

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191935** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.06

(22) Дата подачи заявки
2020.02.07

(51) Int. Cl. *A61P 31/16* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ЖИВОЙ АТТЕНУИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 201921006071

(32) 2019.02.15

(33) IN

(86) PCT/IN2020/050121

(87) WO 2020/165912 2020.08.20

(71) Заявитель:
**СЕРУМ ИНСТИТУТ ОФ ИНДИЯ
ПВТ ЛТД. (IN)**

(72) Изобретатель:

**Дхере Раджив Мхаласакант,
Йеолекар Лина Равиндра, Гангули
Милан Шоменатх, Тяги Парикшит
Дхарампал, Сагар Умеш Горах,
Нарале Свапнил Прабхакар, Анаспур
Яшодхан Дилип, Тупе Шам Рамдас
(IN)**

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам производства и получения композиции живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV), которая может быть доставлена интраназально для обеспечения защиты от инфекции вирусом гриппа. Указанные штаммы LAIV основаны на адаптированных к холоду, чувствительных к температуре и ослабленных фенотипах основных донорных вирусов (MDV), содержащих гены поверхностных гликопротеинов пандемических или сезонных штаммов гриппа дикого типа. Кроме того, указанные штаммы LAIV дополнительно адаптированы для роста в клетках MDCK (клетки Мадин-Дарби почки собаки). При крупномасштабном производстве вакцин использование яиц не предусматривается. Процесс очистки лишен этапов хроматографии. Указанная композиция LAIV включает в себя один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа и не содержит полимеров и поверхностно-активных веществ.

A1

202191935

202191935

A1

КОМПОЗИЦИЯ ЖИВОЙ АТТЕНУИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА И СПОСОБ ЕЁ ПОЛУЧЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области производства вирусной вакцины, более конкретно, оно относится к композиции живой аттенуированной вакцины против гриппа и способу её получения. Настоящее изобретение относится к способу получения вирусов или вирусных антигенов, продуцируемых культурой клеток, к вирусам или вирусным антигенам, получаемым этим способом, и к вакцинам, которые содержат такие вирусы или вирусные антигены.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Приведенная ниже справочная информация относится к настоящему изобретению, но не обязательно к предшествующему уровню техники.

Эпидемии и пандемии, вызванные инфекционными агентами, происходят на протяжении веков, вызывая серьезные нарушения, с различной заболеваемостью и смертностью. Вирус гриппа был одним из основных вирусов в истории пандемий. В прошлом веке произошло четыре пандемии гриппа, и до настоящего времени было зарегистрировано, по меньшей мере, 15 пандемий гриппа, при этом только в 1918-1919 годах предполагаемая смертность составила 50 миллионов человек.

Вакцины играют важную роль в борьбе с распространением вируса, и инактивированная вакцина против гриппа (IIV), а также живые аттенуированные вакцины против гриппа (LAIV) используются в течение многих лет. Широко используемые парентерально вводимые инактивированные вакцины против гриппа индуцируют реакции сывороточных антител, эффективно предотвращая заболевание гриппом, когда циркулирующие штаммы антигенно совпадают с вакциной. Напротив, живые аттенуированные вакцины против гриппа (LAIV) вводят интраназально, имитируя естественную инфекцию, вызывая как местные, так и системные гуморальные и клеточные иммунные ответы, обеспечивая защиту как от совпадающих, так и от меняющихся штаммов. Кроме того, безыгольное применение LAIV может снизить порог приемлемости и тем самым увеличить охват вакцинацией против гриппа.

На сегодняшний день LAIV разрешены к применению в США (с 2003 года), Европе (с 2010 года), России (с 1980-х годов) и Индии (с 2010 года). LAIV основаны на аттенуированных основных донорных вирусах (MDV) гриппа А и В, полученных независимо, но, по существу, одинаковым образом в США и России в 1960-х годах. Сезонные и пандемические вирусы LAIV фирмы MedImmune в настоящее время производятся с помощью обратной генетики (RG). Напротив, российские LAIV производятся путем классической генетической реассортации в развивающихся куриных

эмбрионах. Российская LAIV недавно была зарегистрирована для применения в Китае и Таиланде.

Российская LAIV состоит из псевдовироионов, которые содержат гемагглютинин (HA) и в большинстве случаев сегменты гена нейраминидазы (NA) из представляющих интерес циркулирующих вирусов дикого типа (ДТ) на острове остальных шести внутренних белковых генов (PB1, PB2, PA, NP, M и NS), полученных из MDV. Основные донорные вирусы A/Leningrad/134/17/57(H2N2)(Len-MDV) и B/USSR/60/69 в настоящее время используются в России в качестве MDV для LAIV. MDV содержат мутации в нескольких генных сегментах, что делает их адаптированными к холоду (ca), чувствительными к температуре (ts) и ослабленными (att). Поверхностные гликопротеины гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) современных штаммов включаются в эти MDV путем реассортации. Их фенотип ca, ts и att указывает на то, что LAIV реплицируются при низких температурах и перестают реплицироваться при более высоких температурах (>38°C), ограничивая репликацию в верхних дыхательных путях. По сравнению с MDV, используемыми в США, российские MDV содержат меньше мутаций, которые присутствуют в разных участках генных сегментов, что позволяет предположить, что они могут быть по-разному аттенуированы. Прямое сравнение на животных и человеке показало, что российский MDV и полученный на его основе один штамм-реассортант были более иммуногенными, чем их эквиваленты.

За прошедшие годы российские LAIV были безопасно введены более чем 75 миллионам человек, и было показано, что они безопасны в отношении ослабления (генетической стабильности) и передачи. Возврат к вирулентности (потеря ослабленного фенотипа) никогда не наблюдался и очень маловероятен, поскольку для этого потребуется реверсия множественных мутаций в более чем одном сегменте гена. О нейровирулентности российских вирусов LAIV никогда не сообщалось, и было показано, что как MDV, так и производные от них реассортанты не обладают нейровирулентными свойствами. После введения LAIV нет сообщений о серьезных побочных эффектах, связанных с иммунизацией, за исключением самоограничивающихся гриппоподобных симптомов (насморк, заложенность носа, боль в горле, кашель, головная боль и субфебрильная температура), о которых сообщалось в редких случаях. Кроме безопасности, LAIV показали свою эффективность в защите от болезней, вызванных инфекцией вируса гриппа. Иммунитет, индуцированный LAIV, является широким и, как было показано, защищает от дрейфующих штаммов. В частности, у детей было показано, что вакцины LAIV более эффективны для клинической защиты и/или защиты от подтвержденного культивированием гриппа, чем инактивированная вакцина против гриппа, а также было показано, что они вызывают коллективный иммунитет.

Как и инактивированные вакцины против гриппа, российские вакцины против гриппа LAIV производятся с использованием куриных яиц с развивающимися

эмбрионами, со своими присущими им недостатками: ограниченное качество вакцины у поставщиков, и то, что яйца, свободные от патогенной микрофлоры, требуют предварительного заказа с минимальным сроком поставки 4 месяца, прежде чем яйца станут доступны для крупномасштабного производства вакцин. Специализированное оборудование для инкубации яиц, сбора вируса и т.д., в свою очередь, ограничивает возможности быстрого масштабирования. Увеличенное время, необходимое для производства вакцин, зависящих от яиц, может привести к тому, что будет доступно слишком мало доз, чтобы противостоять пандемической ситуации, такой как произошедшая в 2009 году, или остановить пандемию, вызванную высокопатогенным вирусом гриппа. Таким образом, существующая система производства вакцин будет неадекватной для реагирования на пандемию гриппа, для которой требуется новый быстрый процесс производства вакцины в чрезвычайных ситуациях. Теоретически производство противогриппозных вакцин в культуре клеток дает важные преимущества в случае пандемии. Производство вакцины в больших масштабах может быть легко достигнуто с использованием уже существующих технологических процессов производства культур тканей для других вирусных вакцин.

Контроль доступности консистенции субстрата и гибкости производства, быстрое масштабирование, что особенно важно в случае пандемии, независимость от поставок яиц и поддержания поголовья кур - основные преимущества метода культивирования тканей. Яичная скорлупа имеет пористую структуру, и яйца нестерильны снаружи. Производственный процесс для выращивания вируса гриппа в яйцах требует прокола яичной скорлупы для инокуляции и открытых манипуляций для сбора с неизбежным риском заражения. Кроме того, культура клеток представляет собой более контролируемую систему с определенными средами для культивирования клеток и проверенными банками клеток в соответствии с Правилами надлежащей производственной практики (GMP), поэтому были предприняты попытки перенести производство из яиц в культуру клеток.

Несколько клеточных линий в настоящее время исследуются на предмет получения вируса гриппа на основе клеточных культур, и сообщалось об использовании для этого клеток MRC-5 (см. De Ona et al. (1995) J Clin Microbiol 33: 1948-49), клеток HepG2 (см. Ollier et al. (2004) J Clin Microbiol 42 (12): 5861-5), клеток LLC-MK2 (см. Schepetiuk & Kok (1993) J Virol Methods 42 (2-3): 241-50), клеток Мадин-Дарби почки собаки (MDCK) (см. Tobita et al. (1975) Med Microbiol Immunol (Berl). 162 (1): 9-14 и 23-27), клеток Vero африканской зеленой мартышки (см. Monto et al. (1981) J Clin Microbiol 13 (1): 233-235 и Govorkova et al. (1995) J Infect Dis. 172 (1): 250-3) и клеток PER.C6 (см.: Cox, R.J. et al.; Vaccine 2009, 27, 1889–1897). Ранее для клеток MRC-5, WI-38 и FRhL сообщалось о титрах вируса от низких до умеренных с титрами, равными или ниже $5,0 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл, тогда как для клеток MDCK сообщалось о титрах до $6,7 \log_{10}$ ТЦД₅₀/мл. Хотя вакцины

против гриппа, полученные из клеточной культуры (вирусы гриппа, выделенные из яиц, адаптированные/оптимизированные для роста в клеточной культуре), разрешены в Европе (Optaflu Novartis; 2007) и США (Flucelvax Novartis; 2012), полученные из клеточной культуры вакцины против гриппа занимают только очень небольшую долю рынка.

Это может быть связано с непостоянным выходом вакцины против гриппа при использовании систем производства на основе клеточных культур в сочетании с классическими методами очистки и трудоемкой практикой стабилизации. Теоретические проблемы безопасности, связанные с использованием перевиваемых клеточных линий, таких как клетки MDCK, были подняты в связи с их использованием в производстве вакцин (VRBPAC, 2008). Эти проблемы в первую очередь связаны с остаточными клеточными компонентами (ДНК и белком) в лекарственном препарате вакцины и особенно актуальны для продуктов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV), которые не инактивированы и не подвергаются глубокой биохимической очистке, как в случае с традиционными инактивированными вакцинами против гриппа. Для минимизации этих рисков были предприняты две стратегии: определение характеристик клеточной линии и технологические этапы очистки вакцины. Конкретным аспектом процесса очистки является уменьшение количества и размера остаточной ДНК клетки-хозяина в вакцине. Производство Optaflu Novartis (2007) включает в себя несколько этапов по удалению остаточной ДНК клетки-хозяина. К ним относятся ионообменная хроматография на сульфате целлюлозы, которая связывает вирус гриппа и позволяет ДНК проходить через него, и последующий этап преципитации СТАВ, который, среди прочего, осаждает ДНК.

