/141259, WO 96/40933, WO 2000/057907, WO 2000/057908, WO 2000/057909, WO

2000/057910 и WO 2007/015783.

Предпочтительные варианты композиций в соответствии с настоящим изобретением содержат четырехвалентную живую аттенуированную вакцину денге (ЖАЧВ). Такая четырехвалентная живая аттенуированная вакцина может содержать четыре аттенуированных вируса денге (ЖАВ), три ЖАВ и один аттенуированный штамм химерного флавивируса (ЖАХВ), два денге ЖАВ и два ЖАХВ, один денге ЖАВ и три ЖАХВ, или четыре ЖАХВ.

В предпочтительных вариантах, ЖАЧВ содержит следующие признаки: (1) rDEN1Δ30, который является DENV1 ЖАВ, где DENV1 вирусный геном содержит 30 nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР; (2) rDEN2/4Δ30, который является DENV2 ЖАХВ, содержащим DENV2 ргМ и Е гены на DENV4 остове, где DEN4 остов содержит 30-nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР; (3) rDEN3 Δ30/Δ31, который является DENV3 ЖАВ, где DENV3 вирусный геном содержит 30 nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР и отдельную, несообщающуюся делецию против хода транскрипции 31 nt, соответствующую TL-3 структуре 3' НТР; и (4) rDEN4Δ30, который является DENV4 ЖАВ, где DENV4 вирусный геном содержит 30 nt делецию, соответствующую TL2 структуре петля на стебле в 3' НТР.

В вариантах настоящего изобретения, содержащих химерные флавивирусы, каждый химерный флавивирус содержит вирусный геном, который содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие ргМ и Е белки одного серотипа вируса денге, и нуклеотидные последовательности, которые кодируют капсидный и неструктурный белки (т.е. "основ") разных флавивирусов, где каждый из химерных флавивирусов ослаблен. Способы конструирования штамма рекомбинантного живого аттенуированного флавивируса могут включать использование известного аттенуированного штамма в качестве основы, где способ включает замещение подходящих генов (ргМ и Е) от родственного целевого вируса на эквивалентные гены вируса-основы. Например, этот подход был использован для WNV, где химерным вирусом является межтиповой химерный на основе аттенуированного DEN-4 штамма, содержащего ргМ и Е гены WNV (Bray, M. et al., J. Virol. (1996) 70:4162-4166; Chen, W., et al., J. Virol. (1995) 69:5186-5190; Bray, M. and Lai, C.-J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:10342-10346; Lai, C. J. et al., Clin. Diagn. Virol. (1998) 10:173-179).

Другим подходом является использование YF 17D аттенуированного штамма желтой лихорадки в качестве основы для развития рекомбинантных химерных вакцин, который ранее использовали для JE вируса, DEN вирусов и WN вируса. Химерная вакцина от желтой лихорадки может быть сконструирована содержащей остов желтой лихорадки через замену генов, кодирующих ргМ и Е белки из любого штамма желтой лихорадки, например, YFV 17D, на гены серотипа денге. После ДНК клонирования, РНК считывают и трансфицируют в клетки Vero с получением химерных вирусов, обладающих YFV 17D механизмом репликации и внешней оболочкой родственного вируса денге. См. Guirakhoo

et al., Journal of Virology, 74(12): 5477-5485 (2000); Guy et al., Vaccine 28: 632-649 (2010); Monath T.P. Adv Virus Res (2003) 61:469-509; Monath et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103:6694; и WO 98/37911. Таким образом, в некоторых вариантах изобретения живая аттенуированная вакцина денге содержит (1) по меньшей мере один химерный флавивирус, содержащий ргМ и Е белки одного серотипа денге и остов желтой лихорадки, и (2) по меньшей мере один ЖАВ или ЖАХВ, который содержит вирусный геном, содержащий 30-нуклеотидную делецию TL-2 структуры петля на стебле 3'НТР.

Химерные живые аттенуированные флавивирусы, используемые в композициях в соответствии с настоящим изобретением, могут также содержать химерный вирус денге, где вирусный геном содержит ргМ и Е гены одного серотипа вируса денге и капсидный и неструктурный гены разных серотипов вируса денге. В вариантах, где химерный вирус содержит остов из второго серотипа денге, остов денге содержит делецию приблизительно 30-нуклеотидов 3'НТР, которая соответствует TL-2 структуре петля на стебле и, необязательно, может содержать дополнительные аттенуирующие мутации. Любой аттенуированный вирус денге или вирус денге дикого типа может использоваться в качестве остова химерного вируса, введением 30-нуклеотидной делеции TL-2 структуры петля на стебле в вирусный остов аттенуированного денге или вирусный остов денге дикого типа. Аттенуация остова вируса денге может быть достигнута через серийный пассаж, через введение определенных генетических мутаций или через использование известных аттенуированных штаммов денге. Химерные вакцины от денге описаны, например, в Whitehead et al. WO 03/092592. В некоторых вариантах изобретения, живая аттенуированная вакцина содержит химерный флавивирус, где капсидный и неструктурный белки получают из серотипов денге, отличающихся от ргМ и Е белков.

Композиции вакцины от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением содержат эффективное количество живой аттенуированной вакцины от вируса. В некоторых вариантах изобретения, эффективность живой аттенуированной вакцины от денге составляет от 10 до приблизительно  $1 \times 10^7$  бляшкообразующих единиц (БОЕ). В альтернативных вариантах, эффективность живой аттенуированной вакцины от денге составляет от приблизительно  $1 \times 10^2$  до приблизительно  $1 \times 10^6$  БОЕ. В других вариантах, эффективность живой аттенуированной вакцины от денге составляет от приблизительно  $1 \times 10^3$  до приблизительно  $1 \times 10^5$  БОЕ.

Анализы вирусных бляшек определяют количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) в вирусном образце. Коротко, в анализе иммунного бляшкообразования денге слившийся монослой клеток хозяина (например, клетки Vero) заражают вирусом денге при варьирующих разведениях и покрывают полутвердым покрытием, содержащим метилцеллюлозу, для предотвращения беспорядочного распространения вирусной инфекции. Инфицированные вирусом клетки лизируют и распространяют инфекцию на соседние клетки, где повторяют цикл инфекция-лизис. Инфицированные клетки образуют бляшку (группу инфицированных клеток Vero, окруженных не инфицированными клетками), которая может быть видна визуально после фиксации и иммунного

окрашивания с применением анти-денге серотипа моноклональных антител (mAb). Бляшки считают, и результаты, в сочетании с коэффициентами разведения, используют для расчета количества бляшкообразующих единиц на мл (БОЕ/мл) в образцах. Результат эффективности денге БОЕ/мл представляет количество инфекционных частиц в образце и основан на предположении, что каждая образованная бляшка является типовой для одной инфекционной вирусной частицы.

#### *Субъединичная вакцина денге*

В некоторых вариантах изобретения составы дополнительно содержат рекомбинантную субъединичную вакцину от денге, которая содержит один или более белков антигенов денге. В предпочтительных вариантах этого аспекта изобретения, рекомбинантная субъединичная вакцина от денге содержит один или более белков денге, слитых белков или их фрагмент или фрагменты. В других предпочтительных вариантах, рекомбинантная субъединичная вакцина от денге содержит оболочку денге или E белок или его фрагмент.

В других предпочтительных вариантах, рекомбинантная субъединичная вакцина от денге является четырехвалентной, т.е., вызывает иммунный ответ против всех четырех серотипов денге. Рекомбинантная субъединичная вакцина от денге может содержать четыре рекомбинантных белка денге или менее четырех, например, рекомбинантный DEN1 белок, рекомбинантный DEN2 белок и рекомбинантный DEN3/4 слитый белок. В некоторых вариантах, рекомбинантная субъединичная вакцина от денге содержит гликопротеин оболочки вируса денге или его фрагменты, DEN1-4 (например, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E или DEN4-80EZip), который образуется и секретируется с использованием рекомбинантной системы экспрессии. Указанная субъединичная вакцина может необязательно содержать адъювант, как описано более подробно ниже.

В некоторых вариантах этого аспекта изобретения, рекомбинантная субъединичная вакцина от денге содержит один или более очищенных белков оболочки вируса денге ("E"), фармацевтически приемлемый эксципиент, где каждый E белок составляет приблизительно 80% длины дикого типа E, начиная с аминокислотного остатка 1 в его N-конце так, что указанный E белок секретируется в среду для выращивания при рекомбинантном экспрессировании в клетке хозяина, и где композиция вызывает образование нейтрализующих антител у человека. В некоторых вариантах изобретения, рекомбинантная субъединичная вакцина от денге дополнительно содержит эффективное количество адъюванта. В некоторых вариантах изобретения, DEN-4 E белок является двухмерным ("DEN4-80EZip"), как описано в US 6,749,857 и WO 2012/154202.

В некоторых вариантах этого аспекта изобретения, E белки в композиции, описанной выше, рекомбинантно образуются и экспрессируются в клетки хозяина насекомых. В других предпочтительных вариантах, E белок рекомбинантно образуется и экспрессируется в клетках хозяина *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2).

Рекомбинантные E белки вируса денге могут быть получены методами системы экспрессии клеточной культуры, в которой используют клетки *Drosophila* Schneider 2 (S2).

Эта система была продемонстрирована для получения рекомбинантных оболочечных белков денге, которые сохраняют подобную природную структуру (Cuzzubbo et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. (2001) 8:1150-55; Modis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100:6986-91; Modis et al., Nature (2004) 427:313-9; Zhang et al., Structure (2004)12(9):1607-18). Также было показано, что эта система экспрессии экспрессирует другие рекомбинантные оболочечные белки от других флавивирусов, таких как вирусы западного нила, японского энцефалита, гепатита С и клещевого энцефалита. Рекомбинантные оболочечные белки денге могут быть усечены на С-окончании, оставляя 80% природного оболочечного белка ("80E"). Таким образом, 80E определен как приблизительно первые 80% последовательных аминокислот Е белка, начиная с аминокислоты 1 на его N-конце.

Как указано выше, некоторые варианты этого аспекта изобретения содержат усеченные 80E белки, которые состоят из приблизительно 80% длины дикого Е, начиная с аминокислотного остатка 1 на его N-конце. Е белки, используемые в некоторых вариантах изобретения, имеют удаленную часть мембранного якоря (приблизительно последние 10% Е на карбокси окончании) белка. Другими словами, усеченные 80E белки, используемые в некоторых вариантах изобретения, состоят из первых 90% последовательных аминокислот Е, начиная с аминокислоты 1 его N-окончания, таким образом позволяя ему секретироваться во внеклеточную среду, способствуя восстановлению. Усечение может дополнительно удалять "стволовую" часть Е белка, который связывает 80E часть с частью мембранного белка; стволовая часть не содержит достойных внимания антигенных эпитопов и поэтому не включена в предпочтительные антигены, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E или DEN4-80EZip. Более 90%, но менее 100%, Е белка может быть клонировано и секретировано, т.е. белок может иметь длину 90%+, карбокси усеченную, и может включать часть трансмембранного домена до тех пор, пока усеченный Е белок секретруется. "Секретируемый" означает способный к секретированию, и обычно секретированный, из трансформированных клеток в системе экспрессии. Таким образом, специалист в данной области техники поймет, что Е белки денге, которые используют в композициях и способах в соответствии с настоящим изобретением, могут варьироваться от 80%, представленных здесь, до тех пор, пока белок секретруется. В предпочтительных вариантах каждого аспекта настоящего изобретения, DEN Е белки составляют приблизительно 80% длины, начиная с N-концевой аминокислоты оболочечного белка и заканчивая аминокислотой в интервале 393-401 аминокислоты, например, от аминокислоты 1 до аминокислоты 395 вируса денге 2 типа. В альтернативных вариантах каждого аспекта изобретения, Е белок денге может иметь приблизительно 75%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или приблизительно 98% последовательных аминокислот Е, начиная с аминокислоты 1 на его N-конце. В типовых вариантах аспектов изобретения, DEN Е белок содержит приблизительно 80% последовательных аминокислот Е белка, начиная с аминокислоты 1 его N-окончания; такой как DEN1-80E, как указано ниже в SEQ ID NO:1, DEN2-80E, как указано ниже в SEQ ID NO:2, DEN3-80E, как указано ниже в SEQ ID NO:3 и DEN4-80E, как указано ниже

в SEQ ID NO:4.

Секретированный E белок также может содержать домены, которые способствуют димеризации, такие как в DEN4-80EZip белке, так, что иммуногенность рекомбинантного белка дополнительно улучшается. Типовой DEN4-80EZip белок содержит последовательность аминокислот, указанную ниже в SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах этого аспекта изобретения, DEN1, DEN2 и DEN3 80E антигены, включенные в композицию, являются мономерными, и DEN4 80E антиген является двухмерным.

В альтернативных вариантах этого аспекта изобретения, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E и DEN4-80E белки в композиции являются мономерными. В таких вариантах, DEN4 компонент присутствует в количестве, составляющем от приблизительно 1,5 до приблизительно 3 раз от отдельных количеств DEN1, DEN2 и DEN3 белков, предпочтительно, приблизительно 2 раз от количества DEN1, DEN2 и DEN3 компонентов (белков). В предпочтительных вариантах этого аспекта изобретения, отношение DEN1:DEN2:DEN3:DEN4 антигенов в композициях составляет приблизительно 1:1:1:2.

В вариантах изобретения, содержащих E белки денге, количество каждого E белка в композиции составляет от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 500 мкг. В альтернативных вариантах, количество каждого E белка составляет от приблизительно 0,5 мкг до приблизительно 450 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 400 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 350 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 300 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 250 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 200 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 150 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 100 мкг, 0,5 мкг до приблизительно 50 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 500 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 450 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 400 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 350 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 300 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 250 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 200 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 150 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 100 мкг, 5,0 мкг до приблизительно 50 мкг, 10 мкг до приблизительно 500 мкг, 10 мкг до приблизительно 450 мкг, 10 мкг до приблизительно 400 мкг, 10 мкг до приблизительно 350 мкг, 10 мкг до приблизительно 300 мкг, 10 мкг до приблизительно 250 мкг, 10 мкг до приблизительно 200 мкг, 10 мкг до приблизительно 150 мкг, 10 мкг до приблизительно 100 мкг, 10 мкг до приблизительно 50 мкг, 25 мкг до приблизительно 500 мкг, 25 мкг до приблизительно 450 мкг, 25 мкг до приблизительно 400 мкг, 25 мкг до приблизительно 350 мкг, 25 мкг до приблизительно 300 мкг, 25 мкг до приблизительно 250 мкг, 25 мкг до приблизительно 200 мкг, 25 мкг до приблизительно 150 мкг, 25 мкг до приблизительно 100 мкг, или от 25 мкг до приблизительно 50 мкг. В дополнительных предпочтительных вариантах, количество каждого E белка в композиции составляет от приблизительно 1,0 мкг до приблизительно 100 мкг. В еще дополнительных вариантах, количество каждого E белка в композиции выбирают из приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мкг.

#### *Инактивированная вакцина денге*

Инактивированные вакцины денге содержат один или более цельных инактивированных вирусов денге и/или один или более инактивированных химерных

вирусов денге. В некоторых вариантах этого аспекта изобретения, инактивированная вакцина денге является четырехвалентной и содержит цельный инактивированный DEN1, DEN2, DEN3 и DEN4. В альтернативных вариантах, инактивированная вакцина содержит четыре инактивированных химерных вирусов денге. В еще других вариантах, инактивированная вакцина является четырехвалентной и содержит один или более цельных инактивированных вирусов денге и один или более инактивированных химерных вирусов денге, например, инактивированный цельный DEN1 вирус, инактивированный цельный DEN2 вирус, инактивированный DEN3 химерный вирус и инактивированный DEN4 химерный вирус. Специалист в данной области техники поймет, что любое сочетание инактивированных цельных или химерных DEN вирусов может использоваться в четырехвалентных композициях и способах в соответствии с настоящим изобретением, до тех пор пока вакцина поражает все четыре серотипа денге.

Инактивированные вакцины денге, применяемые в композициях и способах изобретения, описаны в Putnak et al. Vaccine 23: 4442-4452 (2005), US 6190859, US 6254873 и Sterner et al. WO 2007/002470. Альтернативно, штаммы вируса денге и химерные штаммы денге/химерные штаммы флавивируса могут быть инактивированы для применения в композициях способами, известными в данной области техники, например, химическими соединениями, теплом или облучением.

Следовательно, данное изобретение также относится к указанным выше составам, содержащим эффективные количества живой аттенуированной вакцины от денге и нерепликационной вакцины от денге, где живая, ослабленная вакцина от денге содержит по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус (ЖАХВ), где ЖАВ или ЖАХВ содержит вирусный геном, который содержит 30-нуклеотидную делецию TL-2 структуры петля на стебле в 3'НТР. В некоторых вариантах изобретения, нерепликационная вакцина от денге из композиций вакцин от вируса денге данного изобретения выбирают из рекомбинантной субъединичной вакцины от денге или инактивированной вакцины от денге. В одном варианте, состав лиофилизирован, заморожен, высушен микроволнами или имеет лиосферы с эффективными количествами живой аттенуированной вакцины от денге и нерепликационной вакцины от денге. В другом варианте, состав живой аттенуированной вакцины от денге восстанавливают жидким раствором, содержащим нерепликационную вакцину от денге, например, V180.

В предпочтительных вариантах изобретения, живая аттенуированная и нерепликационная вакцины от денге являются четырехвалентными (т.е. содержат DEN1, DEN2, DEN3 и DEN4 компоненты или вызывают иммунный ответ против DEN1, DEN2, DEN3 и DEN4).

#### *Адьюванты*

Совместное введение вакцин с соединениями, которые улучшают иммунный ответ против целевого антигена, известными как адьюванты, тщательно изучали. В дополнение к повышению иммунной реакции против целевого антигена, некоторые адьюванты могут

использоваться для снижения количества антигена, необходимого для вызова желательной иммунной реакции, или снижения количества инъекций, необходимых в клиническом режиме для того, чтобы вызвать иммунный ответ и обеспечить защиту от заболевания.

Исходя из этого, составы вакцины от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением можно применять в качестве адъюванта. Адъювантом составов, описанных здесь, может быть любой адъювант, который обеспечивает желаемую функцию, как описано выше, и не инактивирует или значительно влияет на титр ЖАВ или ЖАХВ композиции.

Было определено, что соединения на основе алюминия обладают адъювантной активностью более 60 лет назад (обзор см. в Lindblad, E.B. *Immunol. and Cell Biol.* 82: 497-505 (2004); Baylor et al. *Vaccine* 20: S18-S23 (2002)). Алюминиевые адъюванты обычно считаются безопасными при применении в подходящих дозах. Многие были одобрены для введения человеку контролирующими органами по всему миру.