Ранее описанные способы очистки являются дорогостоящими и трудоемкими, поскольку в них используется один или несколько из следующих хроматографических процессов: хроматография на гидроксиапатите, афинная хроматография, анионообменная хроматография и эксклюзионная хроматография. Сообщается, что общее извлечение вируса неоптимально для рутинного производства вакцины с использованием хроматографических методов. Кроме того, циркулирующие вирусы гриппа претерпевают изменения антигенных свойств вирусных частиц из-за антигенного дрейфа и сдвига, наблюдаемого в этом вирусе. Эти изменения влияют на физико-химические свойства вируса и, в свою очередь, на способность вируса связывать хроматографическую матрицу. Это может привести к значительному разбросу выходов смещенных или измененных штаммов, что сделает хроматографию непригодной для обычного производства. В другом методе, применяемом для удаления/извлечения ДНК клетки-хозяина, используется более высокая концентрация бензоназы (например, 50 Ед/мл, 100 Ед/мл), что является дорогостоящим решением.

Типичные неионные поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических препаратах, включают в себя Triton™ X-100, Pluronic® F-68, F-88 и F-

127 (полоксамеры), Brij 35 (полиоксиэтиленалкиловый эфир), полиоксилстеарат 40, Cremophor® EL и альфа-токоферол TPGS. У каждого из этих поверхностно-активных веществ есть общая характеристика, заключающаяся в том, что все они содержат группы полиоксиэтилена и, таким образом, в большей или меньшей степени имеют схожую проблему, заключающуюся в том, что группа полиоксиэтилена самоокисляется с образованием реакционноспособных пероксидов, что вызывает нежелательное повышение иммуногенности белка. (См. Edward T. Maggio et al; Polysorbates, peroxides, protein aggregation, immunogenicity - a growing concern; Journal of Excipients and Food Chemicals 3(2):46-53; 2012).

Для стабилизации препарата вакцины с целью достижения желаемого срока хранения используются различные стабилизаторы. Стабилизаторы, такие как поливинилпирролидон (ПВП), трегалоза и сорбит, также используются в вирусных препаратах. Однако сообщалось, что ПВП дестабилизирует препараты живых аттенуированных вирусов. (См.: JA White et al; Development of a stable liquid formulation of live attenuated influenza vaccine; Vaccine Volume 34, Issue 32, 12 July 2016, Pages 3676-3683; 2016).

Трегалоза является дорогим компонентом; её необходимо комбинировать с другими сахарами и белковыми добавками (желатином) для достижения стабильности. Кроме того, другие стабилизаторы лучше трегалозы для увеличения стабильности лиофилизированной вакцины при хранении.

Сорбит имеет низкую температуру стеклования (T_g) ($-1,6^{\circ}\text{C}$), поэтому не может использоваться в качестве основного компонента рецептуры препарата. Низкая T_g сорбита ограничивает его применение. Сорбит необходимо комбинировать с другими сахарами и белковыми добавками (желатином) для достижения стабильности.

Было высказано предположение, что теоретическое влияние остаточной ДНК хозяина на безопасность продукта следует учитывать при выборе пути введения вакцины, поскольку распределение в тканях и скорость выведения могут варьироваться в зависимости от способа введения. Исследования показывают, что захват и клиренс ДНК MDCK из тканей варьируются в зависимости от пути введения. Когда ДНК вводили интраназально, определяемые уровни ДНК были ниже во все моменты времени по сравнению с внутримышечным введением. Таким образом, интраназальный путь введения вакцины, по-видимому, снижает потенциальный риск, связанный с остаточной ДНК клетки-хозяина, которая может присутствовать в конечных вакцинных продуктах, полученных в культуре клеток. (См.: D.E. Tabor et al.; Biologicals 41 (2013) 247-253).

Настоящее изобретение направлено на преодоление вышеупомянутых ограничений, а также оно относится композициям и способам получения клеток MDCK (клеток Мадин-Дарби почки собаки) для интраназальной доставки живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) для защиты от вируса гриппа. Настоящее изобретение

также относится к улучшенному способу производства, в котором используется низкая концентрация эндонуклеазы, в частности бензоназы, и в котором отсутствуют хроматографические этапы, пригодному для крупномасштабного получения клеточных культур. Кроме того, настоящее изобретение относится к препарату LAIV, не содержащему полимеров и поверхностно-активных веществ, содержащему один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к доставляемой интраназально композиции живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) на основе клеток MDCK, содержащей:

а) один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа;

где живые аттенуированные штаммы вакцинных вирусов гриппа получены с помощью «классического» или «обратного генетического» метода реассортации, в основном состоят из гена гемагглютинаина (HA) и/или гена нейраминидазы (NA) из пандемического или сезонного вируса гриппа дикого типа и гены, экспрессирующие белки PB1, PB2, PA, NP, M и NS, а в некоторых случаях белок NA, полученные из основного донорного вируса (MDV) штаммов A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) и/или B/ USSR /60/69,

b) одну или несколько аминокислот,

c) один или несколько углеводов, и

d) желатин.

Настоящее изобретение также относится к способу получения такой вакцинной композиции/препарата.

ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Некоторые из задач настоящего изобретения, которые решают, по меньшей мере, один вариант осуществления изобретения, являются следующими:

Задачей настоящего изобретения является решение одной или нескольких проблем предшествующего уровня техники или, по меньшей мере, предоставление полезной альтернативы.

Другой задачей настоящего изобретения является получение вакцинных композиций и разработка способов получения живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV), которая может быть доставлена интраназально.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание композиции живой аттенуированной вакцины (LAIV) против гриппа на основе клеток Мадин-Дарби почки собаки (MDCK), где полностью исключено использование яиц.

Еще одной задачей настоящего изобретения является получение композиции LAIV, содержащей один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа и не содержащей полимеров и поверхностно-активных веществ.

Еще одной задачей настоящего изобретения является получение композиции LAIV, содержащей один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа, где штаммы LAIV основаны на адаптированных к холоду, чувствительных к температуре и ослабленных фенотипах основных донорных вирусов (MDV), содержащих один или два поверхностных гликопротеина пандемического или сезонного штамма вируса гриппа дикого типа.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание композиции живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) на основе клеток MDCK, доставляемой интраназально, где композиция сохраняет желаемые характеристики вируса, включая иммуногенность и стабильность.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание композиции/препарата живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV), вводимой интраназально на основе клеток MDCK, подходящей для лечения или предотвращения инфекции вирусом гриппа, или для предотвращения, ослабления или задержки начала или прогрессирования её клинических проявлений.

Еще одной задачей настоящего изобретения является разработка улучшенной методологии в области получения живой аттенуированной вакцины против гриппа на основе клеток MDCK, пригодной для крупномасштабного производства клеточных культур.

Другие задачи и преимущества настоящего изобретения будут более очевидны из следующего описания, которое не предназначено для ограничения объёма настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Настоящее изобретение далее будет описано с помощью прилагаемых чертежей, перечисленных ниже:

На **фиг. 1** схематически представлена реассортация дикого типа пандемического вируса гриппа или сезонного вируса гриппа и аттенуированного MDV с получением реассортантного вакцинного штамма, где (A) представляет собой инфекционно-патогенный вирус дикого типа, (B) представляет собой основной донорный вирус, содержащий генные сегменты, обеспечивающие чувствительность к температуре (ts), адаптацию к холоду (ca) и ослабленный фенотип (at), и (C) представляет собой реассортантный вакцинный штамм.

Фиг. 2. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 37°C штамма вируса гриппа А (A/17/turkey/Turkey/05/133 - A/H5N2). Логарифмированные титры выхода (EID₅₀/0,5 мл) со стабилизирующей композицией 1, описанной в Таблице-3В.

Фиг. 3. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 2-8°C штамма вируса гриппа А (A/17/turkey/Turkey/05/133 - A/H5N2 и A/17/Anhui/2013/61 - A/H7N9).

Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 1, описанной в Таблице-3А.

Фиг. 4. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 37°C штамма вируса гриппа А (A/17/California/2009/38 - A/H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 3, описанной в Таблице-3В.

Фиг. 5. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 2-8°C штамма вируса гриппа А (A/17/California/2009/38 - A/H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 3, описанной в Таблице-3А.

Фиг. 6. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 37°C штамма вируса гриппа А (A/17/California/2009/38 - A/H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 4, описанной в Таблице-3В.

Фиг. 7. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 2-8°C штамма вируса гриппа А (A/17/California/2009/38 - A/H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 4, описанной в Таблице-3А.

Фиг. 8. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 37°C штамма вируса гриппа А (A/SouthAfrica/3626/13 - H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 2, описанной в Таблице-3В.

Фиг. 9. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 2-8°C штамма вируса гриппа А (A/SouthAfrica/3626/13 - H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 2, описанной в Таблице-3А.

Фиг. 10. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 37°C штамма вируса гриппа А (A/SouthAfrica/3626/13 - H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 1, описанной в Таблице-3В.

Фиг. 11. График, иллюстрирующий стабильность при температуре 2-8°C штамма вируса гриппа А (A/SouthAfrica/3626/13 - H1N1) и штамма вируса гриппа В (B/Texas/02/13-CDC). Логарифмированные титры выхода ($EID_{50}/0,5$ мл) со стабилизирующей композицией 1, описанной в Таблице-3А.

Фиг. 12. Тестирование на инфекционные вирусы в образцах носовых раковин и легких. Животных вакцинировали одной или двумя дозами H5 LAIV, H7 LAIV или плацебо. Группы с 1 по 4 заражали H5/tk/Tk, группы 5 и 6 заражали H5/Vt и группы с 7 по 10 заражали H7/An. Образцы носовых раковин (а) и образцы легких (b), взятые на 4-й день

после инфицирования, титровали на наличие вирусных частиц, способных к репликации. Индивидуальные титры показаны со средним групповым значением, обозначенным сплошной черной линией.

Фиг. 13. Образование антител после иммунизации, определяемое тестами HI и VN. Средние геометрические значения образования антител на 28-й день после последней иммунизации (28-й день исследования для режима с одной дозой и 56-й день исследования для режима с двумя дозами) против гомологичных вирусов, которыми проводили заражение, H5/tk/Tk для животных, иммунизированных H5 LAIV, и H7/An для животных, иммунизированных H7 LAIV. (a) Титры антител в тесте HI. (b) Титры антител в тесте VN. N = 6 на группу, планка погрешностей представляет собой стандартную ошибку среднего. Статистическая значимость определялась U-критерием Манна-Уитни. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$.

ОПИСАНИЕ

Хотя настоящее изобретение может быть реализовано в различных вариантах осуществления, конкретные варианты осуществления изобретения показаны на чертежах с последующим подробным обсуждением, с пониманием того, что настоящее изобретение может рассматриваться как пример принципов раскрытия и не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения тем, что проиллюстрировано и раскрыто в данном описании.

Варианты осуществления настоящего изобретения далее будут описаны со ссылкой на прилагаемые чертежи.

Варианты осуществления изобретения приведены для того, чтобы всесторонне и полностью передать объем настоящего изобретения специалисту в данной области техники. Изложены многочисленные детали, относящиеся к конкретным компонентам и способам, чтобы обеспечить полное понимание вариантов осуществления настоящего изобретения. Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что детали, представленные в вариантах осуществления изобретения, не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения хорошо известные процессы, хорошо известные структуры устройств и хорошо известные способы подробно не описываются.

Терминология, используемая в настоящем изобретении, предназначена только для цели объяснения конкретного варианта осуществления изобретения, и такая терминология не должна рассматриваться как ограничивающая объем настоящего изобретения. Предполагается, что используемые в настоящем изобретении термины в форме единственного числа также могут включать в себя формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

Термины «первый», «второй», «третий» и т.д. не следует рассматривать как ограничивающие объема настоящего изобретения, поскольку вышеупомянутые термины

могут использоваться только для различения одного элемента, компонента, области, слоя или раздела от другого компонента, области, слоя или раздела. Такие термины, как «первый», «второй», «третий» и т.д., когда они используются здесь, не подразумевают конкретную последовательность или порядок, если это явно не указано в настоящем изобретении.