Следовательно, соединения на основе алюминия, такие как гидроксид алюминия ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), гидроксифосфат алюминия ( $\text{AlPO}_4$ ), аморфный сульфат гидроксифосфата алюминия (АСГА) или так называемый "алюм" ( $\text{KAl}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) (см. Klein et al., *Analysis of aluminum hydroxyphosphate vaccine adjuvants by Al MAS NMR.*, *J. Pharm. Sci.* 89(3): 311-21 (2000)), могут быть объединены с представленными здесь композициями. В типовых вариантах представленного здесь изобретения, алюминиевым адъювантом является гидроксифосфат алюминия или АСГА. В альтернативных вариантах, алюминиевым адъювантом является адъювант на основе фосфата алюминия, обозначенный здесь "АФА". В других вариантах, адъювантом является гидроксид алюминия.

Специалист в данной области техники сможет определить оптимальную дозу алюминиевого адъюванта, которая и безопасна и эффективна для повышения иммунной реакции на целевые вирусы денге. Обсуждение профиля безопасности алюминия, а также количества алюминия, включенные в лицензированные FDA вакцины, представлено в Baylor et al., *Vaccine* 20: S18-S23 (2002). В общем, эффективная и безопасная доза алюминиевого адъюванта варьируется от 50 мкг до 1,25 мг элементарного алюминия на дозу (концентрация от 100 мкг/мл до 2,5 мг/мл).

Таким образом, конкретные варианты данного изобретения включают композиции, содержащие живую аттенуированную вакцину от вируса денге и дополнительно включает алюминиевый адъювант. В вариантах изобретения, композиции денге содержат адъювант, который содержит от приблизительно 50 мкг до приблизительно 1,25 мг элементарного алюминия на дозу вакцины. В других вариантах, алюминиевый адъювант на дозу композиции вакцины содержит количество элементарного алюминия, составляющее от приблизительно 100 мкг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 900 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 850 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 800 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 700 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 600 мкг, от

приблизительно 100 мкг до приблизительно 500 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 400 мкг, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 300 мкг, от приблизительно 100 до приблизительно 250 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 1,25 мг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 900 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 850 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 800 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 700 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 600 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 500 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 400 мкг, от приблизительно 200 мкг до приблизительно 300 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 1,25 мг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 900 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 850 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 800 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 700 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 600 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 500 мкг, от приблизительно 300 мкг до приблизительно 400 мкг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 1,25 мг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 900 мкг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 850 мкг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 800 мкг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 700 мкг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 600 мкг, от приблизительно 400 мкг до приблизительно 500 мкг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 1,25 мг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 900 мкг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 850 мкг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 800 мкг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 700 мкг, от приблизительно 500 мкг до приблизительно 600 мкг, от приблизительно 600 мкг до приблизительно 1,25 мг, от приблизительно 600 мкг до приблизительно 1,0 мг, от приблизительно 600 мкг до приблизительно 900 мкг, от приблизительно 600 мкг до приблизительно 850 мкг, от приблизительно 600 мкг до приблизительно 800 мкг или от приблизительно 600 мкг до приблизительно 700 мкг.

Другие адъюванты, которые могут использоваться в сочетании с композициями вакцины от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничены ими, адъюванты, содержащие CpG олигонуклеотиды или другие молекулы, действующие на toll-подобные рецепторы, такие как TLR4 и TLR9 (обзоры даны в Daubenger, C.A., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9(1):45-52 (2007); Duthie et al., *Immunological Reviews* 239(1): 178-196 (2011); Hedayat et al., *Medicinal Research Reviews* 32(2): 294-325 (2012)), включая липополисахарид, монофосфорильный липид А и 4-фосфаты аминокислоты. Дополнительные адъюванты, применяемые в композициях в соответствии с настоящим изобретением, включают иммуностимулирующие олигонуклеотиды (ИМО; см, *например*, U.S. 7,713,535 и U.S. 7,470,674); Т-хелперные

эпитопы, липид-А и его производные или варианты, липосомы, фосфат кальция, цитокины (например, гранулоцитарный макрофаг-колониестимулирующий фактор (GM-CSF) IL-2, IFN- $\alpha$ , Flt-3L), CD40, CD28, CD70, IL-12, белок теплового шока (HSP) 90, CD134 (OX40), CD137, CoVaccine HT, неионные блоксополимеры, неполный адъювант Фрейнда, хемокины, токсин холеры; E. coli термолабильный энтеротоксин; коклюшный токсин; мурамилдипептид, аналоги мурамилпептида, MF59, SAF, иммуностимулирующие комплексы, биоразлагаемые микросферы, полифосфазен; синтетические полинуклеотиды.

Дополнительные адъюванты для применения с композициями, описанными здесь, являются адъювантами, содержащими сапонины (*например*, QS21), отдельно или в сочетании с холестерином и фосфолипидом в характеристической форме ISCOM ("иммуностимулирующий комплекс", обзор представлен в Barr and Mitchell, Immunology and Cell Biology 74: 8-25 (1996); и Skene and Sutton, Methods 40: 53-59 (2006)). Такие адъюванты называются здесь "адъюванты на основе сапонины". В конкретных вариантах представленных здесь композиций, мутантные токсины и/или белки токсинов объединены с адъювантом типа ISCOM или "ISCOM", который является адъювантом с матричными частицами ISCOM, таким как ISCOMATRIX™, который производят без антигена (ISCOM™ и ISCOMATRIX™ являются зарегистрированными торговыми марками CSL Limited, Parkville, Australia).

#### Составы

Составы или композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат живую аттенуированную вакцину от денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус (ЖАХВ), буфер при pH приблизительно 6,5-8,5, сахар, гликоль или сахарный спирт и производное целлюлозы, выбранное из группы, состоящей из карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), 2-гидроксиэтилцеллюлозы (2-ГЭЦ), кросскармеллозы и метилцеллюлозы, или их фармацевтически приемлемой соли; необязательно, щелочной или щелочноземельной соли, и, необязательно, аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их сочетания.

В другом аспекте изобретения, состав содержит живую аттенуированную вакцину от денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 20-200000,00 БОЕ/мл, буфер при pH приблизительно 6,5-8,5, сахар в количестве приблизительно 150-300 мг/мл, носитель, выбранный из группы, состоящей из поливинилпирролидона (ПВП), карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), 2-гидроксиэтилцеллюлозы (2-ГЭЦ), кросскармеллозы, метилцеллюлозы или их фармацевтически приемлемой соли, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и желатина; необязательно щелочной соли или щелочноземельной соли в количестве приблизительно 5-100 мМ; и,

необязательно, аминокислоты Gln, Pro или Glu, или их сочетания.

В одном варианте, живая аттенуированная вакцина от денге имеет концентрацию 100-10000000 БОЕ/мл, 100-100000 БОЕ/мл или 600-20000 БОЕ/мл в составе. В другом варианте, живая аттенуированная вакцина от денге имеет концентрацию 200-200000 БОЕ/мл, 600-200000 БОЕ/мл или 600-100000 БОЕ/мл в составе.

В предпочтительных вариантах, производное целлюлозы является анионным и образует соль, например, натриевую или калиевую соль карбоксиметилцеллюлозы в количестве приблизительно 0,3-10 мг/мл, 1-10 мг/мл, 3-7 мг/мл или 5 мг/мл в составе живой аттенуированной вакцины от денге. Соль карбоксиметилцеллюлозы доступна в типе высокой вязкости со средней молекулярной массой приблизительно 700000; типе средней вязкости со средней молекулярной массой приблизительно 250000; и типе низкой вязкости со средней молекулярной массой приблизительно 90000. В одном варианте, производным целлюлозы является соль карбоксиметилцеллюлозы со средней молекулярной массой приблизительно 700000 в количестве приблизительно 0,3-1,5 мг/мл в составе живой аттенуированной вакцины от денге. В другом варианте, производным целлюлозы является соль карбоксиметилцеллюлозы со средней молекулярной массой приблизительно 250,000 в количестве приблизительно 1-4 мг/мл. В дополнительном варианте, производным целлюлозы является соль карбоксиметилцеллюлозы со средней молекулярной массой приблизительно 90000 в количестве приблизительно 3-7 или 3-10 мг/мл. В еще одном варианте, производным целлюлозы является соль карбоксиметилцеллюлозы со средней молекулярной массой от приблизительно 50000 до 1000000 в количестве приблизительно 0,3-10 мг/мл.

В одном варианте, буфер выбирают из группы, состоящей из фосфата, сукцината, гистидина, TRIS, MES, MOPS, HEPES, ацетата и цитрата в количестве приблизительно 5-300 мМ, 5-20 мМ, 10-12 мМ или 11 мМ.

Щелочная или щелочноземельная соль может обеспечить стабилизирующее действие и может быть выбрана из группы, состоящей из хлорида магния, хлорида кальция, хлорида калия, хлорида натрия или их сочетания в количестве приблизительно 10-150 мМ, 10-100 мМ, 15-75 мМ, 30-90 мМ, 75 мМ, 50 мМ или 30 мМ.

Аминокислота может быть выбрана из группы, состоящей из Val, Ile, Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их сочетания в количестве 10-100, 10-75, 10-50, 20-30 или 25 мМ. В другом варианте, аминокислота может быть выбрана из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их сочетания в количестве 10-100, 10-75, 10-50, 20-30 или 25 мМ. В одном варианте, аминокислотой является Lys, Leu или Glu. В другом варианте, аминокислотами являются Leu и Glu. В другом варианте, аминокислотой является Leu, Lys, Glu или Ala. В другом варианте, аминокислотой является Leu.

Сахар и гликоль или сахарный спирт может действовать как криопротектор или стабилизирующий эксципиент. В одном варианте, сахар содержится в концентрации 50-300 мг/мл. В другом варианте, сахаром является трегалоза или сахароза или их сочетание в количестве приблизительно 60-120 мг/мл, 90-110 мг/мл или 80-100 мг/мл. В одном

варианте, отношение сахарозы к трегалозе составляет 1:1-1:4. В другом варианте, сахароза составляет 90 мг/мл и трегалоза составляет 90-200 мг/мл, и, предпочтительно, 110 мг/мл. В другом варианте, гликолем является пропиленгликоль, и сахарным спиртом является глицерин или сорбит в количестве приблизительно 2,5-7,5 мг/мл, 3-7 мг/мл или 5 мг/мл.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены субъекту одним или несколькими способами, известными специалисту в данной области, например, парентерально, трансмукозально, трансдермально, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, внутриназально, подкожно, внутрибрюшинно, и соответствующим образом составлены.

В одном варианте, композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят эпидермальной инъекцией, внутримышечной инъекцией, внутривенной, внутриартериальной, подкожной инъекцией или инъекцией в слизистую дыхательных путей жидкого препарата. Жидкие составы для инъекций включают растворы и подобные. Композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть составлена в виде флаконов с однократной дозой, флаконов с множеством доз или в виде предварительно заполненных шприцев.

В другом варианте, композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят перорально и, таким образом, составляют в форме, подходящей для перорального введения, то есть в виде твердого или жидкого препарата. Твердые пероральные составы включают таблетки, капсулы, пилюли, гранулы, пеллеты и подобные. Жидкие пероральные составы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и подобные.

В одном аспекте изобретения, составом является твердый высушенный состав, полученный лиофилизацией, замораживанием, мушкой микроволнами или образованием лиосфер. В одном варианте, твердый высушенный состав получают или производят способом сушки микроволнами, описанным в примере 7. Составы могут храниться при  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8^{\circ}\text{C}$  или при комнатной температуре ( $25$  или  $37^{\circ}\text{C}$ ). Высушенные составы могут быть описаны посредством массы компонентов в флаконе с однократной дозой, но они варьируются по разным дозам или размерам флакона. Альтернативно, высушенные составы в соответствии с настоящим изобретением могут быть описаны посредством количества компонента как отношения массы компонента к массе лекарственного вещества (ЛВ) в одном образце (*например*, флаконе). Это отношение может быть выражено как процент. Такие отношения отражают внутренне свойство высушенных составов в соответствии с настоящим изобретением, независимо от размера флакона, дозирования и протокола восстановления. В других вариантах, составом являются лиосферы.

В другом аспекте изобретения, составом является восстановленный состав. Высушенный твердый состав может быть восстановлен в разных концентрациях в зависимости от клинических факторов, таких как способ введения или дозирование. Например, высушенный состав может быть восстановлен в высокой концентрации (т.е. в

небольшом объеме), если необходимо для подкожного введения. Высокие концентрации также могут быть необходимы, если дозирование требуется для конкретного субъекта, в частности, при подкожном введении, когда объем инъекции необходимо минимизировать. Дальнейшее разведение водой или изотоническим буфером может легко использоваться для разведения лекарственного продукта до более низкой концентрации. Если желательна изотоничность при низкой концентрации лекарственного продукта, высушенный порошок может быть восстановлен в стандартном низком объеме воды и затем дополнительно разведен изотоническим разбавителем, таким как 0,9% хлорид натрия.

Восстановление обычно проводят при температуре приблизительно 25°C для полной гидратации, хотя другие температуры могут использоваться при желании. Время, требуемое для восстановления, зависит, например, от типа разбавителя, количества эксципиента(ов) и вируса или белка. Типовые разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекций (БВДИ), pH буферированный раствор (например буферированный фосфатом физиологический раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Объем восстановления может составлять приблизительно 0,5-1,0 мл, предпочтительно, 0,5 мл или 0,7 мл. В одном варианте, однократная доза имеет объем 0,5 мл. В другом аспекте, в изобретении представлен способ получения жидкого состава, включающий стадии восстановления составов в соответствии с настоящим изобретением разбавителем, как описано выше.

В другом варианте изобретения, составом является водный раствор, полученный до лиофилизации, замораживания, сушки микроволнами или получения лиосфер.

#### Способы получения лиосфер

Способы получения лиосфер описаны в публикации заявки на патент США US20140294872, описание которой включено сюда в качестве ссылки полностью. Способ включает распространение, по крайней мере, одной жидкой капли, имеющей по существу сферическую форму, на твердой и плоской поверхности (т.е. не содержащей стенок образца или полостей), замораживание капли на поверхности без контакта капли с криогенным веществом и лиофилизацию замороженной капли с получением высушенной выпуклости, которая является по существу сферической по форме. В патенте США № 9,119,794, описание которого включено сюда в качестве ссылки полностью, также описаны способы получения лиосфер. Единичные объемы, содержащие смесь водной среды, образуют на твердом элементе, содержащем полости. Твердый элемент охлаждают ниже температуры замерзания смеси, полости заполняют смесью и смесь отверждается, пока находится в полости, образуя единичные формы. Единичные формы сушат в вакууме с получением лиосфер.

В других вариантах, лиосферы формируют в по существу сферическую форму и получают замораживанием капель жидкой композиции или желаемого биологического материала на плоской, твердой поверхности, в частности, поверхности, которая не имеет полостей, с последующей лиофилизацией единичных форм. В публикации заявки на патент США № US2014/0294872, описание которой включено сюда в качестве ссылки,

описаны подобные способы получения лиосфер.

Коротко, в некоторых вариантах способ включает распространение, по крайней мере, одной жидкой капли, имеющей по существу сферическую форму, на твердой и плоской поверхности (т.е. не содержащей стенок образца или полостей), замораживание капли на поверхности без контакта капли с криогенным веществом и лиофилизацию замороженной капли с получением высушенной выпуклости, которая является по существу сферической по форме. Способ может использоваться в режиме высокой производительности с получением множества высушенных выпуклостей при непрерывном распространении желаемого количества капель на твердой, плоской поверхности, замораживая капли и лиофилизируя замороженные капли. Выпуклости, полученные этим способом из жидкого состава, могут иметь высокую концентрацию биологического материала (такого как терапевтический белок), и может быть объединена в совокупность высушенных выпуклостей.

В некоторых вариантах, твердой, плоской поверхностью является верхняя поверхность металлической пластины, которая имеет нижнюю поверхность, которая находится в физическом контакте с теплоотводом, адаптированным для поддержания температуры верхней поверхности металлической пластины на уровне  $-90^{\circ}\text{C}$  или ниже. Так как верхняя поверхность металлической пластины находится при температуре ниже точки замораживания жидкого состава, капли замерзают практически мгновенно, как только нижняя поверхность капли касается верхней поверхности металлической пластины.

В других вариантах, твердая, плоская поверхность является гидрофобной и содержит верхнюю поверхность из тонкой пленки, которая выдерживается при приблизительно  $0^{\circ}\text{C}$  во время стадии распространения. Распространенная капля замерзает при охлаждении тонкой пленки до температуры ниже температуры замораживания состава.

#### Способ лиофилизации

Лиофилизированные составы в соответствии с настоящим изобретением получают лиофилизацией (сушкой вымораживанием) предлиофилизационного раствора. Сушка вымораживанием сопровождается замораживанием состава с последующей сублимацией воды при температуре, подходящей для первичной сушки. В этих условиях, температура продукта находится ниже эвтектической точки или температуры разложения состава. Обычно температура полки для первичной сушки составляет от приблизительно  $-50$  до  $25^{\circ}\text{C}$  (при условии, что продукт остается замороженным во время первичной сушки) при подходящем давлении, варьирующемся обычно от приблизительно 30 до 250 мТорр. Состав, размер и тип контейнера, в котором хранится образец (*например*, стеклянного флакона) и объем жидкости обуславливают время, требуемое для сушки, которое может варьироваться от нескольких часов до нескольких дней (*например*, 40-60 ч). Стадия вторичной сушки может проводиться при приблизительно  $0-40^{\circ}\text{C}$ , в зависимости, в первую очередь, от типа и размера контейнера и типа применяемого белка. Время вторичной сушки обуславливается желаемым уровнем остаточной влаги в продукте, и

обычно составляет, по крайней мере, приблизительно 5 часов. Обычно содержание влаги в лиофилизированном составе составляет менее приблизительно 5%, и, предпочтительно, менее приблизительно 3%. Давление может быть таким же, которое применяется во время стадии первичной сушки. Условия сушки вымораживанием могут варьироваться в зависимости от состава, размера флакона и лотков для лиофилизации.

В некоторых случаях, может быть желательно лиофилизировать или сушить микроволнами состав в контейнере, в котором будет проводиться восстановление, для того, чтобы избежать стадии переноса. В этом случае контейнером может быть, например, флакон 2, 3, 5, 10 или 20 мл.

#### *Способы применения*

Варианты данного изобретения также включают одну или более вакцинных композиций или составов от денге, описанных здесь (i) для применения в, (ii) для применения в качестве лекарственного средства или композиции для, или (iii) для применения в приготовлении лекарственного средства для: (a) терапии (например, тела человека); (b) медицины; (c) ингибирования репликации вируса денге, включая DEN1, DEN2, DEN3 и/или DEN4; (d) вызова иммунной реакции или защитной иммунной реакции против одного или более из DEN1, DEN2, DEN3 и/или DEN4; (e) вызова реакции нейтрализующего вирус антитела против одного или более типов денге; (f) лечения или профилактики заражения вирусом денге; (g) профилактики рецидива заражения вирусом денге; (h) снижения развития, наступления или тяжести патологических симптомов, связанных с заражением вирусом денге и/или снижения вероятности заражения вирусом денге или, (i) лечения, профилактики или задержки наступления, тяжести или развития ассоциированного с денге заболевания, включая, но не ограничиваясь ими: лихорадку денге, геморрагическую лихорадку денге и синдром шока денге. При таком применении вакцинные композиции от денге необязательно могут использоваться в сочетании с одним или более адъювантов (например, АСГА, фосфатом алюминия, гидроксидом алюминия, таким как Alhydrogel®, или другим адъювантом на основе соли алюминия, адъювантом на основе сапонины, таким как ISCOMATRIX™ (CSL, Ltd.), TLR-агонистом или жировыми наночастицами, описанными здесь).

Профилактическое лечение может проводиться с применением вакцинной композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением, как описано здесь. Композиция в соответствии с настоящим изобретением может вводиться населению в целом или тем персонам, которые подвержены повышенному риску заражения денге, например, тем персонам, которые живут или путешествуют в те части мира, в которых преобладают комары рода *Aedes*.

“Нуждающиеся в лечении” включают тех, кто уже заразился денге (например, зараженных одним или более из DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4), а также тех, кто склонен к инфекции, или любого человека, для которого желательно снизить вероятность заражения.

Вакцинные композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением

могут быть составлены и введены пациенту с применением методов, хорошо известных в данной области техники. Руководство по фармацевтическому введению, в общем, представлено в, например, Vaccines Eds. Plotkin and Orenstein, W.B. Sanders Company, 1999; Remington's Pharmaceutical Sciences 20<sup>th</sup> Edition, Ed. Gennaro, Mack Publishing, 2000; и Modern Pharmaceutics 2<sup>nd</sup> Edition, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990.

Следовательно, в изобретении представлен способ вызова защитной иммунной реакции у пациента против заражения денге, включающий стадию введения пациенту иммунологически эффективного количества любой вакцинной композиции от вируса денге, описанной здесь. В одном варианте, вакцинную композицию от вируса денге вводят совместно, в сочетании с другими вакцинами для лечения или профилактики заболеваний от вируса Зика, кори-паротита-краснухи или ветряной оспы.

Также в данном изобретении представлен способ лечения заражения денге, или лечения любого патологического состояния, ассоциированного с заражением денге, где такое лечение включает профилактику заражения и снижение тяжести клинических симптомов, задержку или предотвращение развития заболевания и/или снижение вероятности заражения или его клинических симптомов; где способ включает стадию введения пациенту иммунологически эффективного количества любой из вакцинных композиций, описанных здесь.

Дополнительные варианты изобретения содержат введение двух или более композиций в соответствии с настоящим изобретением пациенту в режиме примирования/стимулирования. Следовательно, изобретение относится к способу профилактики или снижения вероятности заражения денге у пациента, нуждающегося в таковом, включающему стадии:

- (a) введения первой вакцинной композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением пациенту;
- (b) ожидания в течение определенного периода времени после стадии (a);
- (c) введения пациенту второй вакцинной композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением; и
- (d) необязательно. повторения стадий (b) и (c);

где у пациента предотвращается заражение денге или снижается вероятность заражения денге.

В вариантах указанного выше способа, вакцинные композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением имеют форму замороженной жидкости. В альтернативных вариантах, вакцинные композиции от вируса денге лиофилизированы или высушены микроволнами и восстановлены стерильным разбавителем до введения пациенту.

Количество времени между первой дозой вакцинной композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением и второй дозой вакцинной композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением или любой последующей дозой составляет от приблизительно 2 недель до приблизительно 2 лет. В предпочтительные

вариантах изобретения, время, которое проходит между множеством введений, составляет от 2 месяцев до 12 месяцев. В альтернативных вариантах этого аспекта изобретения, количество времени между каждым введением каждой дозы вакцинной композиции независимо выбирают группы, состоящей из 2 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 13 месяцев, 14 месяцев, 15 месяцев, 16 месяцев, 17 месяцев, 18 месяцев, 19 месяцев, 20 месяцев, 21 месяцев, 22 месяцев, 23 месяцев и 24 месяцев.

В некоторых вариантах изобретения, первая и вторая вакцинные композиции от вируса денге являются одинаковыми. В альтернативных вариантах, первая и вторая вакцинные композиции от вируса денге являются не одинаковыми.

Вакцинные композиции от вируса денге в соответствии с настоящим изобретением могут вводиться разными способами. В предпочтительных вариантах изобретения, композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят парентерально, например, внутривенно, подкожно или внутримышечно. Подкожное и внутримышечное введение может проводиться с применением, например, игольных или безыгольных шприцев.

Описанные здесь композиции могут вводиться методом, совместимым с дозируемым составом, и в таком количестве, которое является иммунологически эффективным для лечения и/или снижения вероятности заражения денге. Доза, вводимая пациенту в контексте данного изобретения, должна быть достаточной для вызова положительной реакции у пациента в течение времени, такой как снижение уровня вируса денге, или для снижения вероятности заражения денге. Количество вводимых вакцин от вируса денге может зависеть от лечимого пациента, включая возраст, пол, массу тела и общее состояние здоровья. В связи с этим, точной количество вакцины, требуемое для введения, будет основываться на мнении лечащего врача. При определении эффективного количества вакцины, вводимого при лечении или профилактики заражения денге, терапевт может оценить уровни в плазме, развитие заболевания и образование антител против денге. В любом случае, подходящие дозы иммуногенных композиций в соответствии с настоящим изобретением могут быть легко определены специалистом в данной области техники.

Подходящие режимы дозирования предпочтительно определяют, принимая во внимание факторы, хорошо известные в данной области техники, включая возраст, массу тела, пол и медицинское состояние пациента; способ введения; желаемый эффект; и конкретную применяемую композицию. Время приема доз зависит от факторов, хорошо известных в данной области техники, и могут варьироваться от 2 недель до 24 месяцев. После начального введения, одна или более дополнительных доз могут быть введены для поддержания и/или увеличения титров антител.

Изобретение также относится к способам профилактики заражения денге или профилактики или облегчения его симптомов, включающим стадии: введения пациенту, у которого предотвращают или облегчают заражение денге или его симптомы, композиций вакцины от вируса денге. Другие варианты этого аспекта изобретения включают

прохождение определенного количества времени между введением вакцинной композиции от вируса денге и введением второй дозы вакцинной композиции от вируса денге.

В описанном выше способе первая вакцина от денге является, предпочтительно, четырехвалентной, и содержит DEN1, DEN2, DEN3 и DEN 4 компонент, где каждый компонент содержит либо живой аттенуированный вирус денге, либо живой аттенуированный химерный флавивирус, как описано здесь. В типовых вариантах, живая аттенуированная вакцина денге содержит четыре химерных флавивируса; где каждый из химерных флавивирусов содержит rГМ и Е белки одного серотипа вируса денге и капсидный и неструктурный белки разных флавивирусов, где каждый из химерных флавивирусов ослаблен. В определенных вариантах, капсидный и неструктурный белки четырех химерных флавивирусов происходят из вируса желтой лихорадки. В альтернативных вариантах, капсидный и неструктурный белки каждого из четырех химерных флавивирусов происходят из других серотипов денге, чем rГМ и Е белки.

В некоторых вариантах этого аспекта изобретения, второй вакциной от денге является четырехвалентная рекомбинантная субъединичная вакцина от денге, содержащая Е белки денге или их фрагменты, из DEN1, DEN2, DEN3 и DEN4. Субъединичные вакцины, применяемые в способе в соответствии с настоящим изобретением, описаны здесь. В предпочтительных вариантах, каждый из белков Е составляет приблизительно 80% длины дикого типа Е из DEN1, DEN2, DEN3 и DEN4, начиная от остатка аминокислоты 1 на N-конце.

### ПРИМЕРЫ

Примеры последовательностей живого аттенуированного вируса денге, применяемых в этих исследованиях, включают rDEN1 - rDEN1Δ30-1545 PMVS (SEQ ID NO: 6); rDEN2 - rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163 PMVS (SEQ ID NO: 7); rDEN3 - rDEN3Δ30/31-7164 PMVS (SEQ ID NO: 8); и rDEN4 - rDEN4Δ30-7132,7163,8308 PMVS (SEQ ID NO: 9).

Таблица 1: Краткое описание изменений последовательности PMVS DENV1

Номер нуклеотида	Ген	Изменение нуклеотида		Номер аминокислоты белка	Изменение аминокислоты	
		дт	PMVS		дт	PMVS
1544*	Е	А	С	484	Lys	Arg
1545	Е	А	G	484	Lys	Arg
1549*	Е	А	G	485	Ser	Ser

\*Введен в целях стабилизации и клонирования

Таблица 2: Краткое описание изменений последовательности PMVS DENV2

Номер нуклеотида	Ген	Изменение нуклеотида	Номер аминокислоты	Изменение аминокислоты
------------------	-----	----------------------	--------------------	------------------------

		Оригиналь ный клон КДНК	PMV S	белка	Оригиналь ный клон КДНК	PMV S
183	C	T	C	28	Leu	Leu
1490	E	G	A	184	Glu	Glu
1495	E	C	U	186	Ser	Phe
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
7166	NS4b	C	G	113	Val	Val
7169	NS4b	T	C	114	His	His

Таблица 3: Краткое описание изменений последовательности PMVS DENV3

Номер нуклеотида	Ген	Изменение нуклеотида		Номер аминокислоты белка	Изменение аминокислоты	
		дт	PMVS		дт	PMVS
1539	E	A	G	202	Lys	Arg
1681	E	A	G	250	Val	Val
2095	E	C	U	388	Ile	Ile
7164	NS4b	T	C	115	Val	Ala
7304	NS4b	T	C	162	Ser	Pro
8082	NS5	A	G	173	Lys	Arg
10533	3'НТР	G	A	Н/А	Н/А	Н/А

Таблица 4: Краткое описание изменений последовательности PMVS DENV4

Номер нуклеотида	Ген	Изменение нуклеотида		Номер аминокислоты белка	Изменение аминокислоты	
		Оригиналь ный клон КДНК	PMV S		Оригиналь ный клон КДНК	PMV S
2440	NS1	T	C	6	Val	Ala
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7153	NS4b	T>C	U	109	Val>Ala	Val
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
8308	NS5	A>G	G	249	Lys>Arg	Arg

DENV1, 2, 3 и 4 дикий тип и оригинальный клон кДНК в указанных выше таблицах соответствуют серотипу вируса денге, описанному в Whitehead, S. S. et al., J Virol 77:1653-1657 (2003); Blaney, J. E. et al. The American journal of tropical medicine and hygiene 71:811-

821 (2004); Blaney, J. E., Jr. et al., BMC Infect Dis 4:39 (2004); Durbin, A. P. et al., The American journal of tropical medicine and hygiene 65:405-413 (2001).

Указанные выше версии живого аттенуированного вируса денге обозначены как DENV1 или DEN1, DENV2 или DEN2, DENV3 или DEN3 и DENV4 или DEN4 ниже в примерах. Для примеров 1-6, составы имеют удельную активность  $2 \times 10^5$  БОЕ/мл каждого DENV1, DENV2, DENV3 или DENV4. Для примеров 7-10, составы имеют удельную активность  $1,5 \times 10^5$  БОЕ/мл каждого DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4.

#### **ПРИМЕР 1**

#### **Действие СМС, ПГ и аминокислот (по сравнению с составом Dengvaxia®) на DENV4**

Три отдельных анализа провели для исследования действия различных эксципиентов на выход лиофилизации и стабильность DENV4. Составы перечислены в таблице 5.

**Таблица 5: Композиции составов**

<b>Номер состава</b>	<b>Композиция</b>
1	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 30 мМ хлорида натрия рН 7,5
2	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы рН 7,5
3	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия рН 7,5
4	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия рН 7,5
5	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
13	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 25 мг/мл сорбита, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия рН 7,5
18	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L аргинина рН 7,5
19	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L глутаминовой кислоты рН 7,5
20	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L лейцина рН 7,5
21	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L

	пролина рН 7,5
22	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл глицерина рН 7,5
25	11 мМ TRIS, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
26	6 мМ TRIS, 37,5 мг/мл сорбита, 75 мг/мл сахарозы, 55 мг/мл трегалозы, 2,5 мг/мл мочевины, 15 мг/мл смеси аминокислот <sup>†</sup>
45	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
46	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 30 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
47	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 15 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
50	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида калия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
55	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл глицерина, 5 мг/мл мочевины рН 7,5
56	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 201 мг/мл среды Лейбовица L-15 без фенолового красного*, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля рН 7,5
57	5,5 мМ TRIS, 5,5 мМ L гистидина, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L лейцина рН 7,5
81	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L лейцина рН 7,5
98	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L лейцина, 0,01% полоксамера 188 рН 7,5
104	11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ хлорида натрия, 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, 5 мг/мл пропиленгликоля, 25 мМ L лейцина, 25 мМ L глутаминовой кислоты, рН 7,5

\* Среда Лейбовица L-15 без фенолового красного является раствором производства Nyclone Laboratories, Inc.

Анализ 1: DENV4 составляют в 11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы и 75 мМ NaCl (состав 3), с добавлением 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия (КМЦ натрия) (состав 4) или добавлением 5 мг/мл КМЦ натрия и 5 мг/мл пропиленгликоля (состав 5).

Анализ 2: Состав 5 тестируют против сравнимых составов, содержащих либо 25 мМ лейцина (состав 20) или 25 мМ пролина (состав 21), а также 11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия и 5 мг/мл пропиленгликоля.

Анализ 3: Состав 20 тестируют против сравнимого состава, содержащего 11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия и 5 мг/мл пропиленгликоля и 25 мМ глутаминовой кислоты (состав 19) и состава Dengvaxia® (состав 26), который состоит из 37,5 мг/мл сорбита, 75 мг/мл сахарозы, 55 мг/мл трегалозы, 25 мг/мл мочевины, 6 мМ TRIS, 15 мг/мл смеси аминокислот.

Для всех анализов образцы замораживают и часть хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$  в виде замороженных жидких контролей, и часть лиофилизируют. После лиофилизации некоторые образцы хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$  в качестве контроля, и оставшиеся помещают при  $25^{\circ}\text{C}$  на 1 неделю. После инкубирования образцы  $25^{\circ}\text{C}$  замораживают и тестируют в анализе относительной инфекционности денге (АОИД) вместе с замороженными жидкими контролями и замороженными лиофилизированными контролями. Тестируют два отдельных флакона каждого образца.

АОИД является клеточным анализом относительно инфекционности, применяемым для измерения инфекционности образцов состава вируса денге, на основе экспрессии оболочечного белка. Клетки Vero помещают в 96-луночные титровальные микропланшеты, инкубируют в течение 24 часов и затем заражают серийными разведениями DEN1, DEN2, DEN3 и/или DEN4 ссылочным стандартом и положительным контролем, специфическим для тестируемого серотипа, в дополнение к тестируемым продуктам. Зараженные клетки инкубируют в течение 48 часов, и затем фиксируют клетки разведенным раствором формальдегида. Фиксированные клетки затем пермеабелизируют перед добавлением первичного антитела (кроличьего анти-DEN серотип-специфического MAб) в планшеты и инкубированием в течение ночи. После промывания планшетов вторичное антитело (ослиный NL637-конъюгированный анти-кроличий IgG, R&D Systems) добавляют в лунки и инкубируют при комнатной температуре в течение  $> 2$  ч. После промывания планшетов добавляют ФСБ в лунки в препарат для анализа изображений с применением ридера для визуализации MiniMax (Molecular Devices). Относительную активность (% ОА) образцов (относительно ссылочного стандарта) рассчитывают с применением программы SoftMAX Pro (Molecular Devices) с применением уменьшенной 4-параметрической логистической кривой.

Выход лиофилизированных образцов рассчитывают делением результата инфекционности лиофилизованного образца на результат инфекционности замороженного жидкого контроля. Для расчета логистической функции потери после хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение одной недели, значения инфекционности превращают в логарифмическую шкалу, и логарифмический результат для 1 недели при  $25^{\circ}\text{C}$  вычитают

из результата  $-70^{\circ}\text{C}$  лиофилизированного контроля для каждого состава.

Синергетический эффект наблюдают для сочетания КМЦ натрия и пропиленгликоля, которое дает улучшенный выход лиофилизации и стабильность. Добавление лейцина дополнительно улучшает выход и стабильность. Составы, содержащие КМЦ натрия, пропиленгликоль и лейцин или глутаминовую кислоту, дают улучшенный выход лиофилизации по сравнению с составом Dengvaxia. См. фигуры 1-2. Точку стабильности образцов 1 неделя  $25^{\circ}\text{C}$  для состава 26 не тестируют из-за разрушения лепешки после хранения при  $25^{\circ}\text{C}$ .

### **ПРИМЕР 2**

#### **Действие сахарного спирта на DENV4:**

DENV4 составляют в основном составе 11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ NaCl и 5 мг/мл КМЦ натрия pH 7,5 с 5 мг/мл пропиленгликоля (состав 5), 5 мг/мл глицерина (состав 22) или 25 мг/мл сорбита (состав 13) в качестве сахарных спиртов.

Образцы замораживают, и часть хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$  в виде замороженных жидких контролей, и часть лиофилизируют. После лиофилизации некоторые образцы хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$ , и оставшиеся помещают при  $25^{\circ}\text{C}$  на 1 неделю. После инкубирования  $25^{\circ}\text{C}$  образцы замораживают и тестируют в анализе относительной инфекционности денге вместе с замороженными жидкими контролями и замороженными лиофилизированными контролями. Тестируют два отдельных флакона каждого образца.

Выход лиофилизации рассчитывают делением результата инфекционности лиофилизированного образца на результат инфекционности замороженного жидкого контроля. Для расчета логистической функции потери после хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение одной недели, значения инфекционности превращают в логарифмическую шкалу, и логарифмический результат для 1 недели при  $25^{\circ}\text{C}$  вычитают из результата  $-70^{\circ}\text{C}$  лиофилизированного контроля для каждого состава.

Этот пример демонстрирует, что и пропиленгликоль и глицерин улучшают выход лиофилизации и стабильность DENV4 по сравнению с сорбитом (см. фигуры 3 и 4).

### **ПРИМЕР 3**

#### **Действие pH на DENV4:**

DENV4 составляют в состав 22 (11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия, 5 мг/мл глицерина при pH 7,0, 7,5 или 8,0).

Образцы замораживают, и часть хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$  в виде замороженных жидких контролей, и часть лиофилизируют. После лиофилизации некоторые образцы хранят при  $-70^{\circ}\text{C}$ , и оставшиеся помещают при  $25^{\circ}\text{C}$  на 1 неделю. После инкубирования  $25^{\circ}\text{C}$  образцы замораживают и тестируют в анализе относительной инфекционности денге вместе с замороженными жидкими контролями и замороженными лиофилизированными контролями. Тестируют два отдельных флакона каждого образца.

Выход лиофилизации рассчитывают делением результата инфекционности лиофилизированного образца на результат инфекционности замороженного жидкого контроля. Для расчета логистической функции потери после хранения при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение

одной недели, значения инфекционности превращают в логарифмическую шкалу, и логарифмический результат для 1 недели при 25°C вычитают из результата -70°C лиофилизированного контроля для каждого состава.

Фигуры 5 и 6 демонстрируют, что DENV4 может быть составлен в состав 22 при pH 7,0 до pH 8,0.