Используемый здесь термин «вирус гриппа» относится к РНК-вирусу, включающему в себя вирусы гриппа А, В, С и D, представляющие семейство Orthomyxoviridae. Вирус гриппа может быть живым пандемическим или сезонным вирусом гриппа дикого типа, живым аттенуированным вирусом гриппа, инактивированным вирусом гриппа, химерным вирусом гриппа или рекомбинантным вирусом гриппа.

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим живой аттенуированный вирус вакцины против гриппа (LAIV) для защиты от инфекции вирусом гриппа. Настоящее изобретение также относится к способам получения композиций, содержащих один или несколько вирусов вакцины против гриппа.

В соответствии с первым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может содержать один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа, одну или несколько аминокислот, один или несколько углеводов и желатин.

Термин «живой» используется в его общепринятом значении, живой вирус - это вирус, который не был инактивирован, т.е. вирус, способный реплицироваться в перmissive клетках. Живой аттенуированный вирус вакцины против гриппа представляет собой вирус, который не вызывает заболевания, вызываемого соответствующим вирусом дикого типа у животных или людей, и который способен вызывать специфичный иммунный ответ.

В соответствии со вторым вариантом осуществления настоящего изобретения один или несколько живых аттенуированных вакцинных вирусов гриппа могут быть получены «классическим» или «обратным генетическим» методом реассортации и включать в себя генные сегменты из одного или нескольких штаммов вируса гриппа.

В соответствии с первым аспектом второго варианта осуществления изобретения реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа представляет собой реассортантный вирус LAIV, содержащий генные сегменты, отвечающие за адаптацию к холоду, чувствительность к температуре и/или ослабленный фенотип (белки PB1, PB2, PA, NP, M и/или NS), штамма основного донорного вируса (MDV) и генные сегменты гемагглютинаина (HA) и/или нейраминидазы (NA) штаммов вируса дикого типа пандемического или сезонного гриппа А или В или С в соотношении 1:7, 2:6, 3:5, 4:4, 5:3, 6:2 или 7:1.

Однако предпочтительно реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа может включать в себя генные сегменты из штамма основного донорного

вируса (MDV) и штамма дикого типа пандемического или сезонного вируса гриппа в соотношении 6:2 (как показано на Фиг. 1).

В соответствии со вторым аспектом второго варианта осуществления изобретения реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), полученного из вируса гриппа А любого подтипа, или он может быть получен из вируса гриппа В любого подтипа.

Реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), выбранного из группы, состоящей из штамма гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), штамма гриппа В B/USSR/60/69.

Однако предпочтительно реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа типа А может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из штамма гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа А - A/17/California/2009/38 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из штамма гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа А - A/17/turkey/Turkey/05/133 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа А - A/17/Anhui/2013/61 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа А - A/17/New York/15/5364 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа А - A/17/Hong-Kong/2014/8296 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа А - A/South-Africa/3626/2013-CDC-LV14A может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).

Также предпочтительно реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа типа В может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из штамма гриппа В В/USSR/60/69.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа В - В/Texas/02/2013-CDC-LV8В может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из штамма гриппа В В/USSR/60/69.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа В - В/Phuket/3073/2013 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из штамма гриппа В В/USSR/60/69.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа типа В - В/56/Brisbane/60/08 может включать в себя генные сегменты из основного донорного вируса (MDV), состоящего из штамма гриппа В В/USSR/60/69.

В соответствии с третьим аспектом второго варианта осуществления изобретения реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа может включать в себя ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из вируса гриппа А или вируса гриппа В, или вируса гриппа С.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа А может включать в себя ген гемагглютинина (НА) из подтипа НА вируса гриппа А подтипов Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н6, Н7, Н8, Н9, Н10, Н11, Н12, Н13, Н14, Н15, Н16, Н17 или Н18 или любого другого зарегистрированного подтипа НА и/или ген нейраминидазы (NA) из подтипа NA вируса гриппа А подтипов N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N10 или N11 или любого другого подтипа NA.

Также предпочтительно реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа может включать в себя ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из штаммов пандемического вируса гриппа или штаммов потенциально пандемического вируса гриппа.

Также предпочтительно реассортантный живой аттенуированный вакцинный вирус гриппа может включать в себя ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из штаммов сезонного вируса гриппа.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа может содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из подтипов вируса гриппа А Н1N1, Н2N2, Н3N2, Н5N1, Н5N2, Н9N2, Н7N1, Н7N3, Н7N7, Н6N1, Н7N9 и Н10N8 или любого другого ранее зарегистрированного или недавно обнаруженного штамма вируса.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа может содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из штамма вируса гриппа A pdmH1N1.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа может содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из A/California/07/2009 (называемого A/Cal)-подобного штамма вируса гриппа A.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа может содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из A/Michigan/45/2015-подобного штамма вируса гриппа A.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа может содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из A/South-Africa/3626/2013-подобного штамма вируса гриппа A.

Также предпочтительно штамм реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа может содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из H3N2-A/HongKong/4801/2014-подобного штамма вируса гриппа A.

Также предпочтительно штаммы реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа могут содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из вирусов гриппа B, принадлежащих к двум разным линиям, или Yamagata-подобного или Victoria-подобного.

Также предпочтительно штаммы реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа могут содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из штамма, подобного штамму вируса гриппа B линии Victoria B/Brisbane/60/2008.

Также предпочтительно штаммы реассортантного живого аттенуированного вакцинного вируса гриппа могут содержать ген гемагглютинина (НА) и/или ген нейраминидазы (NA) из штамма, подобного штамму вируса гриппа B линии Yamagata B/Phuket/3073/2013.

Существует два способа получения реассортантов

1. Классический способ реассортации

Процесс реассортации вакцинного вируса пандемического или сезонного гриппа дикого типа и аттенуированного MDV с получением реассортантного штамма, включает в себя совместное инфицирование культуры-хозяина, обычно яиц, штаммом MDV и штаммом вируса дикого типа. Реассортантные вирусы отбираются путем добавления антител со специфичностью к белкам НА и/или NA MDV, чтобы отобрать реассортантные вирусы, которые содержат белки НА и/или NA штамма вируса дикого типа. За несколько пассажей этой обработки можно выбрать быстрорастущие реассортантные вирусы,

содержащие сегменты HA и/или NA вакцинного штамма вируса пандемического или сезонного гриппа дикого типа и внутренние гены MDV.

2. Обратно-генетический способ реассортации

Обратно-генетический способ представляет собой способ создания инфекционных вирусных частиц из копий ДНК. Шесть внутренних генов MDV и гены HA и NA из штамма дикого типа, рекомендованного для включения в вакцину, клонируют в плазмиды, которые могут генерировать полноразмерную вирусную РНК при трансфекции в культуральные клетки. Этими плазмидами вместе с четырьмя плазмидами, экспрессирующими субъединицу вирусной полимеразы, трансфицируют в культуральные клетки. Экспрессия субъединицы полимеразы и образование полноразмерной вирусной РНК приводит к сборке вируса и высвобождению инфекционных вирусных частиц в супернатант. Этот спасенный вирус проявляет антигенные характеристики рекомендованных штаммов и фенотип *ca*, *ts*, *att* MDV.

Реассортантный штамм LAIV приобретали в Институте экспериментальной медицины (ИЭМ), Санкт-Петербург, Россия, или в сотрудничающих с ВОЗ центрах, таких как Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Атланта.

В соответствии с третьим вариантом осуществления настоящего изобретения, композиция LAIV может содержать один или несколько углеводов, выбранных из группы, состоящей из, но, не ограничиваясь ими, природных углеводов, синтетических углеводов, полиолов, агентов, способствующих стеклованию, моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов, олигосахаридов и их соответствующих сахарных спиртов, полигидроксильных соединений, таких как производные углеводов и химически модифицированные углеводы, гидроксиэтилкрахмала и сополимеров сахаров. Для применения подходят как натуральные, так и синтетические углеводы. Синтетические углеводы включают в себя без ограничений те, в которых гликозидная связь заменена тиольной или углеродной связью. Могут использоваться как D-, так и L-формы углеводов. Углеводы могут быть невосстанавливающими или восстанавливающими. Если используется восстанавливающий углевод, то предпочтительно добавление ингибиторов реакции Майяра. Восстанавливающие углеводы, подходящие для использования в композиции, известны в данной области техники и включают в себя без ограничений глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, фруктозу, галактозу, маннозу, мальтулозу и лактулозу. Невосстанавливающие углеводы включают в себя без ограничений невосстанавливающие гликозиды полигидроксильных соединений, выбранных из сахарных спиртов и других многоатомных спиртов с прямой цепью. Другие применимые углеводы включают в себя рафинозу, стахиозу, мелецитозу, декстран, целлибиозу, маннобиозу и сахарные спирты. Гликозиды сахарных спиртов предпочтительно представляют собой моногликозиды, в частности соединения, полученные восстановлением дисахаридов, таких как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза.

Стеклообразующий агент выбран из группы, состоящей из сахарозы, маннита, трегалозы, маннозы, рафинозы, лактитола, лактобионовой кислоты, глюкозы, мальтулозы, изомальтулозы, мальтозы, сорбита лактозы, декстрозы, фруктозы, глицерина или их комбинации.

Также в соответствии с предпочтительным аспектом третьего варианта осуществления изобретения композиция LAIV может содержать сахарозу в качестве подходящего углеводного стабилизатора в диапазоне от 1% до 20% масса/объем, предпочтительно в диапазоне от 1 до 10%, более предпочтительно в диапазоне от 3 до 6%, наиболее предпочтительно в количестве равном 4% (мас./об.).

В соответствии с четвертым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может содержать одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из, но, не ограничиваясь ими, трицина, аргинина, лейцина, изолейцина, гистидина, глицина, глутамина, лизина, аланина, пептида, гидролизованного белка или белка, такого как сывороточный альбумин.

Также в соответствии с предпочтительным аспектом четвертого варианта осуществления изобретения композиция LAIV может содержать в качестве подходящих аминокислот трицин, аргинин, гистидин и аланин по отдельности или в комбинации.

Также в соответствии с предпочтительным аспектом четвертого варианта осуществления изобретения одна или несколько аминокислот могут включать в себя трицин в диапазоне от 0,1% до 2% масса/объем (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 1%, более предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 0,5%, наиболее предпочтительно в количестве равном 0,3% (мас./об.).

Также в соответствии с предпочтительным аспектом четвертого варианта осуществления изобретения одна или несколько аминокислот могут включать в себя гистидин в диапазоне от 0,1% до 2% (мас./об.), предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 1%, более предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 0,5%, наиболее предпочтительно в количестве равном 0,21% (мас./об.).

Также в соответствии с предпочтительным аспектом четвертого варианта осуществления изобретения одна или несколько аминокислот могут включать в себя аланин в диапазоне от 0,01% до 1% масса/объем, предпочтительно в диапазоне от 0,05% до 0,5%, более предпочтительно в диапазоне от 0,08% до 0,2%, наиболее предпочтительно в количестве равном 0,1% (мас./об.).

Также в соответствии с предпочтительным аспектом четвертого варианта осуществления изобретения одна или несколько аминокислот могут включать в себя аргинин в диапазоне от 0,1% до 10% масса/объем, предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 5%, более предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 3%, наиболее предпочтительно в количестве равном 2,1% (мас./об.).

В соответствии с пятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может содержать желатин в диапазоне от 0,1% до 10% масса/объем, предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 5%, более предпочтительно в диапазоне от 0,1% до 3%, наиболее предпочтительно в количестве равном 0,85% (мас./об.).