#### **ПРИМЕР 4**

##### **Действие буфера на DENV4:**

В анализе 1, DENV4 составляют в основной состав 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия и 5 мг/мл глицерина с альтернативными буферными системами, доведенными до pH 7,5. Состав 22 содержит 11 мМ фосфата калия и состав 25 содержит 11 мМ TRIS в дополнение к основному составу.

В анализе 2, DENV4 составляют в основной состав 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия и 5 мг/мл пропиленгликоля с альтернативными буферными системами, доведенными до pH 7,5. Состав 5 содержит 11 мМ фосфата калия и состав 57 содержит сочетание 5,5 мМ гистидина и 5,5 мМ TRIS в дополнение к основному составу.

Образцы замораживают, и часть хранят при -70°C в виде замороженных жидких контролей, и часть лиофилизируют. После лиофилизации некоторые образцы хранят при -70°C, и оставшиеся помещают при 25°C на 1 неделю. После инкубирования 25°C образцы замораживают и тестируют в анализе относительной инфекционности денге вместе с замороженными жидкими контролями и замороженными лиофилизированными контролями. Тестируют два отдельных флакона каждого образца.

Выход лиофилизации рассчитывают делением результата инфекционности лиофилизированного образца на результат инфекционности замороженного жидкого контроля. Для расчета логистической функции потери после хранения при 25°C в течение одной недели, значения инфекционности превращают в логарифмическую шкалу, и логарифмический результат для 1 недели при 25°C вычитают из результата -70°C лиофилизированного контроля для каждого состава.

Фигуры 7 и 8 демонстрируют, что DENV4 может быть составлен во множестве буферных систем при pH 7,5, включая фосфат калия, TRIS или сочетание гистидина и TRIS.

#### **ПРИМЕР 5**

##### **Действие NaCl на DENV4:**

DENV4 составляют в основной состав 11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 5 мг/мл КМЦ натрия и 5 мг/мл пропиленгликоля с интервалом концентрации NaCl 15-75 мМ.

Образцы замораживают, и часть хранят при -70°C в виде замороженных жидких контролей, и часть лиофилизируют. После лиофилизации некоторые образцы хранят при -70°C, и оставшиеся помещают при 25°C на 1 неделю. После инкубирования 25°C образцы замораживают и тестируют в анализе относительной инфекционности денге вместе с замороженными жидкими контролями и замороженными лиофилизированными

контролями. Тестируют два отдельных флакона каждого образца.

Выход лиофилизации рассчитывают делением результата инфекционности лиофилизованного образца на результат инфекционности замороженного жидкого контроля. Для расчета логистической функции потери после хранения при 25°C в течение одной недели, значения инфекционности превращают в логарифмическую шкалу, и логарифмический результат для 1 недели при 25°C вычитают из результата -70°C лиофилизованного контроля для каждого состава.

Фигуры 9 и 10 показали, что выход лиофилизации и стабильность DENV4 в течение 1 недели при 25°C были одинаковыми при изменении концентрации от 15 до 75 мМ.

#### **ПРИМЕР 6**

##### **Действие пропиленгликоля и глицерина на все серотипы денге:**

DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4 готовят в виде одновалентных лекарственных продуктов в составе 5 (11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ, 5 мг/мл пропиленгликоля), составе 20 (11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 50 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ, 5 мг/мл пропиленгликоля и 25 мМ лейцина) и составе 22 (11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ, 5 мг/мл глицерина) при pH 7,5.

Образцы замораживают, и часть хранят при -70°C в виде замороженных жидких контролей, и часть лиофилизируют. После лиофилизации некоторые образцы хранят при -70°C, и оставшиеся помещают при 25°C на 1 неделю. После инкубирования 25°C образцы замораживают и тестируют в анализе относительной инфекционности денге вместе с замороженными жидкими контролями и замороженными лиофилизованными контролями. Тестируют два отдельных флакона каждого образца.

Выход лиофилизации рассчитывают делением результата инфекционности лиофилизованного образца на результат инфекционности замороженного жидкого контроля. Для расчета логистической функции потери после хранения при 25°C в течение одной недели, значения инфекционности превращают в логарифмическую шкалу, и логарифмический результат для 1 недели при 25°C вычитают из результата -70°C лиофилизованного контроля для каждого состава.

Фигуры 11 и 12 показывают, что пропиленгликоль и глицерин стабилизируют все четыре серотипа в сочетании с сахарозой, NaCl и КМЦ натрия.

#### **ПРИМЕР 7**

СФГ (сахароза, фосфат калия, глутаминовая кислота) получают в виде 10X раствора с концентрацией, указанной ниже в таблице 6.

Таблица 6

Сахароза (кристаллы)	746,2 мг/мл
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (одноосновный, безводный)	5,17 мг/мл
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> (двухосновный, безводный)	12,54 мг/мл

L-глутаминовая кислота (мононатриевая соль, моногидрат)	11,2 мг/мл
---	------------

Также получают следующие другие растворы: 650 мг/мл сахарозы, 650 мг/мл трегалозы, дигидрат, 200 мг/мл желатина, 150 мг/мл аргинина и 20 мг/мл человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

СФГ, сахарозу, трегалозу, желатин, аргинин и ЧСА фильтруют с ПЭС 0,22 мкм фильтрами Stericup. Растворы, L-15 Лейбовица и DEN1 объединяют с получением конечных составов, показанных ниже:

Таблица 7

Rx#	Составы
1	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы
2	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы
4	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 2,5 мг/мл РАЧ
5	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 25 мг/мл Желатина
6	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 150 мг/мл Сахарозы
7	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы
9	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы, 40 мг/мл Аргинина
11	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы
12	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 25 мг/мл Желатина
13	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы, 40 мг/мл Аргинина

Составы заполняют в 2R стеклянные флаконы в количестве 0,5 мл и замораживают при -115°C в течение 15 минут. После замораживания флаконы сушат в микроволновой вакуумной сушилке (МВС). После сушки некоторые флаконы помещают для тестирования стабильности при 25°C на 1 неделю. Затем флаконы подвергают тестированию активности с применением анализа относительной инфекционности денге (АОИД).

#### **Способ микроволновой сушки**

Продукт, высушиваемый в микроволновой вакуумной сушилке (МВС) замораживают в интенсивном потоке воздуха и загружают в сушильную камеру. В камере быстро создают вакуум до ниже 100 мТорр. После достижения уставки вакуума, магнетроны (т.е. количество магнетрона и выходную мощность) выбирают так, чтобы начать сушку продукта. Микроволны (облучение используют в формате блуждающей волны) работают в режиме сканирования с алгоритмом, который циклически повторяет выбранные магнетроны (например, 2 магнетрона из всего 4 магнетронов), включая и выключая каждые 30 секунд для однородного распределения энергии. Более того, гидродинамическая нагрузка в верхней части устройства позволяет однократное прохождение микроволны через образец, которое минимизирует любое вмешательство отраженной микроволны, тем самым позволяя контролируемую сублимацию. Энергию увеличивают через цикл сушки для достижения конечной температуры 30-45°C. После сушки вакуум разрушают в камере, и продукт герметично запечатывают.

Таблица 8

Rx#	1	2	4	5	6	7	9	11	12	13
Rx	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 2,5 мг/мл	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 25 мг/мл	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 150 мг/мл Сахарозы	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы, 40 мг/мл	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 25 мг/мл	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 40 мг/мл
Выход 3/0 (%)	55	88	142	102	61	69	53	23	98	29
Выход сушки (%)	62	59	67	83	64	78	6	167	98	10
Ср. лог. потери	0,45	0,26	0,23	0,19	0,33	0,35	3,65	0,36	0,27	2,11

Выход после замораживания/оттаивания (3/0), выход после сушки и логистической функции потери при 25°C в течение 1 недели определяют для всех составов. Выход после замораживания/оттаивания (3/0) рассчитывают делением заявленной относительной активности на ожидаемую относительную активность для замороженных контролей при -70°C. Выход после сушки рассчитывают делением относительной активности высушенного продукта на относительную активность замороженного контроля.

Логистическую функцию потери рассчитывают превращением относительной активности в момент времени T<sub>0</sub> высушенного продукта и продукта после тестирования стабильности в течение 1 недели при 25°C в логарифмы расчетом Log<sub>10</sub>. После превращения цифр в логарифм, момент времени стабильности вычитают из момента времени T<sub>0</sub> для определения логистической функции потери при 25°C в течение 1 недели.

Составы 2, 4, 5 и 12 показали наилучшее сочетание выхода З/О, выхода после сушки и логистической функции потери при 25°C в течение одной недели. Все четыре состава содержат ≥25% дисахарида (сахарозы и/или трегалозы).

Таблица 9: Перечень интервалов эксципиентов составов из таблицы 7

Эксципиенты	Количество (на дозу 0,5 мл)
Сахароза	37,5 мг - 75 мг
Фосфат калия (одноосновный, безводный)	~0,26 мг
Фосфат калия (двухосновный, безводный)	~0,63 мг
L-глутаминовая кислота (мононатриевая соль, моногидрат)	0,56 мг
Трегалоза	37,5 мг - 87,5 мг
Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА)	1,25 мг
Аргинин	20 мг
Желатин	12,5 мг

#### ПРИМЕР 8

СФГ (сахароза, фосфат калия, глутаминовая кислота) получают по примеру 7.

Также получают следующие другие растворы: 650 мг/мл сахарозы, 650 мг/мл трегалозы, 5М хлорида натрия (NaCl) и 10 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия (КМЦ натрия).

Все растворы фильтруют через ПЭС 0,22 мкм фильтры Stericup. Растворы и вирус денге DEN1 или DEN4 объединяют с получением конечных составов, показанных в таблице с результатами.

Составы заполняют в 2R стеклянные флаконы в количестве 0,5 мл и замораживают при -115°C в течение 15 минут. После замораживания флаконы сушат в микроволновой вакуумной сушилке (MBC). После сушки некоторые флаконы помещают для тестирования стабильности при 25°C на 1 неделю. Затем флаконы подвергают тестированию активности с применением анализа относительной инфекционности денге (АОИД).

Таблица 10

Составы	DEN1 Ср. лог. потери 25°C 1 неделя	DEN4 Ср. лог. потери 25°C 1 неделя	Остаточная влага (%)

11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы	0,55	0,55	5,65±0,75
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 30 мМ NaCl	0,46	0,54	5,61±0,40
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 175 мг/мл Трегалозы, 30 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия	0,60	0,59	4,58±0,33
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы	1,12	0,95	3,71±0,22
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы, 30 мМ NaCl	0,96	0,51	4,75±0,54
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Сахарозы, 75 мг/мл Трегалозы, 30 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрия	1,07	0,65	3,98±0,01
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Трегалозы	0,83	1,82	2,20±0,12
11 мМ Фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 75 мг/мл Трегалозы, 30 мМ NaCl	1,18	1,33	3,43±0,19

Логистическую функцию потери рассчитывают превращением относительной активности в момент времени  $T_0$  высушенного продукта и продукта после тестирования стабильности в течение 1 недели при 25°C в логарифмы расчетом  $\text{Log}_{10}$ . После превращения цифр в логарифм, момент времени стабильности вычитают из момента времени  $T_0$  для определения логистической функции потери при 25°C в течение 1 недели.

Результаты показали, что для составов DEN1, содержащих  $\geq 25\%$  дисахаридов, наблюдается наименьшая логистическая функция потери при 25°C в течение одной недели. Составы DEN4 с  $\geq 15\%$  дисахаридов и 30 мМ соли имели наименьшую логистическую функцию потери при 25°C в течение одной недели. Для составов, содержащих  $\geq 15\%$  дисахаридов и соль, добавлением КМЦ натрия помогло снизить остаточную влагу.

Таблица 11: Перечень интервалов эксципиентов составов из таблицы 10

Эксципиенты	Количество (на 0,5 мл дозы)
-------------	-----------------------------

Сахароза	0 мг - 37,5 мг
Фосфат калия (одноосновный, безводный)	~0,26 мг
Фосфат калия (двухосновный, безводный)	~0,63 мг
L-глутаминовая кислота (мононатриевая соль, моногидрат)	0,56 мг
Трегалоза	37,5 мг - 87,5 мг
Карбоксиметилцеллюлоза натрия	2,5 мг
Хлорид натрия	0,88 мг

### ПРИМЕР 9

Составы 1х СФГ (11 мМ фосфата калия, 6 мМ L-глутаминовой кислоты, 0,22М сахарозы) с изменяющимися количествами L-15 (90%, 45% и 25%) и DEN1, DEN2, DEN3 или DEN4. Основным компонентом в L-15 Лейбовица является NaCl (137,39 мМ). Поэтому 90% L-15 равно 123,65 мМ NaCl, 45% L-15 равно 61,83 мМ NaCl и 25% L-15 равно 34,35 мМ NaCl.

Составы заполняют в 2R стеклянные флаконы в количестве 0,5 мл и замораживают при -115°C в течение 15 минут. После замораживания флаконы сушат в микроволновой вакуумной сушилке (МВС). Затем флаконы подвергают тестированию активности с применением анализа относительной инфекционности денге (АОИД).

Составы, быстро высушенные в МВС, были более стабильными, чем составы, высушенные лиофилизацией (см. фигуры 13-16). В указанном выше составе оказалось, что концентрация соли  $\geq 61,83$  мМ NaCl улучшает стабильность DEN4 во время сушки, что не наблюдается для других трех типов (DEN1, DEN2 и DEN3).

### ПРИМЕР 10

Также делают следующие растворы: 500 мг/мл сахарозы, 250 мг/мл трегалозы, 1М хлорида натрия (NaCl) и 10 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия (КМЦ натрия), 100 мг/мл поливинилпирролидона (ПВП), 100 мМ фосфата калия, 500 мг/мл пропиленгликоля и стерильная вода.

Все растворы фильтруют через ПЭС 0,22 мкм фильтры Stericup. Растворы и вирус денге (DEN1) объединяют с получением следующих составов: 11 мМ фосфата калия, 90 мг/мл сахарозы, 5 мг/мл КМЦ натрия, 5 мг/мл ПГ; 11 мМ фосфата калия, 200 мг/мл сахарозы, 50 мг/мл ПВП К12; 11 мМ фосфата калия, 75 мг/мл сахарозы, 175 мг/мл трегалозы, 30 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ.

Составы заполняют в 2R стеклянные флаконы в количестве 0,5 мл и замораживают при -115°C в течение 15 минут. После замораживания флаконы сушат в микроволновой вакуумной сушилке (МВС). Затем флаконы подвергают тестированию активности с применением анализа относительной инфекционности денге (АОИД).

Фигура 17 показывает, что относительная активность флаконов для составов, высушенных в микроволновой вакуумной сушилке, больше или равна тем, которые высушены в лиофилизаторе.

Таблица 12: Перечень интервалов эксципиентов составов из фигуры 17

<b>Экципиенты</b>	<b>Количество (на 0,5 мл дозы)</b>
Сахароза	37,5 мг - 100 мг
Фосфат калия (одноосновный, безводный)	~0,26 мг
Фосфат калия (двухосновный, безводный)	~0,63 мг
Трегалоза	87,5 мг
Карбоксиметилцеллюлоза натрия	2,5 мг
Хлорид натрия	0,88 мг
ПВП К12	25 мг
Пропиленгликоль	2,5 мг

### **ПРИМЕР 11**

Четырехвалентные составы (состав 20) DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4 лиофилизируют и хранят при 37°C в течение одной недели (фигура 18A), 25°C в течение одного месяца (фигура 18B) и 2-8°C в течение 18 месяцев (фигуры 19A-D). Активность анализируют анализом бляшкообразования (как описано ранее в тексте) в каждый момент времени. Контрольный образец, хранящийся при -70°C, тестируют в анализе бляшкообразования в том же прогоне анализа, как и каждый момент времени проверки стабильности. Логистическую функцию потери для каждого момента времени рассчитывают вычитанием логарифмического результата стабильности образца из -70°C контрольного образца. Фигуры 18A-B и 19A-D показывают логистическую функцию потери в течение времени для каждого из серотипов в четырехвалентном составе 20. Столбики ошибки означают две стандартные ошибки среднего логистической функции потери, рассчитанной в каждый момент времени. Состав 20 обеспечивает термическую стабильность для всех четырех серотипов денге в четырехвалентной вакцине при 37°C, 25°C и 2-8°C, что подтверждается минимальной потерей активности, наблюдаемой через 1 неделю, 1 месяц и 18 месяцев, соответственно.

### **ПРИМЕР 12**

#### **Анализ бляшкообразования с высокой пропускной способностью**

Анализ бляшкообразования с высокой пропускной способностью, анализ “микробляшки (мкБ)” является автоматизированным, миниатюризированным анализом бляшкообразования денге, проводимым в 96-луночном микропланшете. Коротко, клетки Vero высевают в планшеты для культивирования тканей с черными стенками и прозрачным дном в БСС OptiPro с 2% L-глутамином в количестве 40000 клеток на лунку. Клетки оставляют соединяться в течение ночи при 37°C, 5% pCO<sub>2</sub>, >90% ОВ. Вирус предварительно разводят в восстановленной сывороточной среде OptiMEM и затем серийно разводят 1:2 в среде в ультранизких планшетах для соединения. Растительную среду удаляют из клеточных планшетов, применяя осторожное отсасывание, и 25 мкл/лунку инокулята переносят из планшета для серийного разведения в клеточный

планшет. Адсорбция вируса проходит в течение 4 часов при 37°C, 5% pCO<sub>2</sub>, >90% ОВ. После инкубирования адсорбции, 175 мкл/лунку двухфазной питательной среды добавляют в каждую лунку для ингибирования вирусной секреции и распространения. В зависимости от серотипа, заражение проходит в течение 2 или 3 дней в указанных выше условиях инкубации.

После инкубации заражения, двухфазную питательную среду убирают, и клетки фиксируют 3,7% формальдегидом в ФСБ. Планшеты пермеабелизируют 0,5% Triton X-100 в ФСБ, затем блокируют 1% АБС в ФСБ. Типоспецифические кроличьи моноклональные антитела, затем анти-кроличьи AlexaFluor488 используют для флуоресцентного окрашивания вирусных бляшек. Планшеты визуализируют с применением Perkin Elmer EnSight, и флуоресцентные бляшки считают с применением алгоритма автоматизированного подсчета. Титр определяют с применением уравнения ниже из лунок, которые содержат импульсы действительного объекта, которые попадают в критерии подсчета (типовозависимые):

$$\text{Вирусный титр} \left( \frac{\text{БОЕ}}{\text{мл}} \right) = \frac{\text{Подсчитанные бляшки}}{\text{Объем инокулята (мл)}} \times \text{общее разведение}$$

Проводят два исследования, в которых четырехвалентные составы DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4 лиофилизируют в составах, описанных в таблице 13 и хранят при 25°C в течение одной недели. Каждый состав содержит 9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu при pH 7,5 и разные количества КМЦ или ПГ. Активность анализируют анализом бляшкообразования с высокой пропускной способностью, описанным выше, в каждый момент времени. Контрольный образец, хранящийся при -70°C, также тестируют в анализе. Логистическую функцию потери для каждого момента времени рассчитывают вычитанием логарифмического результата стабильности образца из -70°C контрольного образца. В таблицах 14а и 14b показаны логистические функции потери в течение времени для каждого из серотипов в различных четырехвалентных составах. Концентрации 0,2%-1% КМЦ или ПГ в различных сочетаниях показывают одинаковую стабильность друг для друга и повышенную стабильность для составов без сочетания.

Таблица 13. Четырехвалентные составы

Полный состав	Изменения состава	Номер состава
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	Без КМЦ или ПГ	140
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,5% КМЦ, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	Только КМЦ	141
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,2% КМЦ, 0,2% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,2% КМЦ, 0,2% ПГ	142

9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,3% КМЦ, 0,3% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,3% КМЦ, 0,3% ПГ	143
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,5% КМЦ, 0,5% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,5% КМЦ, 0,5% ПГ	20
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,8% КМЦ, 0,8% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,8% КМЦ, 0,8% ПГ	144
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,9% КМЦ, 0,9% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,9% КМЦ, 0,9% ПГ	145
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,8% КМЦ, 0,5% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,8% КМЦ, 0,5% ПГ	138
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,5% КМЦ, 0,8% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,5% КМЦ, 0,8% ПГ	139
9% сахарозы, 11 мМ фосфата калия, 0,3% КМЦ, 0,5% пропиленгликоля, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,3% КМЦ, 0,5% ПГ	123

Таблица 14а. Действие концентрации КМЦ и ПГ на стабильности при 25°С.

Состав	Номер состава	DENV1 лог. потери, 1 неделя, 25°С	DENV2 лог. потери, 1 неделя, 25°С	DENV3 лог. потери, 1 неделя, 25°С	DENV4 лог. потери, 1 неделя, 25°С
Без КМЦ или ПГ	140	0,41	0,38	0,42	0,43
Только КМЦ	141	0,47	0,40	0,52	0,31
0,2% КМЦ, 0,2% ПГ	143	0,23	0,20	0,27	0,10
0,3% КМЦ, 0,3% ПГ	20	0,27	0,18	0,15	0,04
0,5% КМЦ, 0,5% ПГ	144	0,18	0,16	0,23	0,04
0,8% КМЦ, 0,8% ПГ	145	0,22	0,17	0,09	0,22
0,9% КМЦ, 0,9% ПГ	138	0,16	0,12	0,03	0,16
0,8% КМЦ, 0,5% ПГ	139	0,15	0,07	0,21	-0,01
0,5% КМЦ, 0,8% ПГ	123	0,20	0,12	0,18	0,04

0,3% КМЦ, 0,5% ПГ	143	0,22	-,13	0,10	0,08
----------------------	-----	------	------	------	------

Таблица 14b. Действие концентрации КМЦ и ПГ на стабильность при 25°C.

Состав	Номер состава	DENV1 лог. потери, 1 неделя, 25°C	DENV2 лог. потери, 1 неделя, 25°C	DENV3 лог. потери, 1 неделя, 25°C	DENV4 лог. потери, 1 неделя, 25°C
0,5% КМЦ, 0,5% ПГ	20	0,19	0,30	0,15	0,06
0,2% КМЦ, 0,5% ПГ	122	0,20	0,15	0,21	0,07
0,3% КМЦ, 0,5% ПГ	123	0,26	0,12	0,16	0,02
0,4% КМЦ, 0,5% ПГ	124	0,26	0,33	0,33	0,10
0,1% КМЦ, 0,5% ПГ	125	0,27	0,33	0,22	0,16
0,5% КМЦ, 0,2% ПГ	126	0,23	0,20	0,30	0,11
0,5% КМЦ, 0,3% ПГ	127	0,31	0,28	0,22	0,14
0,5% КМЦ, 0,7% ПГ	128	0,24	0,20	0,15	0,14
0,5% КМЦ, 0,1% ПГ	129	0,23	0,1	0,16	0,19

Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в качестве ссылки с целью описания и раскрытия методологий и материалов, которые могут быть использованы в связи с настоящим изобретением.

Описав здесь различные варианты изобретения со ссылкой на прилагаемые чертежи, следует понимать, что изобретение не ограничено этими точными вариантами, и что в него могут быть внесены различные изменения и модификации специалистом в данной области техники без отступления от объема или сущности изобретения, определенных в прилагаемой формуле изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав, содержащий живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус (ЖАХВ), буфер при pH приблизительно 6,5-8,5, сахар, гликоль или сахарный спирт и производное целлюлозы, выбранное из группы, состоящей из карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), 2-гидроксиэтилцеллюлозы (2-ГЭЦ), кроскармеллозы и метилцеллюлозы или их фармацевтически приемлемой соли, необязательно, щелочной или щелочноземельной соли и, необязательно, аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их комбинации.

2. Состав по п.1, где буфер выбран из группы, состоящей из сукцината, гистидина, фосфата, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, ацетата и цитрата, или их комбинации.

3. Состав по п.1 или 2, где щелочной или щелочноземельной солью является хлорид магния, хлорид кальция, хлорид калия, хлорид натрия или их комбинация.

4. Состав по любому из пп. 1-3, где сахаром является трегалоза или сахароза.

5. Состав по любому из пп. 1-4, где производным целлюлозы является фармацевтически приемлемая соль карбоксиметилцеллюлозы.

6. Состав по любому из пп. 1-5, где гликоль выбран из группы, состоящей из пропиленгликоля, полипропиленгликоля, этиленгликоля, полиэтиленгликоля и монометиловых эфиров полиэтиленгликоля.

7. Состав по любому из пп. 1-5, где гликолем или сахарным спиртом является пропиленгликоль или глицерин.

8. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖОВ) или по меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 100-10000000 БОЕ/мл, буфер при pH приблизительно 6,5-8,5, приблизительно 50-300 мг/мл сахара, приблизительно 2,5-10,0 мг/мл пропиленгликоля (ПГ) или глицерина, и приблизительно 0,3-10 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия (КМЦ натрия), необязательно приблизительно 10-150 mM NaCl и, необязательно, приблизительно 10-100 mM аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их комбинации.

9. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцин денге в количестве приблизительно 100-100000 БОЕ/мл, приблизительно 5-300 mM гистидина, TRIS, Bis-Tris или фосфатный буфер, или их комбинацию при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 50-300 мг/мл сахара, приблизительно 3-10 мг/мл пропиленгликоля или глицерина, и приблизительно 3-10 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия, необязательно приблизительно 15-75 mM NaCl, и, необязательно, приблизительно 10-75 mM аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro или Glu, или их комбинации.

10. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-300 мМ буфера на основе фосфата калия при рН приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 60-120 мг/мл сахарозы или трегалозы или их сочетания, приблизительно 3-7 мг/мл пропиленгликоля или глицерина и приблизительно 3-7 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, и приблизительно 30-90 мМ NaCl и, необязательно, приблизительно 10-75 мМ аминокислоты Leu, Lys или Glu, или их комбинации.

11. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при рН приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля или глицерина, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, и приблизительно 75 мМ NaCl.

12. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при рН приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, приблизительно 50 мМ NaCl, и приблизительно 25 мМ Leu.

13. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при рН приблизительно 7,5, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, и приблизительно 30 мМ NaCl.

14. Состав по любому из пп. 9-13, дополнительно содержащий 90-200 мг/мл трегалозы.

15. Состав по п.1, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 11 мМ буфера на основе фосфата калия при рН приблизительно 7,5-8, приблизительно 90 мг/мл сахарозы, приблизительно 110 мг/мл трегалозы, приблизительно 5 мг/мл пропиленгликоля, приблизительно 5 мг/мл карбоксиметилцеллюлозы натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000, приблизительно 50 мМ NaCl, и приблизительно 25 мМ Leu.

16. Состав по любому из пп. 1-15, где состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, выбранное из полоксамера 188 и полоксамера 407 в количестве приблизительно 0,0001-5% масс./об.

17. Состав, который содержит живую аттенуированную вакцину денге, содержащую по меньшей мере один живой аттенуированный вирус денге (ЖАВ) или по

меньшей мере один живой аттенуированный химерный флавивирус в количестве приблизительно 20-200000,00 БОЕ/мл, буфер при pH приблизительно 6,5-8,5, сахар в количестве приблизительно 150-300 мг/мл, носитель, выбранный из группы, состоящей из поливинилпирролидона (ПВП), карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ), 2-гидроксиэтилцеллюлозы (2-ГЭЦ), кроскармеллозы, метилцеллюлозы или их фармацевтически приемлемой соли, человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и желатина; необязательно, щелочной соли или щелочноземельной соли в количестве приблизительно 5-100 мМ; и, необязательно, аминокислоту Gln, Pro или Glu, или их комбинацию.

18. Состав по п.17, где буфер выбран из группы, состоящей из сукцината, гистидина, фосфата, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, НЕПЭС, ацетата и цитрата, или их комбинации.

19. Состав по п.17, где щелочной или щелочноземельной солью является хлорид магния, хлорид кальция, хлорид калия, хлорид натрия или их комбинация.

20. Состав по любому из пп. 17-19, где сахаром является трегалоза или сахароза, или их комбинация.

21. Состав по п.20, где отношение сахарозы к трегалозе составляет 1:1-1:4.

22. Состав по любому из пп. 17-21, где носителем является карбоксиметилцеллюлоза натрия, ГПМЦ, ЧСА или желатин.

23. Состав по п.17, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 100-10000000 БОЕ/мл, буфер при pH приблизительно 6,5-8,0, приблизительно 150-300 мг/мл сахара в виде сочетания сахарозы и трегалозы, приблизительно 0,3-40 мг/мл КМЦ натрия, ЧСА, ГПМЦ или желатин, необязательно, приблизительно 10-100 мМ щелочной или щелочноземельной соли и, необязательно, приблизительно 5-25 мМ глутаминовой кислоты.

24. Состав по п.17, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 100-100000 БОЕ/мл, приблизительно 5-300 мМ гистидина, TRIS или фосфатный буфер, или их комбинацию при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 50-100 мг/мл сахарозы, приблизительно 90-200 мг/мл трегалозы, приблизительно 0,3-10 мг/мл КМЦ натрия или приблизительно 10-40 мг/мл желатина и приблизительно 30-90 мМ щелочной или щелочноземельной соли.

25. Состав по п.17, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-20 мМ фосфата калия при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 75 мг/мл сахарозы, приблизительно 175 мг/мл трегалозы, приблизительно 5 мг/мл КМЦ натрия со средней молекулярной массой приблизительно 90000 и приблизительно 30 мМ NaCl.

26. Состав по п.17, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-20 мМ фосфата калия при pH приблизительно 7,0-8,0, приблизительно 75 мг/мл сахарозы, приблизительно 175 мг/мл трегалозы, приблизительно 25 мг/мл желатина и приблизительно 30 мМ NaCl.

27. Состав по п.17, который содержит живую аттенуированную вакцину денге в количестве приблизительно 600-20000 БОЕ/мл, приблизительно 5-20 мМ фосфата калия при рН приблизительно 7-8, приблизительно 250 мг/мл сахарозы и приблизительно 50 мг/мл ПВП К12.

28. Состав по любому из пп. 17-27, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество, выбранное из полоксамера 188 и полоксамера 407 в количестве приблизительно 0,0001-5% масс./об.

29. Состав по любому из пп. 1-28, который дополнительно содержит алюминиевый адъювант.

30. Состав по любому из пп. 1-7, который заморожен или лиофилизирован.

31. Состав по любому из пп. 8-29, который восстановлен в растворе.

32. Состав по любому из пп. 8-29, который является водным раствором до лиофилизации или микроволновой вакуумной сушки.

33. Состав по п.31, где восстановление проводят с использованием приблизительно 0,5-1,0 мл физиологического раствора, воды или бактериостатической воды для инъекций (БВДИ) и, необязательно, разбавителя, содержащего алюминиевый адъювант.

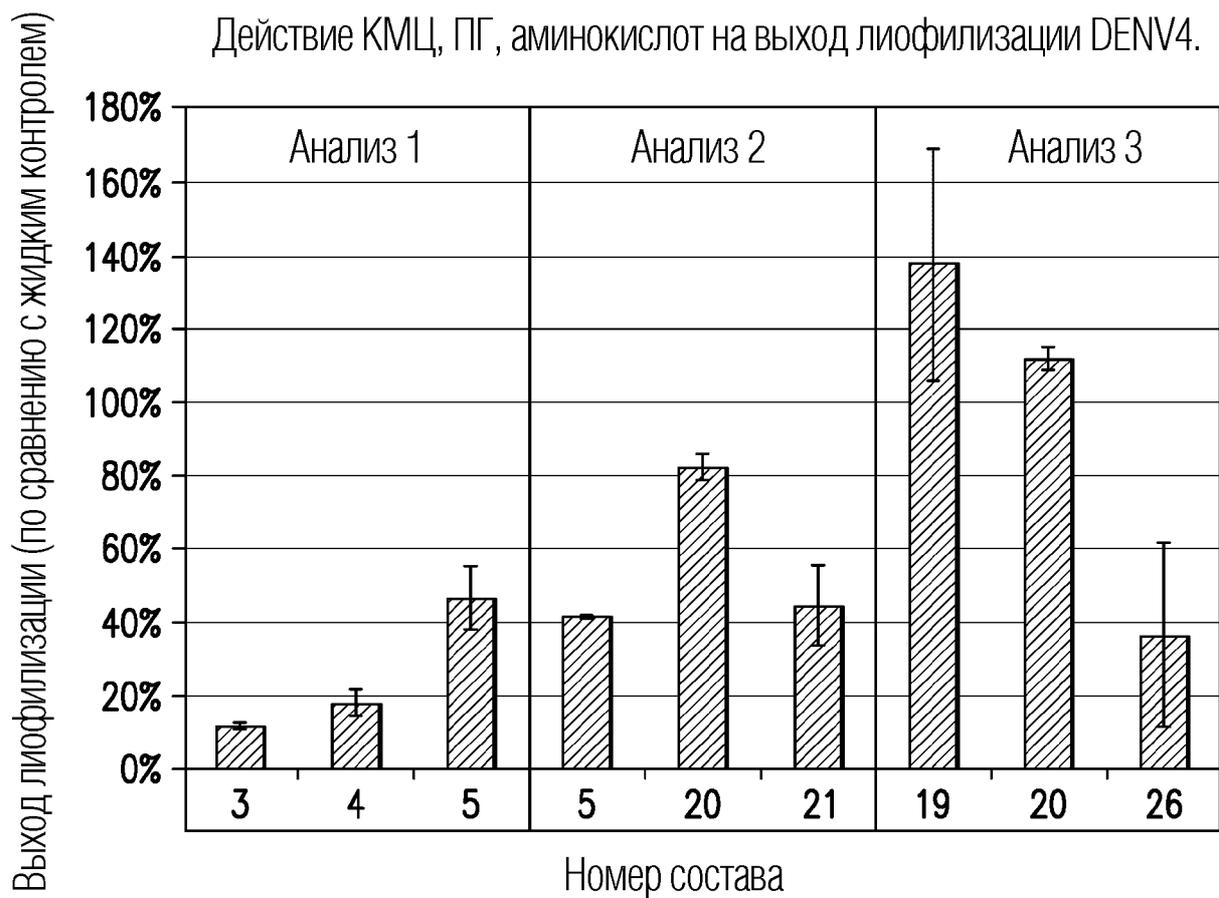
34. Состав по любому из пп. 1-33, где живая аттенуированная вакцина денге является четырехвалентной.

35. Состав по любому из пп. 1-34, где ЖАВ или ЖАХВ содержит вирусный геном, который содержит делецию приблизительно 30 нуклеотидов, соответствующую TL-2 структуре петля на стебле 3' нетранслированной (НТР) области.

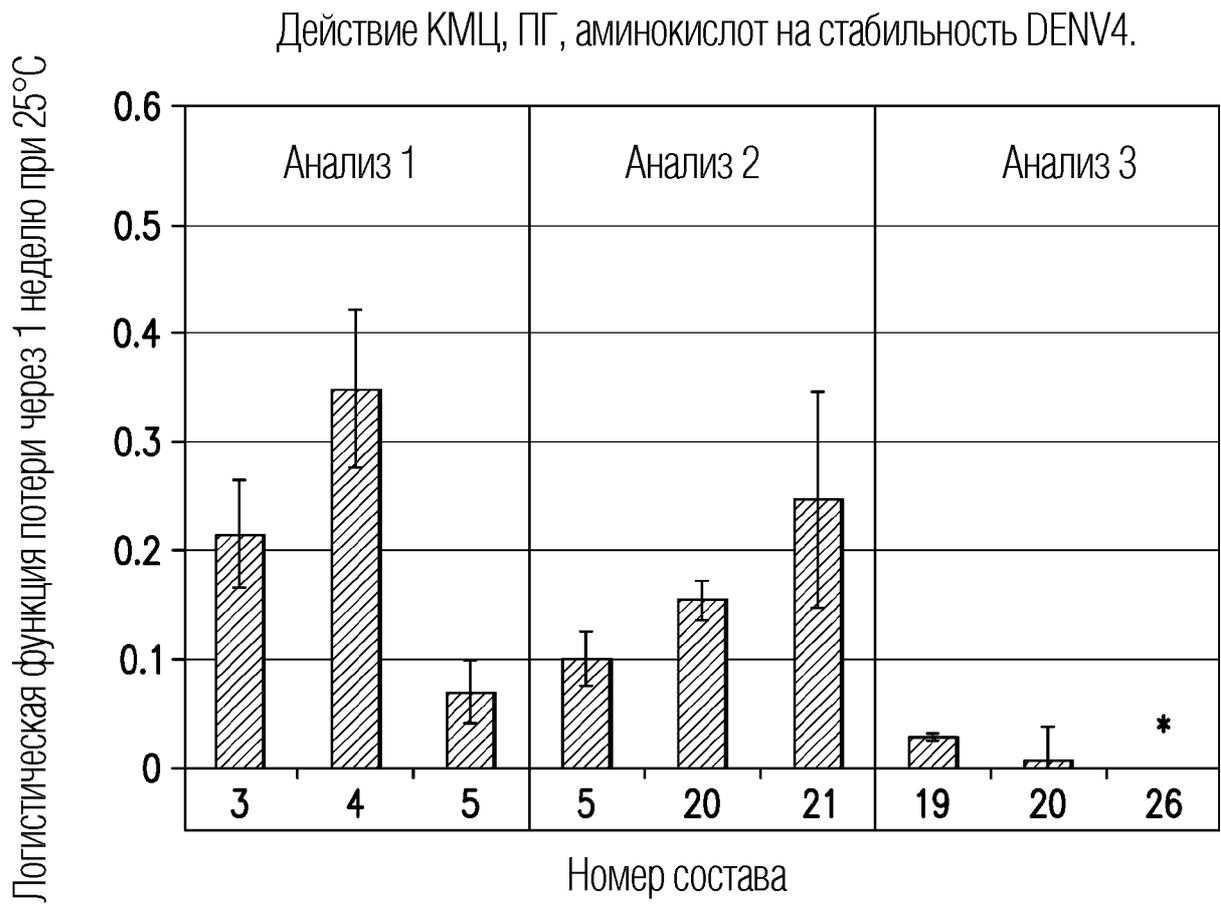
36. Состав по любому из пп. 1-34, где живой аттенуированный вирус денге (ЖАВ) содержит вирусный геном, который содержит делецию приблизительно 30 нуклеотидов, соответствующую TL-2 структуре петля на стебле 3' нетранслированной (НТР) области, и является иммуногенным против серотипа 3 денге, где вирусный геном ЖАВ дополнительно содержит делецию против хода транскрипции от Δ30 делеции, соответствующей TL-3 структуре 3'НТР.