Используемый здесь термин «желатин» означает стерильный апирогенный белковый препарат (например, фракции), полученный частичным кислотным гидролизом (желатин типа А) или частичным щелочным гидролизом (желатин типа В) животного коллагена, чаще всего полученного от крупного рогатого скота, свиньи и рыбы. Желатин можно получить с различными диапазонами молекулярной массы. Также можно использовать рекомбинантные источники желатина.

В соответствии с шестым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может дополнительно содержать буферный агент, выбранный из группы, состоящей из HEPES, цитрат-фосфатного, карбонатного, фосфатного, цитратного, лактатного, глюконатного и тартратного буферных агентов, а также более сложные органические буферные агенты, включая фосфатный буферный агент, который содержит фосфат натрия и/или фосфат калия в соотношении, выбранном для достижения желаемого значения pH. В другом примере буферный агент содержит трис(гидроксиметил) аминметан или «Трис», введенный в рецептуру для достижения желаемого значения pH. Ещё в другом примере буферный агент может представлять собой минимальную питательную среду с солями Хэнкса.

В соответствии с седьмым вариантом осуществления настоящего изобретения, где однодозовая композиция не содержит консерванта, а многодозовая композиция может дополнительно содержать консервант, выбранный из группы, состоящей из 2-феноксизтанола, бензетония хлорида (Phemerol), фенола, м-крезола, тиомерсала, формальдегида, сложных эфиров парабенов (например, метил-, этил-, пропил- или бутилпарабен), бензалкония хлорида, бензилового спирта, хлорбутанола, п-хлор-м-крезола или бензилового спирта или их комбинации. Композиция вакцины может включать в себя материал для однократной иммунизации или может включать материал для множественной иммунизации (то есть «многодозовый» набор). В многодозовых схемах предпочтительно включение консерванта. В качестве альтернативы (или в дополнение) к включению консерванта в многодозовые композиции, композиции могут быть помещены в контейнер, имеющий асептический адаптер для удаления материала.

В соответствии с восьмым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый переносчик, вспомогательное вещество, связующее вещество, носитель, изотонический агент, эмульгатор или увлажнитель, где фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества выбраны из группы, состоящей из поверхностно-активных веществ, полимеров и солей. Примеры поверхностно-активных веществ могут включать в себя неионные

поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и т.д. Примеры полимеров могут включать в себя декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и т.д. Примеры солей могут включать в себя NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , MgCl_2 и т.д.

В соответствии с девятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может дополнительно содержать адъювант, выбранный из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, гидроксифосфата алюминия и сульфата алюминия калия или их смеси.

В соответствии с десятым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может дополнительно содержать иммуностимулирующий компонент, выбранный из группы, состоящей из масляной и водной эмульсии, MF-59, липосомы, липополисахарида, сапонины, липида А, производных липида А, монофосфориллипида А, 3-деацилированного монофосфориллипида А, AS01, AS03, олигонуклеотида, олигонуклеотида, содержащего, по меньшей мере, один неметилованный CpG и/или липосому, адъюванта Фрейнда, полного адъюванта Фрейнда, неполного адъюванта Фрейнда, полимеров, сополимеров, таких как сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена, включая блок-сополимеры, полимера р 1005, адъюванта CRL-8300, мурамилдипептида, агонистов TLR-4, флагеллина, флагеллинов, полученных из грамотрицательных бактерий, агонистов TLR-5, фрагментов флагеллинов, способных связываться с рецепторами TLR-5, альфа-С-галактозилцерамида, хитозана, интерлейкина-2, QS-21, ISCOMS, комбинации сапонины со стеролами и липидами.

В соответствии с одиннадцатым варианту осуществления настоящего изобретения, способ получения композиции LAIV на основе культуры клеток MDCK может включать в себя любую подгруппу или все из следующих этапов:

а) Вирус-кандидат для вакцины LAIV первоначально пассируют в свободных от патогенной микрофлоры (SPF) куриных яйцах с эмбрионом с получением исходного вакцинного вируса (MSV) на основе яиц.

б) Исходный вакцинный вирус на основе яиц адаптирован для роста в культуре клеток-хозяев для получения рабочего посевного вируса (WSV) на основе клеток. Этот WSV на основе клеток субкультивируют и размножают в клетках-хозяевах с использованием различных сосудов/систем для культивирования клеток, таких как колбы для культивирования тканей (TCF) с площадью поверхности 175 cm^2 , роллерные флаконы (RB) с площадью поверхности 850 cm^2 , клеточные фабрики (CF) с площадью поверхности 6320 cm^2 и биореактор с неподвижным слоем (например, биореакторы iCELLis® от Pall® Life Sciences, Порт Вашингтон, штат Нью-Йорк, такие как биореакторы Nano и 500/100).

с) Сбор культивированного вируса.

d) Собранный вирус фильтруют путем проточной фильтрации (DFF), по меньшей мере, через один фильтр очистки для получения очищенных вирусных пулов (CVP).

e) CVP обрабатывают неспецифичной эндонуклеазой для разрушения клеточной ДНК.

f) Обработанные эндонуклеазой CVP подвергают тангенциальной поточной фильтрации (TFF).

g) Стабилизация полученного с помощью TFF концентрата стабилизирующей композицией, содержащей один или несколько углеводов, одну или несколько аминокислот и желатин, с образованием стабилизированного вирусного продукта.

h) Стерилизация стабилизированного полученного с помощью TFF концентрата с помощью DFF, по меньшей мере, через один стерилизационный фильтр для получения пула стерилизованного очищенного моновалентного вируса (CMVP).

i) Стерилизованные CMVP хранят в поликарбонатных бутылках при температуре - 60°C или ниже.

j) Стерилизованные препараты разливают во флаконы и хранят при температуре 2-8°C.

В соответствии с первым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения вирус-кандидат для LAIV на основе яиц адаптирован для роста в культуре клеток-хозяев, где клетка-хозяин может быть любой эукариотической клеткой. Также предпочтительно культура клеток-хозяев может представлять собой клетки млекопитающих или птиц. Подходящие клетки млекопитающих включают в себя без ограничений клетки хомяка, крупного рогатого скота, приматов (включая людей и обезьян) и собаки.

Различные типы клеток включают в себя без ограничений клетки почки, фибробласты, клетки сетчатки и клетки легких. Примерами подходящих клеток хомяка являются клеточные линии, имеющие названия BHK21 или НКСС. Подходящими клетками обезьяны являются, например, клетки африканской зеленой мартышки, такие как клетки почек, как в клеточной линии Vero. Подходящими клетками собак являются, например, клетки почки, как в клеточных линиях CLDK и MDCK.

Другие подходящие клетки включают в себя без ограничений CHO; 293T; BHK; MRC 5; PER.C6; FRh1.2; WI-38; и т.д. Подходящие клетки широкодоступны, например, из Американской коллекции клеточных культур (ATCC), из Депозитария клеток Института медицинских исследований Кориелла или из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC). Например, ATCC поставляет различные клетки Vero под каталожными номерами CCL 81, CCL 81.2, CRL 1586 и CRL-1587, и он поставляет клетки MDCK под каталожным номером CCL 34. Клетки PER.C6 доступны в ECACC под номером депонирования 96022940.

Также предпочтительно культура клеток-хозяев может представлять собой клетки Мадин-Дарби почки собаки (MDCK), выбранные без ограничения из линий клеток ATCC CCL-34, MDCK 33016 (DSM ACC 2219), MDCK (ATCC CCL34 MDCK (NBL2)), MDCK 33016 (DSM ACC 2219), DSM ACC3309, ATCC CRL-12042, ATCC PTA-7909, ATCC PTA-7910, ATCC PTA-6500, ATCC PTA-6501, ATCC PTA-6502, ATCC PTA-6503, MDCK-S, MDCK-SF101, MDCK-SF102, MDCK-SF103 и FERM BP-7449.

Также предпочтительно культура клеток-хозяев может представлять собой клетки Мадин-Дарби почки собаки (MDCK) ATCC CCL 34 (NBL2).

В соответствии со вторым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения клетки MDCK можно культивировать в минимальной питательной среде (MEM), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Культивирование клеток может происходить при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Значение pH среды во время размножения клеток до инфицирования может находиться в диапазоне от pH 6,8 до pH 7,6 и более предпочтительно в диапазоне от pH 7,0 до pH 7,4.

Также клетки MDCK можно культивировать в среде без сыворотки крови или белка.

В соответствии с третьим аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения, перед инфицированием клетки MDCK можно промыть MEM, а затем MEM, содержащей протеазу в диапазоне от 5 до 25 Ед./мл.

Протеаза может быть выбрана без ограничений из трипсина, химотрипсина, грибковой протеазы, пепсина, папаина, бромелаина и субтилизина.

Также предпочтительно протеаза может представлять собой трипсин, полученный от свиньи или крупного рогатого скота, или из грибов, или из бактерий.

Также предпочтительно протеаза может представлять собой рекомбинантный трипсин, экспрессируемый в клетках-хозяевах дрожжей, растений или бактерий, выбранных, без ограничений из *Aspergillus* spp, *Streptomyces griseus*, кукурузы, *E.coli*, *Pichia pastoris*. Предпочтительно указанный рекомбинантный трипсин выбран из Biogenomics (*E.coli* в качестве хозяина), D.K. Bio Pharma Pvt. Ltd (*E.coli* в качестве хозяина), Richcore (*Pichia pastoris* в качестве хозяина) и Gibco (грибки).

Также предпочтительная концентрация трипсина составляет 12,5 Ед./мл.

В соответствии с четвертым аспекту одиннадцатого варианта осуществления изобретения, перед инфицированием рабочий посевной вирус может быть активирован путем разбавления вируса MEM, содержащим протеазу в диапазоне от 5 до 25 Ед./мл, и инкубирования при температуре от 31°C до 33°C в течение 10-60 минут.

Протеаза может быть выбрана без ограничений из трипсина, химотрипсина, грибковой протеазы, пепсина, папаина, бромелаина и субтилизина.

Также предпочтительно протеаза может представлять собой трипсин, полученный от свиньи или крупного рогатого скота, или из грибов, или из бактерий.

Также предпочтительно протеаза может представлять собой рекомбинантный трипсин, экспрессируемый в клетках-хозяевах дрожжей, растений или бактерий, выбранных, без ограничений из *Aspergillus* spp, *Streptomyces griseus*, кукурузы, *E.coli*, *Pichia pastoris*. Предпочтительно указанный рекомбинантный трипсин выбран из Biogenomics (*E.coli* в качестве хозяина), D.K. Bio Pharma Pvt. Ltd (*E.coli* в качестве хозяина), Richcore (*Pichia pastoris* в качестве хозяина) и Gibco (грибки).

Также предпочтительная концентрация трипсина составляет 12,5 Ед./мл.

Также предпочтительная концентрация трипсина составляет от 2000 до 3000 единиц трипсина на роллерный флакон.

В соответствии с пятым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения инфицирование клеток MDCK вирусом-кандидатом для LAIV может происходить при плотности клеток MDCK предпочтительно примерно $40-60 \times 10^6$ /TCF для TCF, $150-180 \times 10^6$ /RB для RB и $7000-10000 \times 10^6$ /BR. (4 м²) для биореактора (4 м²).

В соответствии с шестым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения вирус-кандидат для LAIV можно выращивать на клетках MDCK в адгезивной культуре или в режиме культивирования в суспензии.

В соответствии с седьмым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения инфицирование клеток MDCK вирусом-кандидатом для LAIV на основе яиц может происходить при множественности заражения (МЗ) от 1:100 до 1:10000.