37. Состав по любому из пп. 1-33, где живой аттенуированный вирус денге (ЖАВ) содержит rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30/31 и rDEN4Δ30.

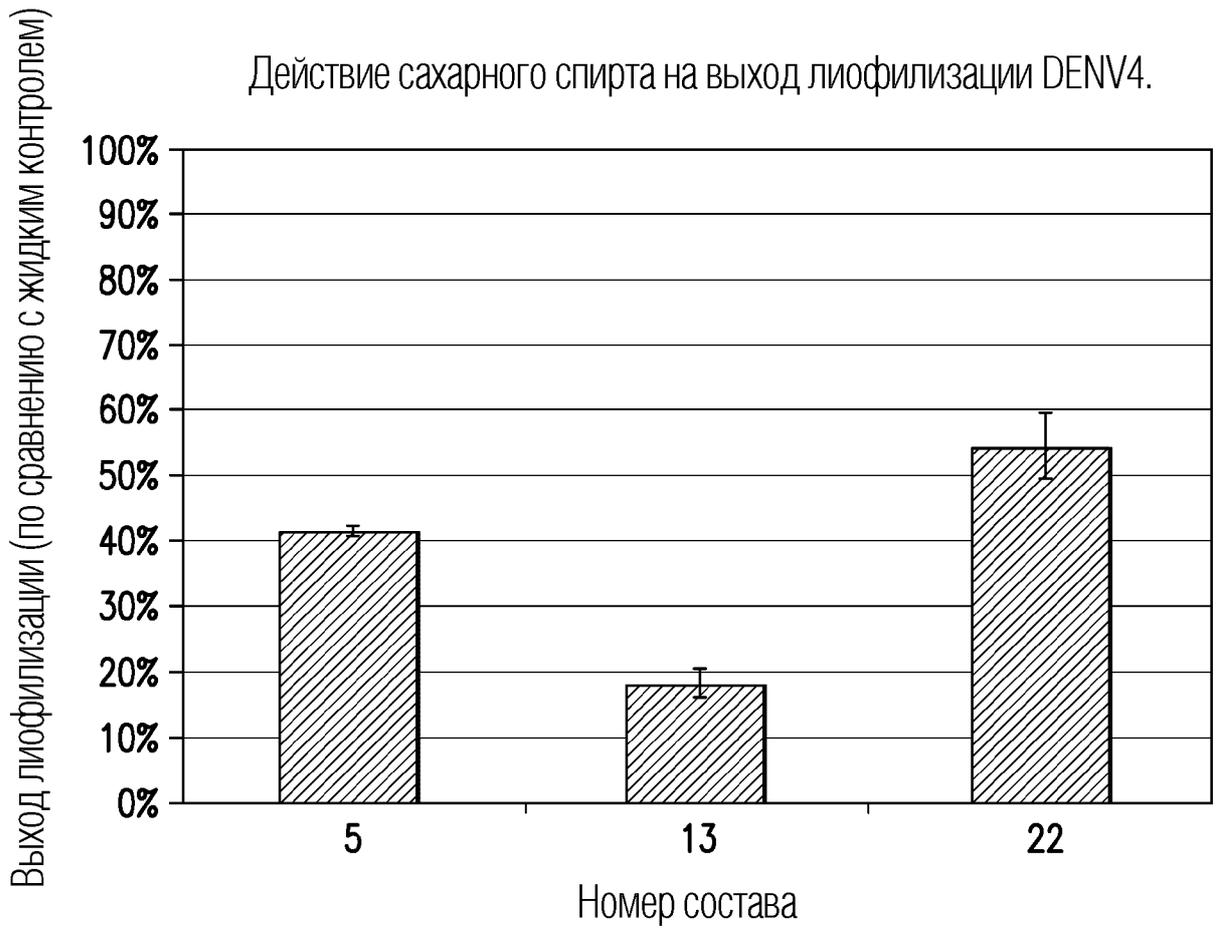
38. Состав по любому из пп. 1-33, где живой аттенуированный вирус денге (ЖАВ) содержит rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30 (ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164 и rDEN4Δ30-7132,7163,8308.



ФИГ. 1



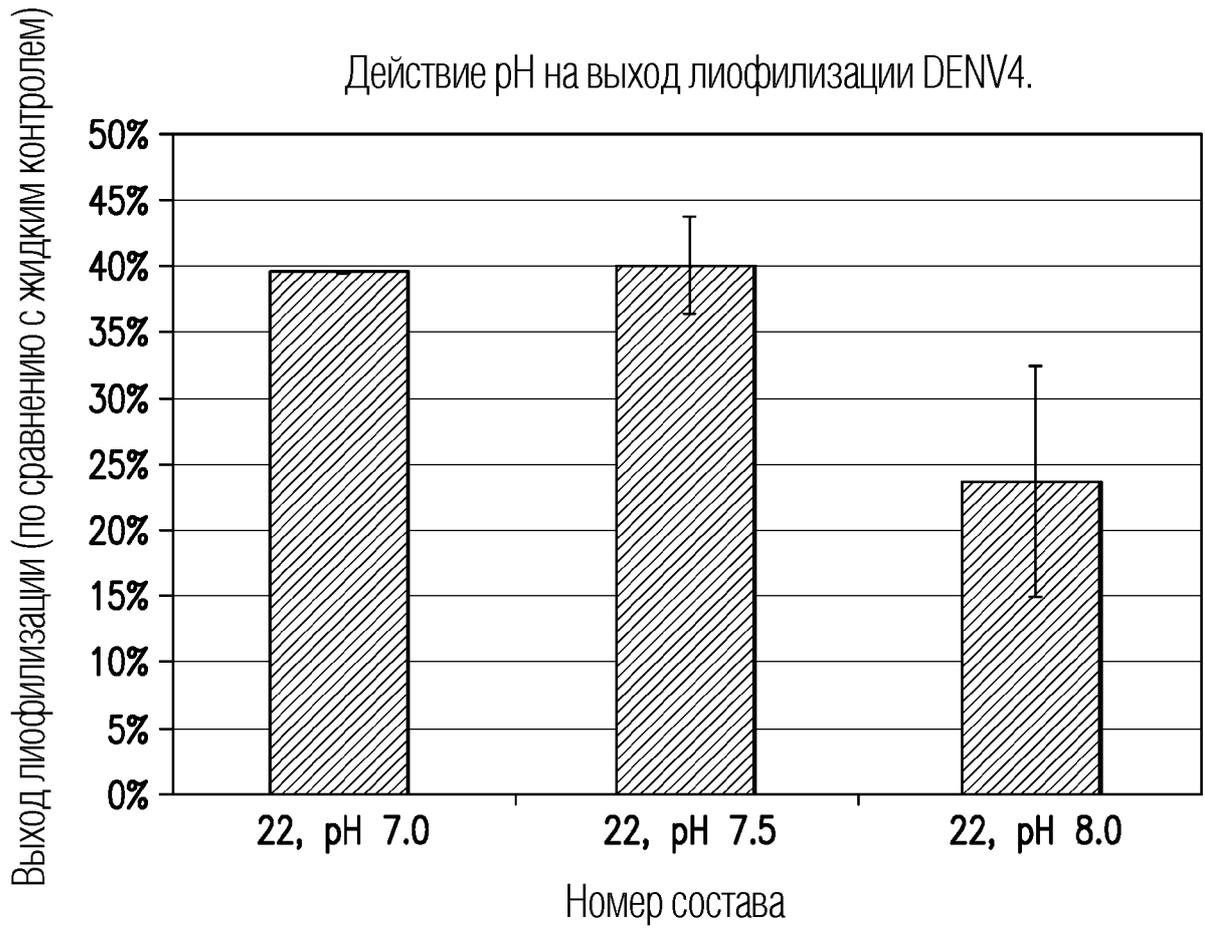
ФИГ. 2



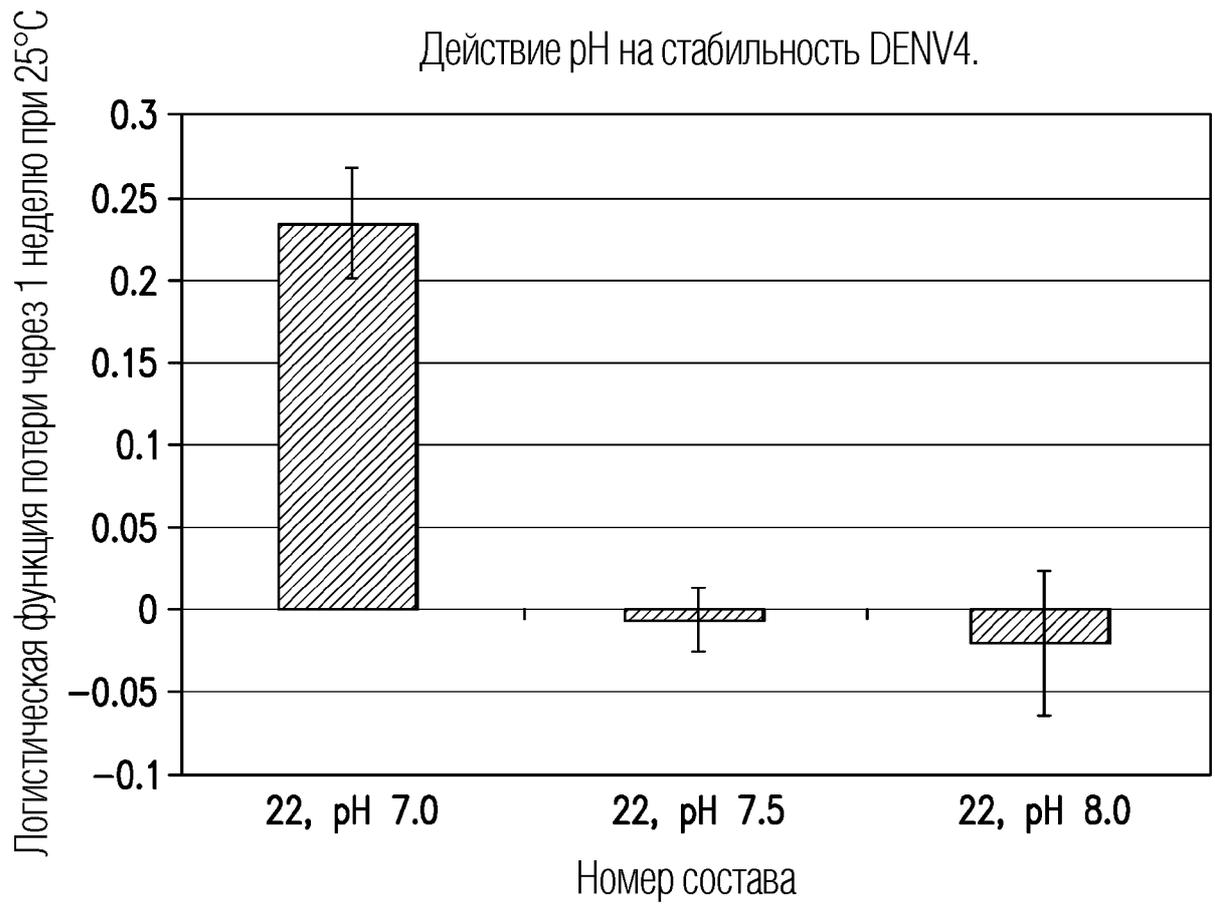
ФИГ. 3



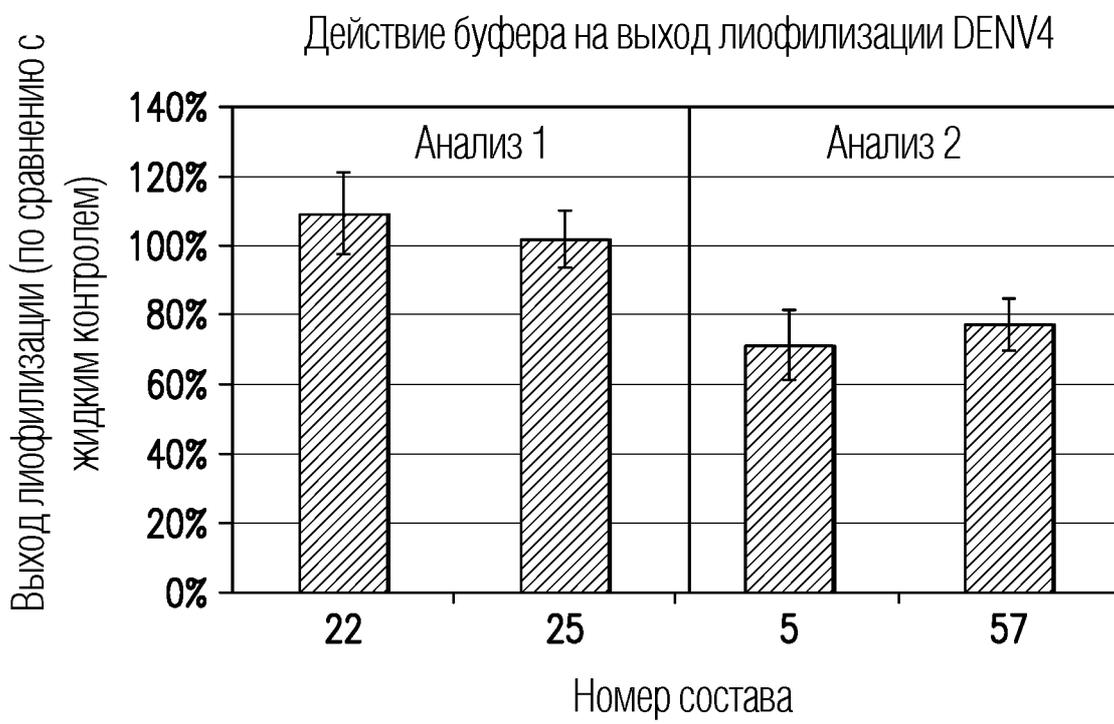
ФИГ. 4



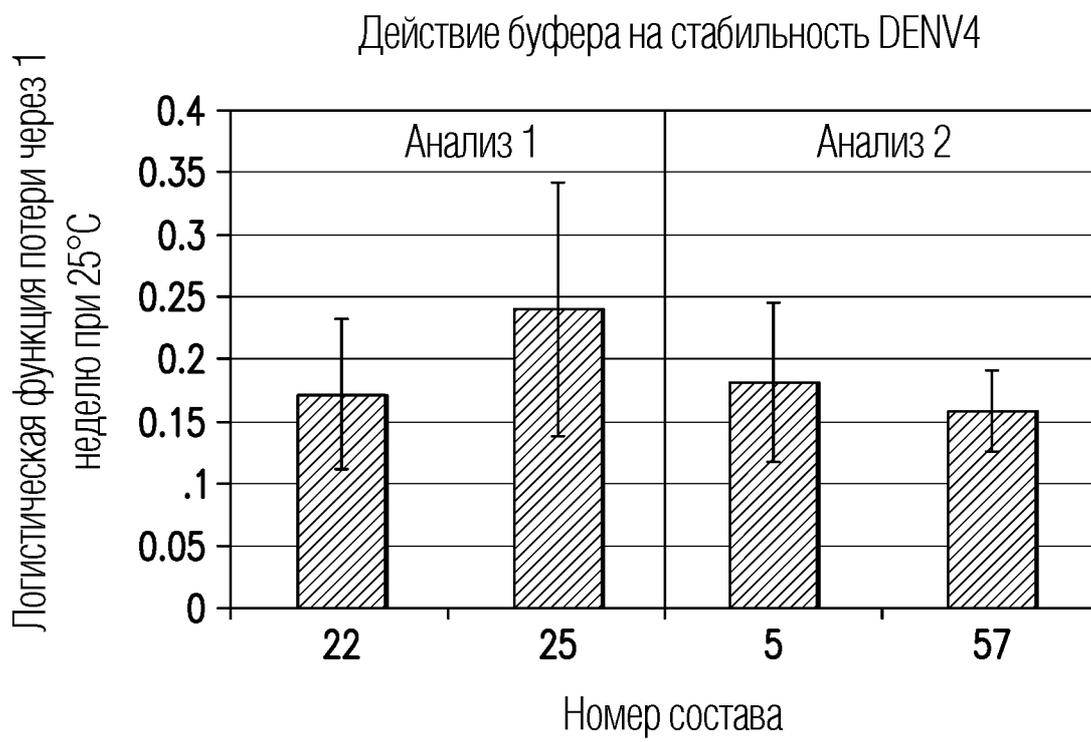
ФИГ. 5



ФИГ. 6



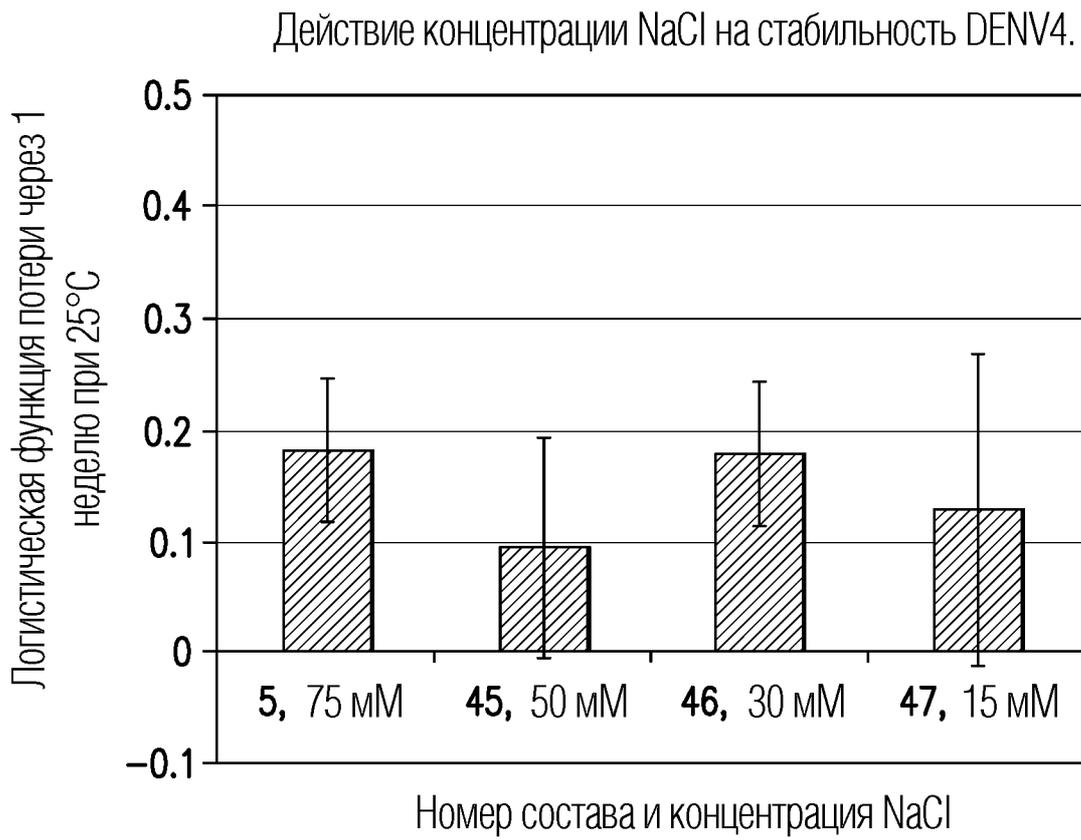
ФИГ. 7



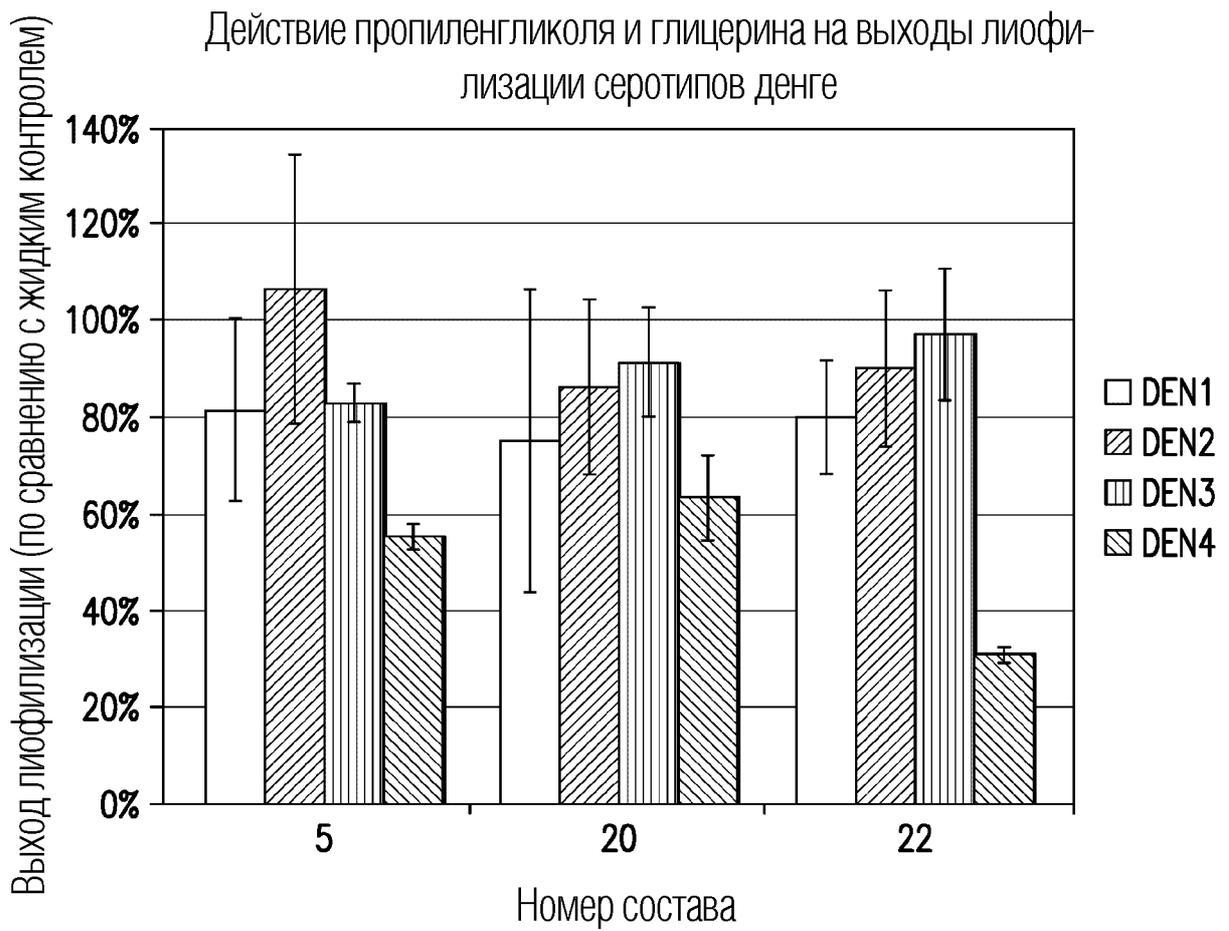
ФИГ. 8



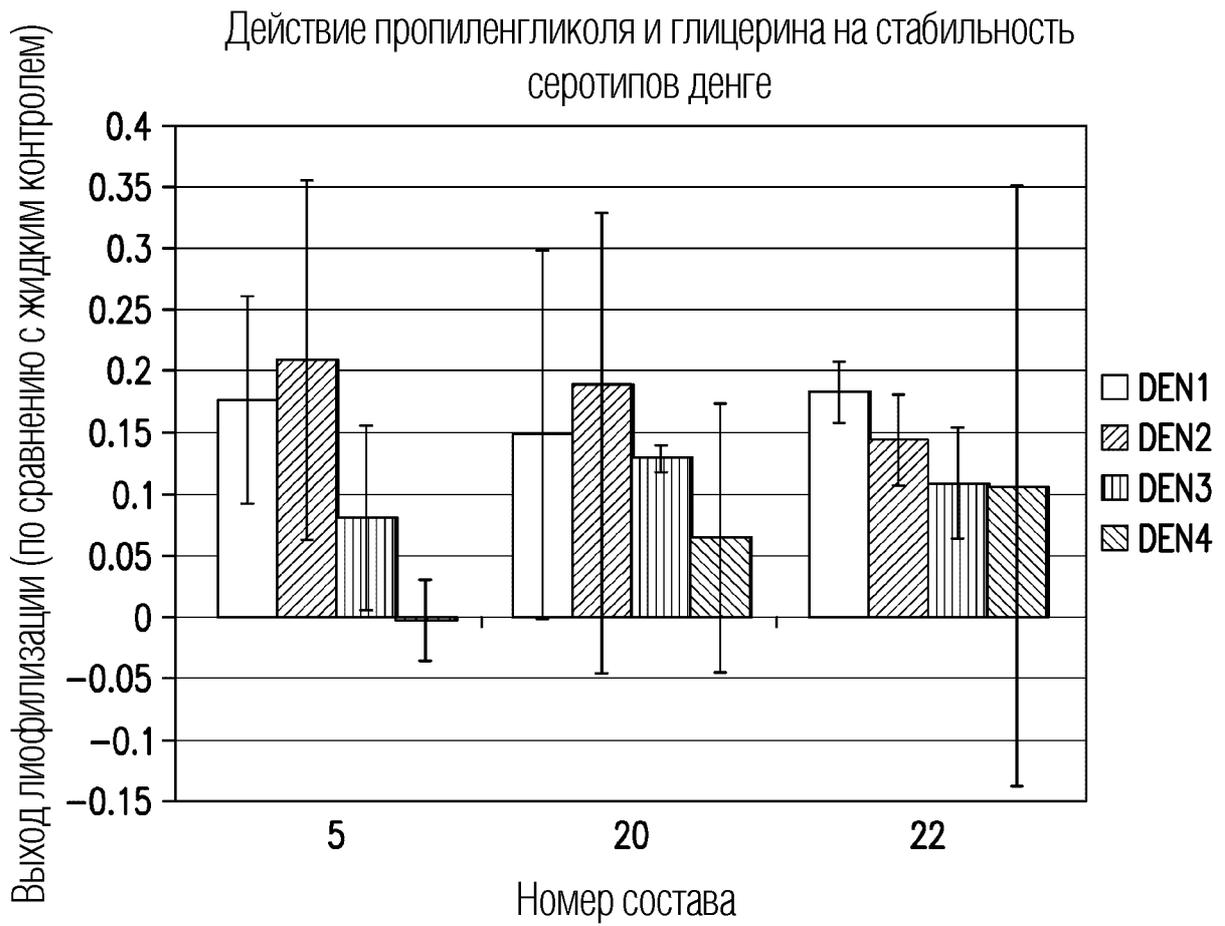
ФИГ. 9



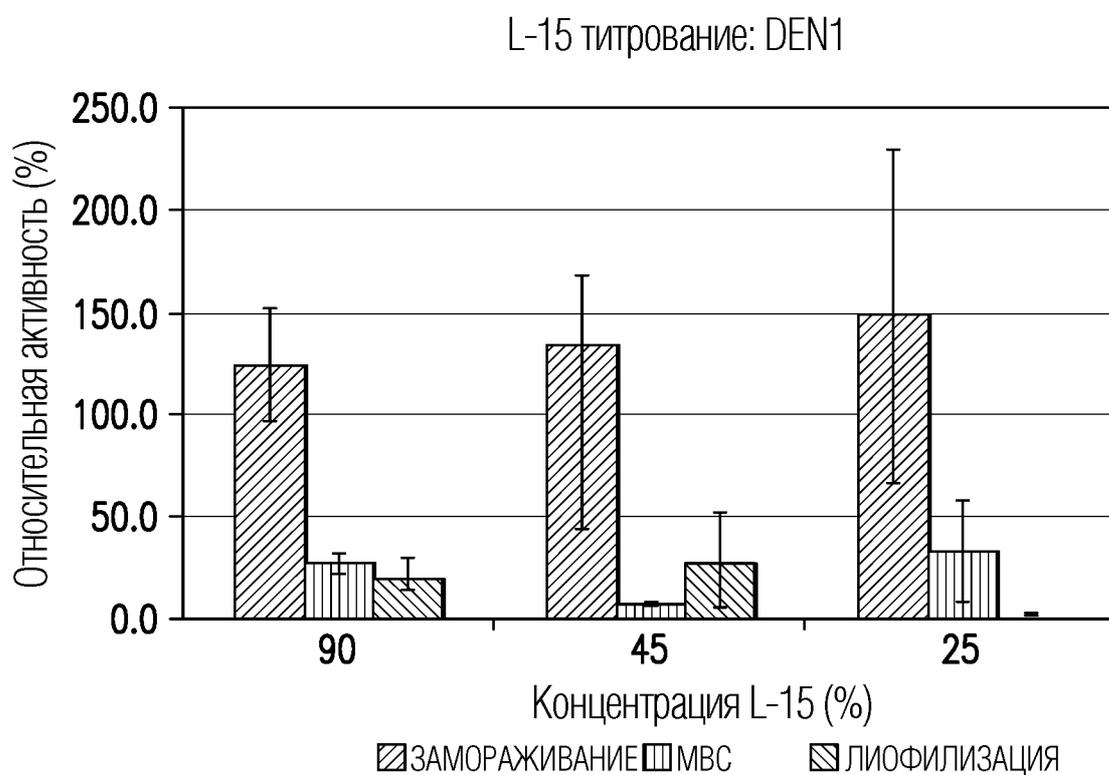
ФИГ. 10



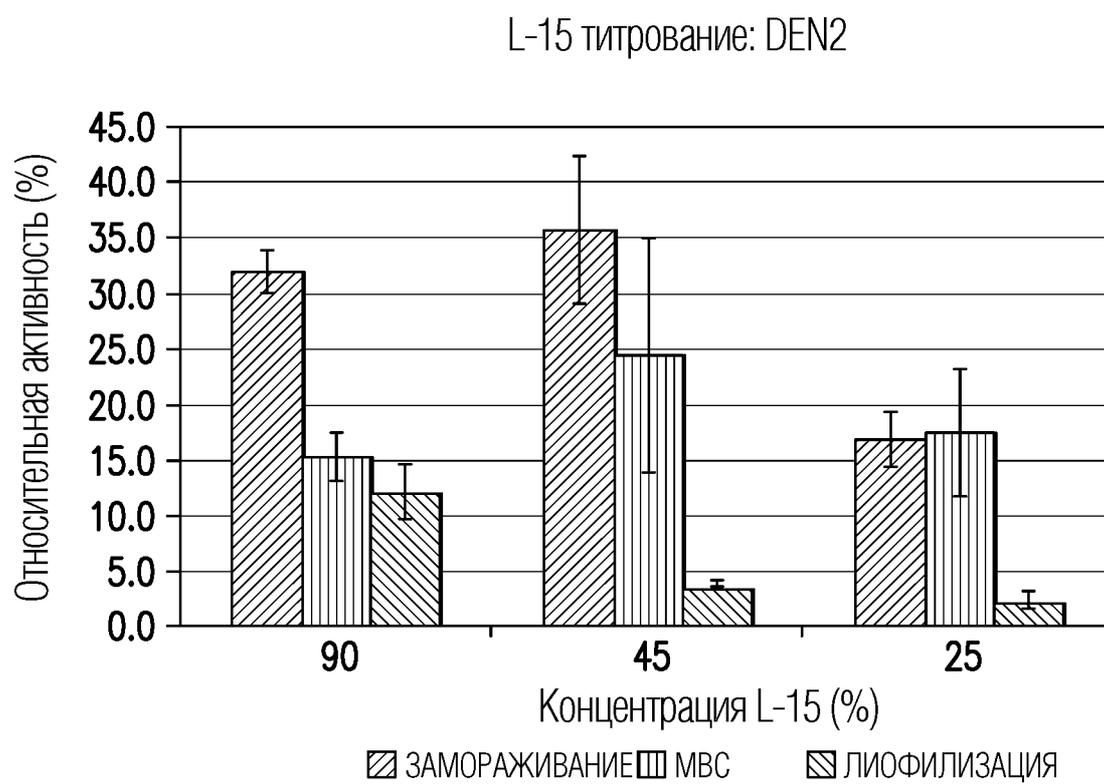
ФИГ. 11



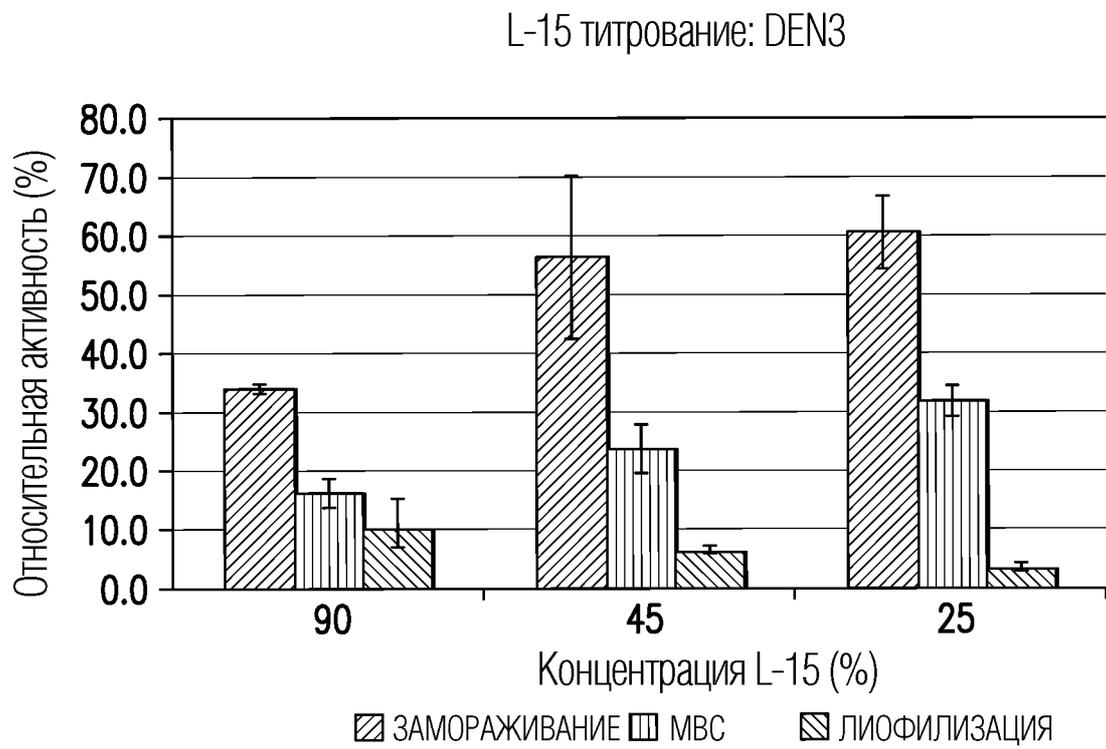
ФИГ. 12



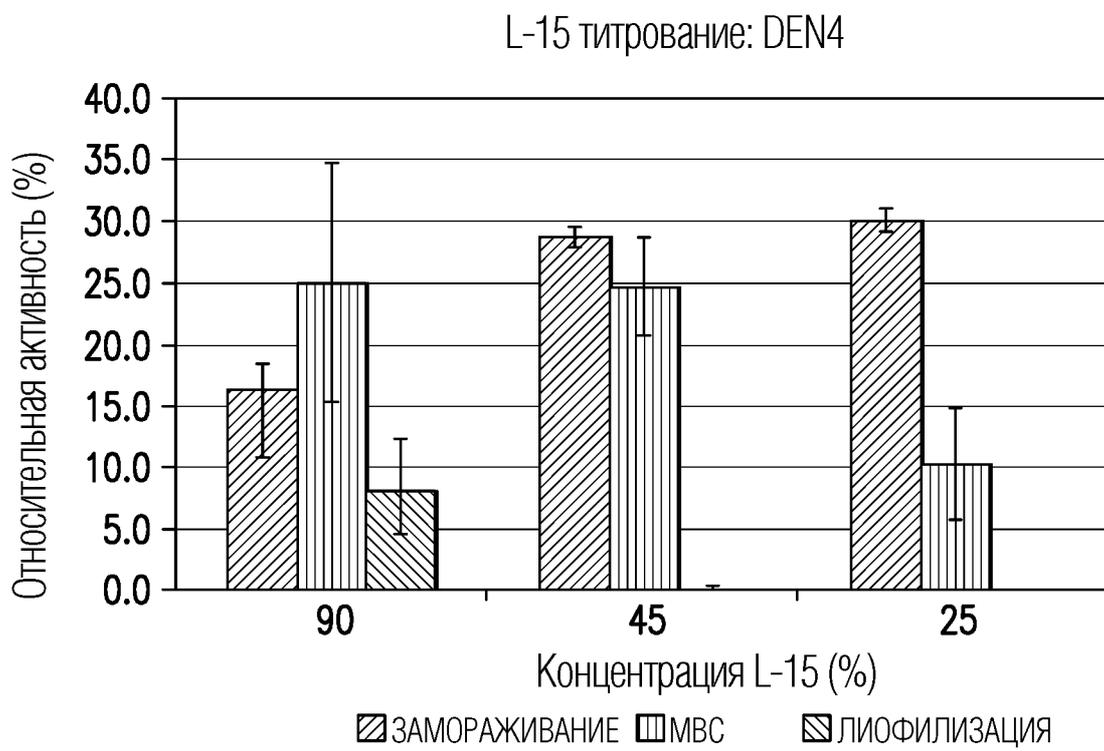