В соответствии с восьмым аспектом одиннадцатого варианта осуществления после инфицирования клетки MDCK можно культивировать в минимальной питательной среде (MEM), содержащей трипсин в диапазоне от 5 до 25 Ед./мл, и при температуре $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Значение pH среды после инфицирования может находиться в диапазоне от 6,8 до 7,6 и наиболее предпочтительно в диапазоне от 7,2 до 7,6.

В соответствии с девятым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения после инфицирования супернатант клеток может быть собран после периода инкубации от 40 до 70 часов; более предпочтительно период инкубации может составлять 54 ± 8 часов.

Также, в качестве альтернативы, можно проводить многократный сбор с подходящим интервалом времени примерно 4-5 раз перед удалением исходного материала, и обрабатывать собранные партии отдельно для получения пулов очищенных моновалентных вирусов (CMVP).

После сбора вируса может быть достигнут выход вируса не менее 7,0-9,2 Log EID₅₀/0,5 мл.

В соответствии с десятым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения среда, содержащая вирус, может быть очищена, обычно с помощью фильтров с уменьшающимся размером пор (например, 6 мкм, 5 мкм, 0,8 мкм, 0,65 мкм, 0,45 мкм, 0,2 мкм). Подходящие коммерчески доступные фильтры и фильтрующие

устройства хорошо известны в данной области техники и могут быть выбраны специалистами. Типичные фильтрующие устройства могут быть изготовлены из полипропилена или ацетата целлюлозы или полиэфирсульфона, и коммерчески доступными фильтрами могут быть фильтрующие устройства Millipak (Millipore), Kleenpak (Pall) и Sartobran™ (Sartorius).

В соответствии с одиннадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения отфильтрованную вирусную массу можно обработать неспецифичной эндонуклеазой, наиболее предпочтительно бензоназой с концентрацией, варьирующей от 0,5 единиц/мл до 2 единиц/мл, при температуре в диапазоне от 30 до 34°C, в течение 2-6 часов, а затем при температуре от 2 до 8°C в течение 5-15 часов.

Также, в качестве альтернативы, отфильтрованную вирусную массу можно обработать неспецифичной эндонуклеазой, наиболее предпочтительно бензоназой в присутствии двухвалентного катиона, выбранного из группы, состоящей из Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и Cu^{2+} , в количестве от 0,1 мМ до 100 мМ.

Также, в качестве альтернативы, отфильтрованную вирусную массу можно обработать неспецифичной эндонуклеазой, наиболее предпочтительно бензоназой в присутствии соли двухвалентного катиона Mg^{2+} в концентрации от 1 до 3 мМ.

В соответствии с двенадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения обработанная бензоназой вирусная масса может быть дополнительно подвергнута тангенциальной поточной фильтрации (TFF), обычно через фильтры с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) в диапазоне от 100 до 500 кДа, что приводит к концентрации вирусной массы в 2-10 раз и также приводит к удалению остаточных примесей.

Также предпочтительно остаточные примеси могут включать в себя остаточную ДНК, остаточный бычий сывороточный альбумин (BCA) и остаточный белок клетки-хозяина.

В соответствии с тринадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения описанный выше процесс может привести к получению очищенной и концентрированной вирусной массы для LAIV, содержащей следы остаточной клеточной ДНК (<10 нг/доза), остаточного BCA (<50 нг/доза) и остаточных клеточных белков. Кроме того, согласно описанному выше процессу, общее извлечение очищенных вирусов может составлять, по меньшей мере, 40%.

В соответствии с четырнадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения концентрированный исходный моновалентный вирус (концентрат TFF) может быть стабилизирован стабилизирующей композицией для получения конечной композиции LAIV, содержащей один или несколько углеводов, одну или несколько аминокислот и желатин.

Также предпочтительно концентрированный исходный вирус (концентрат TFF) может быть стабилизирован стабилизирующей композицией, содержащей сахарозу, гистидин, аланин, трицин, аргинин и желатин в любой их комбинации.

Также предпочтительно концентрированный исходный вирус (концентрат TFF) может быть стабилизирован стабилизирующей композицией, содержащей сахарозу в концентрации от 1 до 10% (мас./об.), гистидин в концентрации от 0,1% до 2% (мас./об.), аланин в концентрации от 0,01% до 1% (мас./об.), трицин в концентрации от 0,1% до 1% (мас./об.), аргинин в концентрации от 0,1 до 5% (мас./об.) и желатин в концентрации 0,1 до 5% (мас./об.).

Также предпочтительно концентрированный исходный вирус (концентрат TFF) может быть стабилизирован стабилизирующей композицией, содержащей сахарозу в концентрации от 3 до 6% (мас./об.), гистидин в концентрации от 0,1% до 1% (мас./об.), аланин в концентрации от 0,05% до 0,5% (мас./об.), трицин в концентрации от 0,1% до 0,5% (мас./об.), аргинин в концентрации от 0,1 до 3% (мас./об.) и желатин в концентрации от 0,1 до 3% (мас./об.).

Также предпочтительно концентрированный исходный вирус (концентрат TFF) может быть стабилизирован стабилизирующей композицией, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% (мас./об.) аланин, 0,3% (мас./об.) трицина, 2,1% (мас./об.) аргинина и 0,85% (мас./об.) желатина.

В соответствии с пятнадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения стабилизированную вирусную массу можно стерилизовать путем прямоточной фильтрации (DFF), по меньшей мере, через один стерилизационный фильтр, предпочтительно с размером 0,2 мкм. Подходящие коммерчески доступные фильтры и фильтрующие устройства хорошо известны в данной области техники и могут быть выбраны специалистами. Типичные фильтрующие устройства могут быть изготовлены из полипропилена или ацетата целлюлозы, полиэфирсульфона или поливинилидендифторида, и коммерчески доступными фильтрами могут быть фильтрующие устройства Millipak (Millipore), Kleenpak (Pall) и Sartobran™ P (Sartorius).

В соответствии с шестнадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения композиция LAIV может быть поливалентной, содержащей более одного штамма или подтипа вируса LAIV, как раскрыто в описанных ранее вариантах осуществления изобретения. Композиция LAIV может быть двухвалентной, трехвалентной или четырехвалентной.

Также, в качестве альтернативы, композиция LAIV может быть одновалентной, содержащей любой из штамма или подтипа вируса LAIV, как раскрыто в описанных ранее вариантах осуществления изобретения.

В соответствии с семнадцатым аспектом одиннадцатого варианта осуществления изобретения композиция LAIV может содержать вирус гриппа в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл.

Также предпочтительно композиция LAIV может содержать вирус гриппа типа А или любого подтипа в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; более предпочтительно не менее 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл.

Также предпочтительно композиция LAIV может содержать вирус гриппа типа В или любого подтипа в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; более предпочтительно не менее 6,5 Log EID₅₀ на 0,5 мл.

В соответствии с двенадцатым вариантом осуществления изобретения способ получения иммуногенной композиции может включать следующие этапы:

а) Инфицирование культуры клеток-хозяев MDCK вирусом гриппа при МЗ от 1:100 до 1:10000

б) Сбор супернатанта, содержащего вирус гриппа, после инкубации в течение периода времени от 40 до 70 часов в MEM, содержащей трипсин в диапазоне от 5 до 25 Ед./мл;

с) Фильтрация вирусной массы путем проточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки, имеющий размер пор от примерно 6 микрон до примерно 0,45 микрон;

д) Обработка CVP неспецифичной эндонуклеазой при температуре от 30 до 34°C в течение 2-6 часов, а затем при температуре от 2 до 8°C в течение 5-15 часов;

е) Концентрирование обработанного эндонуклеазой CVP при помощи тангенциальной поточной фильтрации (TFF) с использованием мембраны с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) от 100 кДа до 500 кДа;

ф) Стабилизация концентрата TFF стабилизирующей композицией, содержащей один или несколько углеводов, одну или несколько аминокислот и желатин, с образованием стабилизированной вирусной массы;

г) Стерилизация стабилизированного концентрата TFF с помощью DFF через, по меньшей мере, один стерилизационный фильтр, имеющий размер пор от примерно 0,8 микрон до примерно 0,2 микрон, с образованием стерилизованного CMVP;

где общее извлечение очищенных вирусов больше или равно 40%.

В соответствии с первым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (д) может включать в себя обработку вирусной массы неспецифичной эндонуклеазой, в частности бензоназой, имеющей концентрацию в диапазоне от 0,5 единиц /мл до 5 единиц/мл в присутствии двухвалентного катиона, выбранного из группы, состоящей из Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ и Cu²⁺ в количестве от 0,1 мМ до 100 мМ.

В соответствии со вторым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (d) может включать в себя обработку вирусной массы неспецифичной эндонуклеазой, в частности бензоназой, имеющей концентрацию в диапазоне от 0,5 единиц/мл до 5 единиц/мл в присутствии соли двухвалентного катиона Mg^{2+} в концентрации от 1 до 3 мМ.

В соответствии с третьим аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (e) может включать концентрирование вирусной массы при помощи тангенциальной поточной фильтрации (TFF), приводящей, по меньшей мере, к 4-кратной концентрации вирусной массы.

В соответствии с четвертым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (f) может включать в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей сахарозу в концентрации от 1 до 10% (мас./об.), гистидин в концентрации от 0,1% до 2% (мас./об.), аланин в концентрации от 0,01% до 1% (мас./об.), трицин в концентрации от 0,1% до 2% (мас./об.), аргинин в концентрации от 0,1 до 5% (мас./об.) и желатин в концентрации от 0,1 до 5% (мас./об.).

В соответствии с пятым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (f) может включать в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей сахарозу в концентрации от 3 до 6% (мас./об.), гистидин в концентрации от 0,1% до 1% (мас./об.), аланин в концентрации от 0,05% до 0,5% (мас./об.), трицин в концентрации от 0,1% до 0,5% (мас./об.), аргинин в концентрации от 0,1 до 3% (мас./об.) и желатин в концентрации от 0,1 до 3% (мас./об.).

В соответствии с шестым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (f) может включать в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% (мас./об.) аланина, 0,3% (мас./об.) трицина, 2,1% (мас./об.) аргинина и 0,85% (мас./об.) желатина.

В соответствии с шестым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (f) может включать в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% аланина (мас./об.), 0,3% (мас./об.) трицина, 2,1% (мас./об.) аргинина и 1,0% (мас./об.) желатина.

В соответствии с седьмым аспектом двенадцатого варианта осуществления изобретения в способе получения иммуногенной композиции этап (f) может включать в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% (мас./об.) аланина, 0,3% (мас./об.) трицина, 1,6% (мас./об.) аргинина и 1,0% (мас./об.) желатина.

В соответствии с тринадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения иммуногенная композиция может содержать а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; b) сахарозу в количестве от 1 до 10% (мас./об.); c) гистидин в количестве от 0,1% до 2% (мас./об.); d) аланин в количестве от 0,01% до 1% (мас./об.); e) трицин в количестве от 0,1% до 2% (мас./об.); f) аргинин в количестве от 0,1 до 5% (мас./об.); g) желатин в количестве от 0,1 до 5% (мас./об.).

Также предпочтительно иммуногенная композиция может содержать а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; b) сахарозу в количестве от 3 до 6% (мас./об.); c) гистидин в количестве от 0,1% до 1% (мас./об.); d) аланин в количестве от 0,05% до 0,5% (мас. об.); e) трицин в количестве от 0,1% до 0,5% (мас./об.); f) аргинин в количестве от 0,1 до 3% (мас./об.); g) желатин в количестве от 0,1 до 3% (мас./об.).