ФИГ. 13



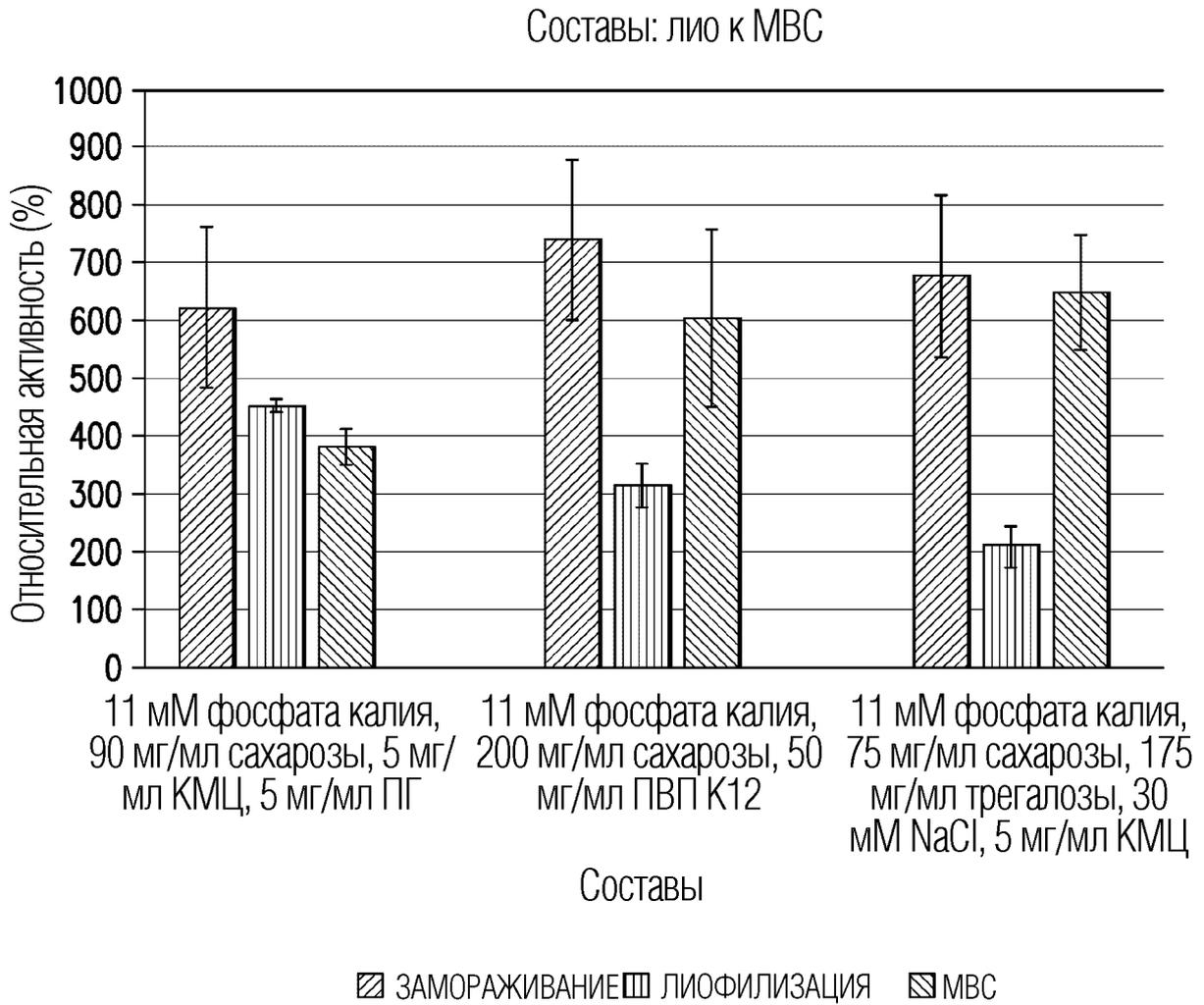
ФИГ. 14



ФИГ. 15



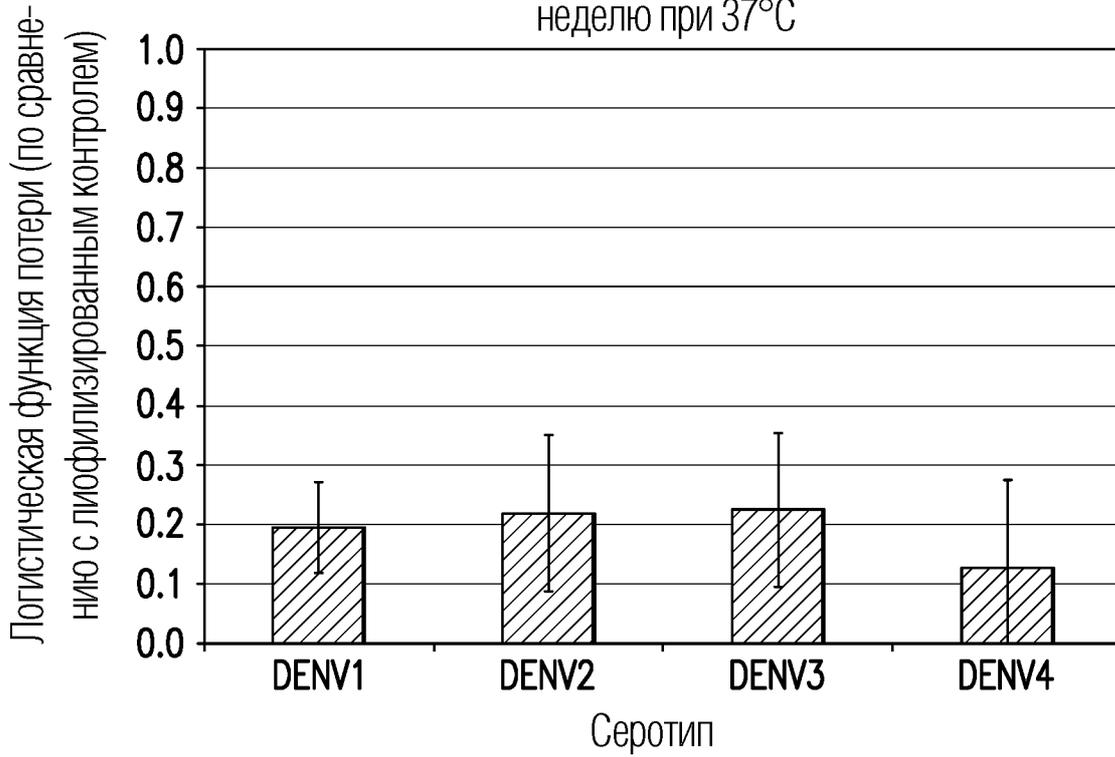
ФИГ. 16



ФИГ. 17

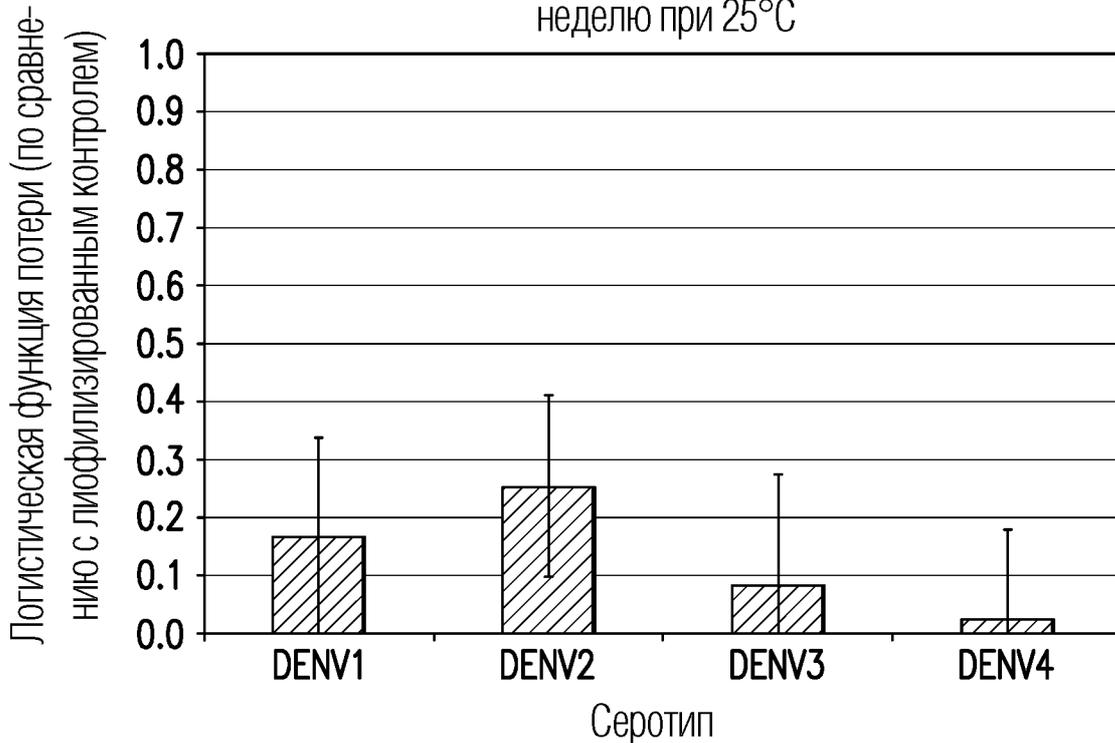
18/20

Четырехвалентная логистическая функция потери через 1 неделю при 37°C

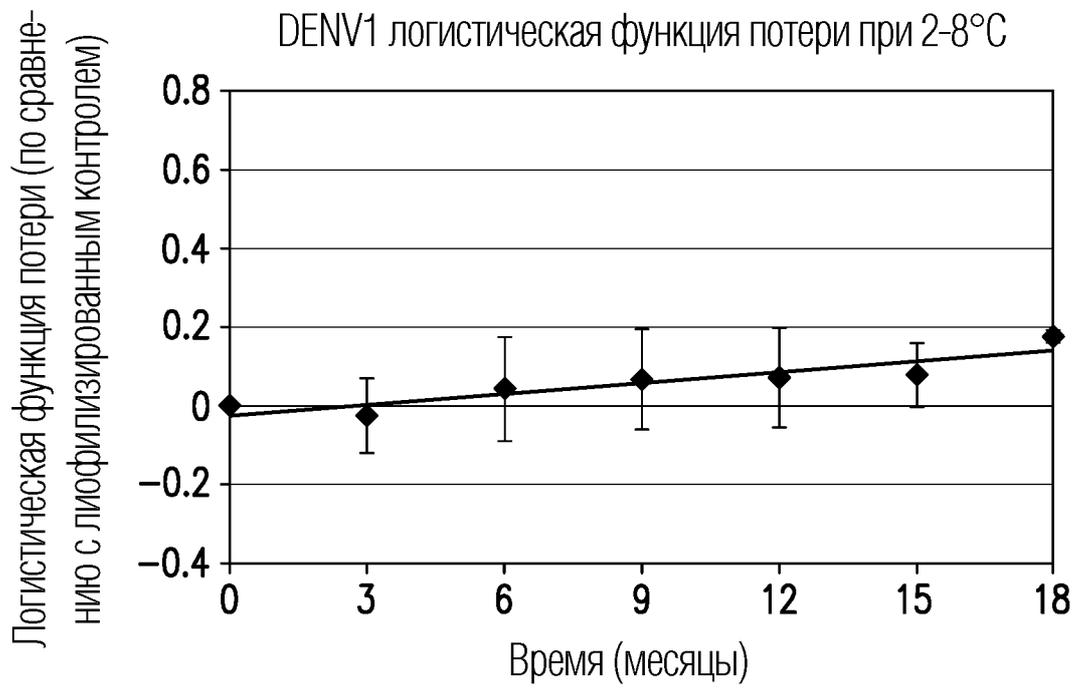


ФИГ. 18А

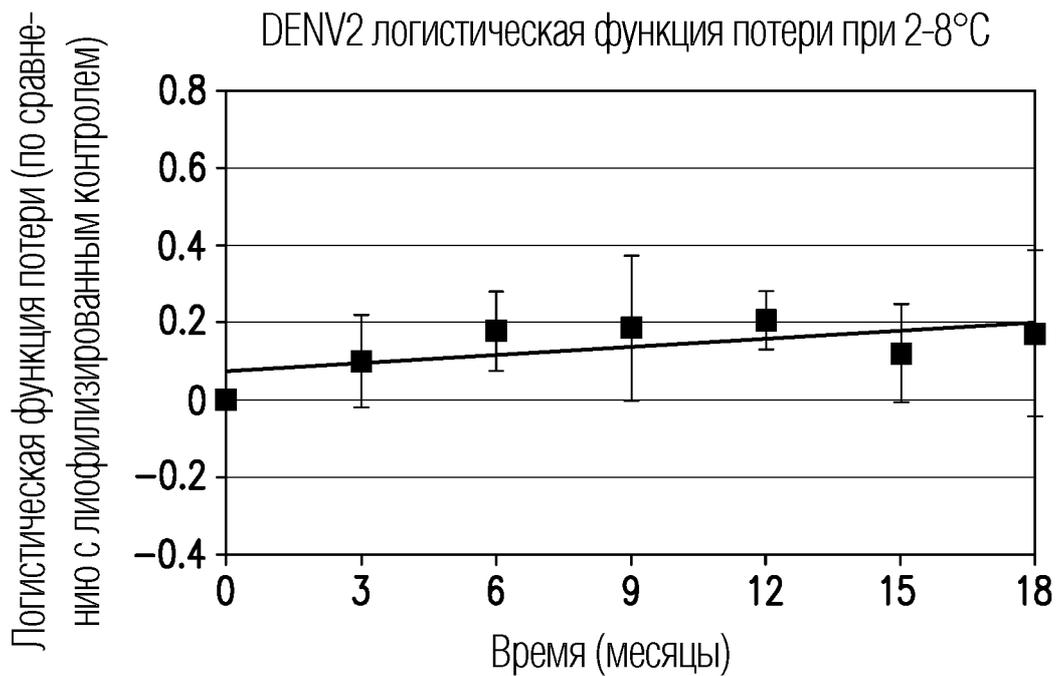
Четырехвалентная логистическая функция потери через 1 неделю при 25°C



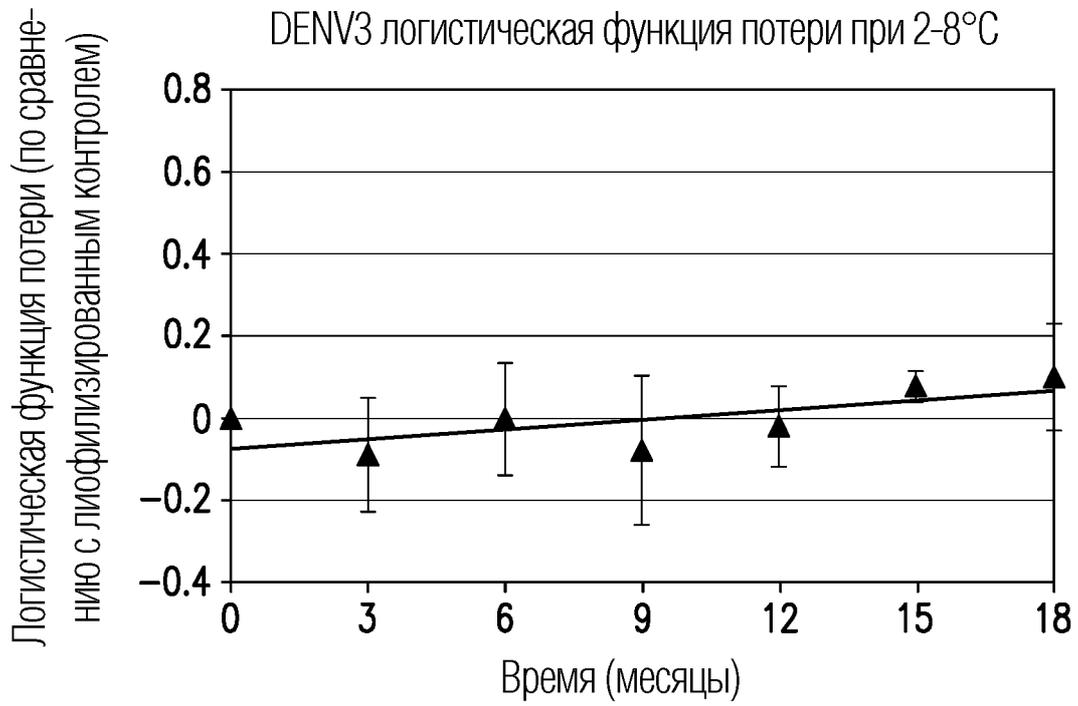
ФИГ. 18В



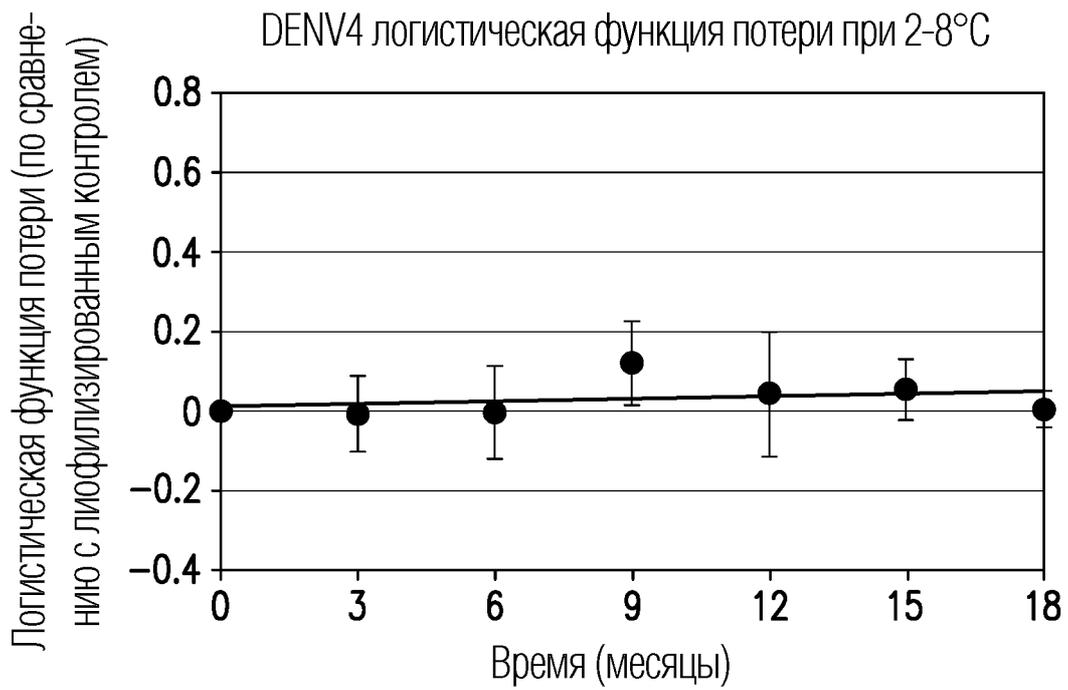
ФИГ. 19А



ФИГ. 19В



ФИГ. 19С



ФИГ. 19D