Также предпочтительно иммуногенная композиция может содержать а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; b) сахарозу в количестве 4% (мас./об.); c) гистидин в количестве 0,21% (мас./об.); d) аланин в количестве 0,1% (мас./об.); e) трицин в количестве 0,3% (мас./об.); f) аргинин в количестве 2,1% (мас./об.); g) желатин в количестве 0,85% (мас./об.).

Также предпочтительно иммуногенная композиция может содержать а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе не менее от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; b) сахарозу в количестве 4% (мас./об.); c) гистидин в количестве 0,21% (мас./об.); d) аланин в количестве 0,1% (мас./об.); e) трицин в количестве 0,3% (мас./об.); f) аргинин в количестве 2,1% (мас./об.); g) желатин в количестве 1% (мас./об.).

Также предпочтительно иммуногенная композиция может содержать а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; b) сахарозу в количестве 4% (мас./об.); c) гистидин в количестве 0,21% (мас./об.); d) аланин в количестве 0,1% (мас./об.); e) трицин в количестве 0,3% (мас./об.); f) аргинин в количестве 1,6% (мас./об.); g) желатин в количестве 1% (мас./об.).

В соответствии с четырнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может быть полностью жидкой.

Также, в качестве альтернативы, композиция LAIV может быть лиофилизированной или сублимированной композицией.

Используемые здесь термины «сублимационная сушка», «лиофилизация» или «вымораживание» включают в себя лиофилизацию и относятся к процессу замораживания суспензии, после которого вода удаляется сублимацией при низком давлении. Используемый здесь термин «сублимация» относится к изменению физических

свойств композиции, где композиция переходит непосредственно из твердого состояния в газообразное, без перехода в жидкость.

В соответствии с пятнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения, композиция LAIV может быть приготовлена для применения в способе ослабления при возникновении или предотвращения возникновения патологического состояния здоровья, включающем в себя введение эффективного количества композиции LAIV субъекту-человеку интраназальным или другим путем иммунизации.

В соответствии с предпочтительным аспектом осуществления изобретения композиция LAIV может вводиться человеку интраназальным путем. В одном варианте осуществления изобретения введение осуществляется при помощи устройства для интраназального дозирования, такого как устройство для введения в форме аэрозоля (интраназальный спрей) или для введения в форме капель. Жидкие назальные препараты можно вводить в виде назального спрея, через инстилляционный катетер и ринильный катетер, при помощи небулайзеров со сжатым воздухом, бутылки-пульверизатора, пульверизаторов с отмеренными дозами, таких как многодозовые пульверизаторы или однодозовый/двухдозовый пульверизатор, распылительного устройства, прикрепленного к шприцу. Другие лекарственные формы могут быть выбраны из назальных порошков (инсуффляторов, ингаляторов с сухим порошком), назальных гелей, назальных капель, растворов, суспензий, системы соразтворителей, микросфер, наночастиц, микроэмульсий, назальных вставок.

Устройства для интраназальной доставки могут быть выбраны без ограничений из устройства доставки Becton Dickinson (BD) Accuspray™, устройства для интраназальной доставки Bi-Directional™ Optinose, устройства для интраназального распыления на слизистую оболочку MAD от Teleflex, AeroLife™ и AeroVax™ (AerovectRx, Inc., Атланта, GA), струйного инъектора PharmaJet®, безыгольного инъектора Stratis®, MUNJIs многоразовых инъекторов типа форсунки: устройство для аквапунктуры, Hypospray®, MadaJet®, GentleJet®, одноразовых шприцевых струйных инъекторов: Medi-Jector®, J-Tip®, Injex®, Vitajet™, LectraJet HS, LectraJet® M3, ZetaJet™, PharmaJet®, Aktiv-Dry PuffHaler™ и устройства для вакцинации от гриппа при помощи назального спрея.

В соответствии с шестнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения, композиция LAIV может быть приготовлена для применения в способе ослабления при возникновении или предотвращения возникновения патологического состояния здоровья, включающего в себя инфекцию вируса гриппа А или его подтипов, как раскрыто ранее в описанном варианте осуществления настоящего изобретения, инфекцию вируса гриппа В или его подтипов, как раскрыто в ранее описанном варианте осуществления настоящего изобретения, или инфекцию вируса гриппа С, или его подтипов, как раскрыто в ранее описанном варианте осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с семнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения композиция LAIV может вводиться интраназально в дозе, эффективной для защиты. Вакцины вводятся способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое будет профилактически эффективным. Иммуногенная композиция настоящего изобретения может вводиться в качестве первичных профилактических средств взрослым или детям, подверженным риску инфицирования. Например, описанная здесь композиция живой аттенуированной вакцины против гриппа может применяться у взрослых или детей с риском инфицирования вирусом гриппа.

Более предпочтительно композиция LAIV может вводиться интраназально в дозе объемом от примерно 0,1 до 0,5 мл.

В соответствии с восемнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения, композиция LAIV может быть получена в виде флаконов с одной дозой или флаконов с несколькими дозами, или набора с несколькими дозами, или в виде предварительно заполненных шприцев или назальных спреев, где указанная композиция LAIV может вводиться по схеме с однократной дозой, или предпочтительно по схеме с множественными дозами, при которой за первичным курсом вакцинации следует 1-2 отдельные дозы, вводимые с последующими интервалами времени, необходимыми для поддержания и/или усиления иммунного ответа, например, через 1-4 месяца для второй дозы, и если необходимо, последующие дозы вводятся через несколько месяцев или лет или при ежегодной вакцинации. Схема приема также, по меньшей мере, частично будет определяться необходимостью бустерной дозы, необходимой для создания защитного иммунитета.

В соответствии с девятнадцатым вариантом осуществления настоящего изобретения конечное значение pH иммуногенной композиции может составлять от 6,5 до 8.

Другие варианты осуществления, раскрытые здесь, также включают в себя набор вакцин, содержащий первый контейнер, содержащий лиофилизированную (сублимированную) иммуногенную композицию, и второй контейнер, содержащий водный раствор, необязательно физиологический раствор или ВДИ (воду для инъекций), для восстановления лиофилизированной (сублимированной) композиции LAIV.

В данном описании термин «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, и он может означать «включает в себя», «включающий в себя», этот термин является неограниченным, что допускает наличие большего, чем то, что перечисляется до тех пор, пока основные или новые характеристики того, что

перечислено, не изменяются наличием чего-то большего, чем то, что перечислено, но исключают варианты предшествующего уровня техники.

В данном описании термин «иммуногенная композиция» включает в себя любую композицию, которая вызывает иммунный ответ против представляющего интерес антигена или иммуногена, экспрессируемого из векторов; например, после введения субъекту вызывает иммунный ответ против целевого иммуногена или представляющего интерес антигена. Термины «вакцинная композиция» и «вакцина» включают в себя любую композицию, которая индуцирует защитный иммунный ответ против представляющего интерес антигена, или которая эффективно защищает от этого антигена; например, после введения или инъекции субъекту вызывает защитный иммунный ответ против целевого антигена или иммуногена или обеспечивает эффективную защиту против антигена или иммуногена, экспрессируемого из векторов.

Использование термина «один или несколько» или «по меньшей мере, один» предполагает использование одного или нескольких элементов, ингредиентов или количеств, поскольку использование может быть в варианте осуществления изобретения для достижения одной или нескольких желаемых целей или результатов. Хотя были описаны определенные варианты осуществления изобретения, эти варианты осуществления изобретения представлены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема изобретений. Вариации или модификации композиции настоящего изобретения в пределах объема изобретения могут быть сделаны специалистами в данной области техники после ознакомления с описанием настоящего изобретения. Такие вариации или модификации полностью соответствуют сущности настоящего изобретения.

Числовые значения, приведенные для различных физических параметров, размеров и количеств, являются только приблизительными значениями, и предполагается, что значения, превышающие числовое значение, присвоенное физическим параметрам, размерам и количествам, попадают в объем изобретения, если в описании не указано иное.

Аналогичным образом, компоненты, используемые при очистке, например фильтры, колонки, не предназначены для того, чтобы каким-либо образом ограничивать или исключать другие решения, и могут быть заменены другими компонентами для достижения той же цели по усмотрению практического специалиста в данной области техники.

Хотя в данном описании значительный акцент сделан на отличительных признаках предпочтительного варианта осуществления изобретения, следует принимать во внимание, что может быть добавлено множество дополнительных признаков, и что в предпочтительный вариант осуществления изобретения можно внести множество изменений без отступления от принципов настоящего изобретения. Эти и другие

изменения в предпочтительном варианте осуществления изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из настоящего описания, при этом необходимо четко понимать, что вышеизложенное описание следует интерпретировать просто как иллюстрацию настоящего изобретения, а не как его ограничение.

Технические преимущества:

1. В настоящее время почти все производимые вакцины против гриппа используют яйца в качестве хозяина для получения пула вирусов. Использование яиц для производства LAIV имеет определенные недостатки, которые можно преодолеть, используя в качестве субстратов культуру клеток. Использование яиц в качестве субстрата имеет следующие ограничения:

- Ограничение в поставщиках яиц вакцинного качества и яиц, свободных от патогенной микрофлоры.

- Требуется предварительный заказ минимум за 4 месяца до того, как яйца станут доступны.

- Некоторые из пандемических штаммов-кандидатов вызывают смертельную инфекцию у домашней птицы, в результате чего субстрат (яйца) недоступен для производства вакцины.

- Производство яиц требует специализированного оборудования для инкубации, сбора яиц и т.д., что, в свою очередь, ограничивает возможности для быстрого масштабирования.

2. Производство на основе культуры ткани имеет преимущество полностью контролируемой системы с легкостью масштабирования.

3. В случае пандемии производство вакцины в крупных масштабах может быть легко достигнуто с использованием уже существующих единиц производства культур тканей для других вирусных вакцин.

4. Вирус, полученный в культурах клеток, имеет большее сходство с циркулирующими штаммами, в отличие от вируса, продуцируемого в яйцах, который может иметь антигенные модификации.

5. Минимум компонентов, входящих в состав вакцины.

6. Отсутствие консервантов, полимеров и поверхностно-активных веществ.

7. В процессе очистки используется низкая концентрация эндонуклеазы (бензоназы).

8. В процессе очистки отсутствуют дорогостоящие и трудоемкие этапы хроматографии.

9. Усовершенствованный способ производства такой стабильной композиции/препарата приводит к увеличению выхода.

10. Интраназальная доставка представляет собой самый простой путь иммунизации, поскольку он не требует высокого уровня знаний, он допускает введение нескольких доз.

11. Не сообщается о связи с синдромом Гийена-Барре и обеспечивается лучшая защита, благодаря доставке в место заражения.

12. Жидкая форма вакцины, которую трудно получить, помогает преодолеть проблему ограниченной способности к лиофилизации, необходимости разбавителей для восстановления и дополнительных этапов восстановления, необходимых перед введением вакцины.

13. Основа MDV, используемая для создания реассортантов LAIV, имеет хорошо установленный профиль безопасности и, как сообщается, обеспечивает высокий уровень защиты.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приводятся для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что композиции и методы, раскрытые в примерах, которые следуют ниже, представляют собой методы, для которых авторами настоящего изобретения было установлено, что они хорошо функционируют при реализации настоящего изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие предпочтительных способов его осуществления. Однако специалисты в данной области техники должны, в свете настоящего раскрытия, принять во внимание, что многие изменения могут быть внесены в конкретные раскрытые варианты осуществления изобретения с получением сходного или аналогичного результата, не выходя за рамки сущности и объёма настоящего изобретения.

Реассортантный штамм LAIV приобретался в Институте экспериментальной медицины (ИЭМ), Санкт-Петербург, Россия, или в сотрудничающих с ВОЗ центрах, таких как Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC), Атланта.

Пример 1: Данные о стабильности иммуногенной композиции реассортантного вируса LAIV

Компонент 1 - вирус живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV)

Вакцинный вирус гриппа представляет собой реассортантный вирус LAIV, полученный классическим методом реассортации, включающий в себя генные сегменты, отвечающие за адаптацию к холоду, чувствительность к температуре и/или ослабленный фенотип, из основных донорных вирусов (MDV) и генные сегменты гемагглютинина (HA) и/или нейраминидазы (NA) из штаммов дикого типа пандемического или сезонного вируса гриппа типа А, В или С в соотношении 6:2 или 7:1.

Таблица 1: Реассортантный штамм вируса LAIV, используемый в иммуногенной композиции			
№ п.п.	Подтип вируса гриппа	Реассортантный штамм LAIV	MDV
1	Тип А-Н5N2	A/17/turkey/Turkey/05/133	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)
2	Тип А-Н7N9	A/17/Anhui/2013/61	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)
3	Тип А-Н1N1	A/17/California/2009/38	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)
4	Тип А-Н1N1	A/17/New York/15/5364	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)
5	Тип А-Н1N1	A/South-Africa/3626/2013- CDC- LV14A	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)
6	Тип А-Н3N2	A/17/Hong-Kong/2014/8296	A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)
7	Тип В линия Victoria	B/Texas/02/2013-CDC- LV8B	B/USSR/60/69
8	Тип В линия Yamagata	B/Phuket/3073/2013	B/USSR/60/69
9	Тип В линия Victoria	B/56/Brisbane/60/08	B/USSR/60/69

Для иммуногенной композиции LAIV:

Вирус типа А в диапазоне от 6 до 7 log EID₅₀/доза 0,5 мл; более предпочтительно 7 log EID₅₀/доза 0,5 мл.

Вирус типа В в диапазоне от 6 до 7 log EID₅₀/доза 0,5 мл; более предпочтительно 6,5 log EID₅₀/доза 0,5 мл.

Композиция LAIV является либо моновалентной, либо мультивалентной (двухвалентной; трехвалентной; четырехвалентной) по реассортантному штамму вируса LAIV, используемого в иммуногенной композиции, из перечисленных в Таблице 1, в любой их комбинации.

**Таблица - 2А: Стабилизирующая композиция в соответствии
с настоящим изобретением**

№	Компоненты рецептуры	[мас./об.% на дозу 0,5 мл]			
		1	2	3	4
1	Желатин	0,85	0,85	1,0	1,0
2	Сахароза	4,0	-	-	-
3	L-гистидин	0,21	0,21	0,21	0,21
4	L-аланин	0,1	0,1	0,1	0,1
5	Трицин	0,3	0,3	0,3	0,9
6	L-аргинина гидрохлорид	2,1	2,1	1,6	1,6
8	Сорбит	-	5,0	5,0	5,0
9	SAF	-	-		

**Таблица - 2В: Состав вспомогательного вещества в соответствии
с настоящим изобретением**

№ п.п.	Вспомогательное вещество	% мас./об. на дозу 0,5 мл
1	Хлорид натрия	0,8
2	Хлорид калия	0,02
3	Фосфат дигидрата калия	0,02
4	Дигидрат динатрия гидрофосфата	0,14

**Таблица - 3А: Данные о стабильности в реальном времени
при 2-8°C в течение 6 месяцев (М)**

№ п.п.	Штамм	Log EID ₅₀ /0.5 мл					Коэффициент деградации
		0 День	1 М	2 М	3 М	6 М	
	Стабилизирующая композиция 3						
1	A/17/California/2009/38 (H1N1)	7,92	8,245	7,89	7,69	6,72	-0,47
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	7,39	6,82	6,99	6,92	5,93	-0,51
	Стабилизирующая композиция 4						
1	A/17/California/2009/38 (H1N1)	8,2	7,99	7,87	7,89	6,95	-0,45
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	7,25	6,75	6,65	6,92	5,93	-0,46
	Стабилизирующая композиция 2						
1	A/SouthAfrica/3626/13 (H1N1)	7,88	7,82	7,65	7,06	7	-0,4
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	8,2	7,04	6,72	6,78	6,39	-0,73
	Стабилизирующая композиция 1						
1	A/SouthAfrica/3626/13 (H1N1)	7,96	7,86	7,75	7,56	7,3	-0,27
2	B/Texas/02/13-CDC-LV8B (Тип В)	7,56	7,21	7,15	7,14	6,87	-0,26
3	A/17/turkey/Turkey/05/133(H5N2)	7,96	7,93	7,76	7,52	7,12	-0,34
4	A/17/Anhui/2013/61(H7N9)	7,89	7,68	7,78	7,43	7,2	-0,27

**Таблица - 3В: Данные о стабильности
в стрессовых условиях при 37°C в течение 7 дней (D)**

№ п.п.	Штамм	Log EID ₅₀ /0.5 мл						Коэффициент деградации
		0 День	1 D	2 D	3 D	5 D	7 D	
	Стабилизирующая композиция 3							
1	A/17/California/2009/38 (H1N1)	7,92	7,79	7,48	7,03	6,39	4,76	-1,095
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	7,39	6,96	6,76	6,64	5,47	4,88	-0,952
	Стабилизирующая композиция 4							
1	A/17/California/2009/38 (H1N1)	8,2	7,76	7,33	7,35	6,56	5,39	-0,98
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	7,25	6,99	6,93	6,49	5,85	4,92	-0,84
	Стабилизирующая композиция 2							
1	A/SouthAfrica/3626/13 (H1N1)	8,03	7,77	7,26	6,8	6,2	4,44	-1,25
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	8,25	7,18	6,05	5,43	5,06	3,98	-1,62
	Стабилизирующая композиция 1							
1	A/SouthAfrica/3626/13 (H1N1)	8,31	7,82	7,06	7,16	6,73	6,02	-0,83
2	B/Texas/02/13-CDC (Тип В)	7,03	6,98	6,56	6,18	5,72	5,05	-0,76
3	A/17/turkey/Turkey/05/133(H5N2)	7,96	7,62	7,24	6,83	6,15	5,43	-0,96

Интерпретация:

Стабилизирующая композиция 3 (1% мас./об. Желатина + 5% мас./об. Сорбита + 0,1% мас./об. L-аланина + 0,21% мас./об. L-гистидина + 0,3% мас./об. Трицина + 1,6% мас./об. L-Аргинина гидрохлорида):

Неприемлемый коэффициент деградации наблюдался как для стабильности в стрессовых условиях при температуре 37°C, так и для стабильности в реальном времени при температурах от 2 до 8°C для вакцинных штаммов вируса гриппа типа A/H1N1 и типа В. (См. фигуры 4 и 5).

Стабилизирующая композиция 4 (1% мас./об. Желатина + 5% мас./об. Сорбита + 0,1% мас./об. L-аланина + 0,21% мас./об. L-гистидина + 0,9% мас./об. Трицина + 1,6% мас./об. L-Аргинина гидрохлорида):

Неприемлемый коэффициент деградации наблюдался как для стабильности в стрессовых условиях при температуре 37°C, так и для стабильности в реальном времени

при температурах от 2 до 8°C для вакцинных штаммов вируса гриппа типа A/H1N1 и типа B. (См. Фигуры 6 и 7).

Стабилизирующая композиция 2 (0,85% мас./об. Желатина + 3% мас./об. Сахарозы + 0,1% мас./об. L-аланина + 0,21% мас./об. L-гистидина + 0,3% мас./об. Трицина + 2,1% мас./об. L-Аргинина гидрохлорида):

Неприемлемый коэффициент деградации наблюдался как для стабильности в стрессовых условиях при температуре 37°C, так и для стабильности в реальном времени при температурах от 2 до 8°C. (См. Фигуры 8 и 9).

Стабилизирующая композиция 1 (0,85% мас./об. Желатина + 4% мас./об. Сахарозы + 0,1% мас./об. L-аланина + 0,21% мас./об. L-гистидина + 0,3% мас./об. Трицина + 2,1% мас./об. L-Аргинина гидрохлорида):

Приемлемый коэффициент деградации (значения находятся в приемлемом диапазоне) наблюдался как для стабильности в стрессовых условиях при температуре 37°C, так и для стабильности в реальном времени при температурах от 2 до 8°C. (См. Фигуры 2, 3, 10 и 11).

Пример 2: Способ получения вируса LAIV на основе клеток MDCK

Способ получения композиции LAIV на основе культуры клеток MDCK может включать в себя любую подгруппу или все следующие этапы:

к) Вирус-кандидат для вакцины LAIV первоначально пассируют в свободных от патогенной микрофлоры (SPF) куриных яйцах с эмбрионом с получением исходного вакцинного вируса (MSV) на основе яиц.

l) Исходный вакцинный вирус на основе яиц адаптирован для роста в культуре клеток-хозяев MDCK (ATCC CCL-34) для получения рабочего посевного вируса (WSV) на основе клеток. Этот WSV на основе клеток используется для заражения культуры клеток MDCK при МЗ от 1:100 до 1:10000 в различных сосудах/системах для культивирования клеток, таких как колбы для культивирования тканей (TCF) с площадью поверхности 175 см², роллерные флаконы (RB) с площадью поверхности 850 см², клеточные фабрики (CF) с площадью поверхности 6320 см² и биореактор с неподвижным слоем (например, биореакторы iCELLis® от Pall® Life Sciences, Порт Вашингтон, штат Нью-Йорк, такие как биореакторы Nano и 500/100). (Клетки MDCK выращивали с использованием MEM, содержащей ФБС; перед инокуляцией промывали MEM, содержащей трипсин от 5 до 25 Ед./мл; WSV инокулировали в клетки при МЗ от 1:10 до 1:10000 и инкубировали при температуре 31-33°C в течение 48-72 часов).

m) Сбор культивированного вируса.

n) Собранный вирус фильтруют путем проточной фильтрации (DFF), по меньшей мере, через один фильтр очистки для получения очищенных вирусных пулов (CVP).

о) CVP обрабатывают неспецифичной эндонуклеазой (например, бензоназой) при температуре от 30 до 34°C в течение 2-6 часов, а затем при температуре от 2 до 8°C в течение 5-15 часов для.

р) Концентрирование обработанных эндонуклеазой CVP при помощи тангенциальной поточной фильтрации (TFF) с использованием мембраны с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) 100-500 кДа.

q) Стабилизация полученного с помощью TFF концентрата стабилизирующей композицией, содержащей один или несколько углеводов, одну или несколько аминокислот и желатин, с образованием стабилизированного вирусного продукта.

г) Стерилизация стабилизированного полученного с помощью TFF концентрата с помощью DFF, по меньшей мере, через один стерилизационный фильтр, имеющий размер пор примерно 0,2 микрометра, для получения пула стерилизованного очищенного моновалентного вируса (CMVP).

с) Стерилизованные CMVP хранят в поликарбонатных бутылках при температуре - 60°C или ниже.

т) Стерилизованные препараты разливают во флаконы и хранят при температуре 2-8°C.

Таблица 4: Параметры роста клеток MDCK

Система роллерных флаконов		Система биореактора iCELLis	
Плотность посева клеток	15X10 ⁶ /RB	Плотность посева клеток	1000X10 ⁶
Плотность сливающихся клеток	150X10 ⁶ /RB	Плотность сливающихся клеток	8000X10 ⁶
pH	7,2±0,2	pH	7,2±0,2
DO	н.д.	DO	75%
Температура	37°C±1°C	Температура	37°C±1°C
Продолжительность инкубации	3-5 дней	Продолжительность инкубации	3-5 дней

Таблица 5: Параметры роста реассортантного вируса LAIV

Система роллерных флаконов		Система биореактора iCELLis	
M3	от 1:100 до 1:10000	M3	от 1:100 до 1:10000
Плотность клеток на момент инфицирования	150X10 ⁶ /RB	Плотность клеток на момент инфицирования	8000X10 ⁶
pH	7,4±0,2	pH	7,4±0,2
DO	н.д.	DO	50%
Температура	32°C±1°C	Температура	32°C±1°C
Продолжительность инкубации/Период сбора	Один сбор через 54±6 часов	Продолжительность инкубации/Период сбора	Один сбор через 54±6 часов

• Среда для культивирования клеток (СМ): МЕМ с 10% ФБС (значение pH доведено 1 н. HCl до 7,0–7,4) (дополнительный глутамин 350 мг/л).

• Вирусная среда (VM): МЕМ без ФБС (значение pH доведено 1 н. HCl до 7,2–7,6)(дополнительная глюкоза - 500 мг/л, глутамин - 350 мг/л).

Дополнительные 0,4% глюкозы добавляли в СМ и VM, используемые для системы биореактора.

Таблица 6: МЕМ (минимальная питательная среда)		
№ п.п.	Компоненты	МЕМ с солями Хэнкса (мг/л)
1	L-аргинина гидрохлорид	126
2	L-цистеин 2HCL	31
3	L-глутамин	292
4	L-гистидин HCl.H ₂ O	42
5	L-изолейцин	52
6	L-лейцин	52
7	L-лизина гидрохлорид	73
8	L-метионин	15
9	L-фенилаланин	32
10	L-треонин	48
11	L-триптофан	10
12	L-валин	46
13	L-тирозин. Динатриевая соль	52
14	Хлорид кальция	140
15	Сульфат магния	98
16	Хлорид калия	400
17	Хлорид натрия	8000
18	Одноосновный фосфат калия (безводный)	60
19	Двухосновный фосфат натрия	48
20	Холинхлорид	1
21	D-пантотенат кальция	1
22	Фолиевая кислота	1
23	I-инозитол	2
24	Ниацинамид	1
25	Пиридоксаль HCl	1
26	Рибофлавин	0,1
27	Тиамин HCl	1
28	D-глюкоза	1000
29	Феноловый красный	10
30	NaHCO ₃ 1,3 г/л для среды с ФБС	
31	NaHCO ₃ 0,75 г/л для среды без ФБС	

Таблица 7: Состав фосфатно-солевого буфера (ФСБ)		
Компонент	Количество на 1 л	Концентрация (%)
Хлорид натрия	8 г	0,8
Хлорид калия	0,2 г	0,02
Дигидрат фосфата калия	0,2 г	0,02
Дигидрат динатрия гидрофосфата	1,4 г	0,14

Таблица 8: Стабилизирующая композиция-I для LAIV на основе клеток MDCK		
Компонент	Количество на 1 л	Концентрация (%)
Желатин	42,5 г	4,25
Сахароза	200 г	20

Таблица 9: Стабилизирующая композиция-II для LAIV на основе клеток MDCK		
Компонент	Количество на 1 л	Концентрация (%)
L-гистидин	23,1 г	2,31
L-аланин	11,0 г	1,1
Трицин	33,0 г	3,3
L-аргинин	231 г	23,1
Желатин	8,5 г	0,85
Сахароза	40 г	4,0

Таблица 10: Слепая композиция вакцины	
Компонент	Количество на 1,1 л
ФСБ	0,8 л
Стабилизирующая композиция I для жидкой LAIV на основе культуры клеток MDCK	0,2 л
Стабилизирующая композиция II для жидкой LAIV на основе культуры клеток MDCK	0,1 л

Пример 3: Влияние исходного количества вируса (МЗ) и периода инкубации после инокуляции на выход

Таблица 11: Влияние исходного количества вируса (МЗ) и периода инкубации после инокуляции на выход									
Тип А (H1N1) - A/17/California/2009/38									
Используемая МЗ	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
Период инкубации (ч)	50±2	50±2	50±2	60±2	60±2	60±2	70±2	70±2	70±2
Титр (EID ₅₀ /0,5мл)	8,43	8,21	5,48	8,35	8,44	7,27	8,40	7,95	7,89
Тип А (H3N2) - A/17/Hong Kong/2014/8296									
Используемая МЗ	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
Период инкубации (ч)	50±2	50±2	50±2	60±2	60±2	60±2	70±2	70±2	70±2
Титр (EID ₅₀ /0,5мл)	8,43	7,93	7,36	8,83	8,31	8,30	8,17	8,27	8,65
Тип В - B/Texas/02/2013-CDC-LV8B									
Используемая МЗ	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
Период инкубации (ч)	50±2	50±2	50±2	60±2	60±2	60±2	70±2	70±2	70±2
Титр (EID ₅₀ /0,5мл)	7,69	8,03	7,92	8,01	8,15	8,15	7,72	8,14	8,10

Выводы:

А. Время инфицирования:

На основе исследований по оптимизации был выбран конкретный предел количества клеток от 120 до 180 миллионов клеток на роллерный флакон и от 7000 до 10000 миллионов клеток для биореакторной системы для инфицирования рабочим посевным вирусом гриппа, полученным из клеток MDCK. Перед процедурой инфицирования проводили микроскопическое наблюдение за роллерными флаконами с клетками MDCK на конфлюэнтность монослоя.

В. МЗ и период инкубации после инокуляции:

На основе всех наблюдений по оптимизации МЗ диапазон МЗ, выбранный для вирусов гриппа типа А (H1N1), типа А (H3N2) и типа В, составлял от 1:100 до 1:10000, а диапазон периода инкубации после инокуляции составлял от 48 до 72 часов.

Пример 4: Влияние различных концентраций трипсина на выход

Таблица 12: Различные концентрации трипсина		
№ п.п.	Единицы трипсина/роллерный флакон	EID ₅₀ /0,5 мл
1	5000	8,6
2	4000	8,72
3	3000	8,85
4	2000	8,85
5	1000	8,67
6	00	6,65

Вывод:

Трипсин необходим для активации вируса гриппа для инокуляции клеток MDCK. Из приведённых выше результатов видно, что от 2000 до 3000 единиц трипсина на роллерный флакон обеспечивают максимальную активность вируса.

Пример 5: Влияние концентрации бензоназы и температуры на содержание клеточной ДНК и титр вируса

Различные концентрации бензоназы для деградации ДНК клетки-хозяина были протестированы при разных температурах. Очищенный вирусный пул (CVP) подвергали обработке бензоназой в концентрациях 500 (с 2 мМ MgCl₂), 500, 1000, 2500 и 5000 Ед./л, и обработанные CVP выдерживали при температуре 32°C в течение 3 часов и затем продолжали инкубировать при 2-8°C в течение ночи. Отбор образцов проводили на каждом этапе, и ниже приведены результаты содержания ДНК на каждом этапе.

Таблица 13: Штамм гриппа: B/60/Phuket/2013/16 (Тип В)		
Содержание ДНК (нг/мл)		
Концентрация бензоназы (Ед./л)	3 ч при 32°C	В течение ночи при 2-8°C
Без обработки	4919	4919
500 (2мМ MgCl ₂)	13,75	7,6

Таблица 14: Штамм гриппа: B/60/Phuket/2013/16 (Тип В)		
Содержание ДНК (нг/мл)		
Концентрация бензоназы (Ед./л)	3 ч при 32°C	В течение ночи при 2-8°C
Без обработки	4919	4919
500	353,6	22,45
1000	56,45	9,45
2500	11,3	9,15
5000	6,2	8,8

Вывод:

По результатам было обнаружено, что CVP, обработанный бензоназой с концентрацией 500 Ед./л в присутствии 2 мМ $MgCl_2$, показал более высокую деградацию ДНК, чем CVP, обработанный бензоназой с концентрацией 500 Ед./л без 2 мМ $MgCl_2$. Также видно, что более высокие концентрации бензоназы 1000 Ед./л, 2500 Ед./л и 5000 Ед./л демонстрировали сравнимую деградацию ДНК с концентрацией бензоназы 500 Ед./л (с 2 мМ $MgCl_2$).

Пример 6: Выход вирусов на различных этапах получения

Таблица 15: Выход вирусов на различных этапах получения			
Этапы процесса	Титр ($EID_{50}/0,5ml$)		
	Тип А (H1N1) A/17/California/2009/38	Тип А (H3N2) A/17/Hong Kong/2014/8296	Тип В B/Texas/02/2013- CDC-LV8B
Собрано	9,04	8,55	8,49
Очищенный вирусный пул (CVP)	8,74	8,54	8,50
Обработанный бензоназой CVP	8,63	8,42	8,22
Вирусный концентрат	9,02	8,89	8,68
Нефасованная вакцина (CMVP)	8,93	8,56	8,71

1. CVP: Очищенный вирусный пул (сбор после фильтрации),
2. BCVP: CVP, обработанный бензоназой,
3. CMVP: пул очищенного моновалентного вируса (после TFF, добавление стабилизатора и фильтрация после 0,2 мкм).

Вывод:

Концентрация вируса на каждом этапе проверялась для каждого вируса сезонного гриппа типа А (H1N1), типа А (H3N2) и типа В, и было установлено, что исходная концентрация вируса на уровне сбора сохранялась на протяжении всего процесса до последнего этапа, т.е. получения нефасованной вакцины (CMVP).

Таблица 16: Среднее извлечение вируса						
№ п.п.	Штамм	Сбор		CMVP		Процент извлечения (%)
		Титр вируса (Log EID ₅₀ /0,5 мл)	Объём (мл)	Титр вируса (Log EID ₅₀ /0,5 мл)	Объём (мл)	
1	A/17/Hongkong/2014/8296 (H3N2)	8,29	10000	8,68	2500	61,37
2	B/Texas/02/13-CDC-LV8B (Тип В)	8,49	8000	8,71	2300	47,71
3	A/17/California/2009/38 (H1N1)	9,04	10000	8,96	3000	24,95
% Среднее извлечение вируса						44,67

Вывод: Извлечение вируса можно рассчитать, как процент сохранения вируса во время производства, где сбор вируса является отправной точкой, а CMVP - конечной точкой производства. Из результатов можно сделать вывод, что среднее извлечение вируса составляет 44,67%, что эквивалентно потере титра 0,34 Log EID₅₀/0,5 мл. Также наблюдалось, что конечное извлечение вируса (титр вируса) на уровне CMVP находилось в допустимых пределах, и CMVP можно использовать для производства конечных партий продукта вируса LAIV на основе MDCK.

Пример 7: Сравнительные данные по концентрации ДНК клетки-хозяина на этапах получения CMVP

Очищенный вирусный пул (CVP) различных штаммов подвергали обработке бензоназой и проводили поэтапный отбор образцов на содержание ДНК. Ниже приведены результаты содержания ДНК на каждом этапе.

Таблица 17: Концентрация ДНК клетки-хозяина (нг/мл)					
№ п.п.	Штамм	Поэтапное содержание ДНК клетки-хозяина (нг/мл)			
		CVP	Бенз-CVP	TFF Конц.	CMVP
1	A/17/California/2009/38 (H1N1)	4565	14,28	50,54	11,03
2	A/17/Hongkong/2014/8296 (A/H3N2)	5537	14,35	60,56	12,71
3	B/60/Phuket/2013/16 (Тип В)	6467	10,45	31,12	3

Вывод:

По результатам было обнаружено, что CVP при обработке бензоназой показывал значительное снижение ДНК. Кроме того, было установлено, что остаточная ДНК снова эффективно удаляется во время процесса TFF (диафильтрация/концентрирование) и процесса получения CMVP. Содержание ДНК на уровне конечного CMVP находится в желаемых и приемлемых пределах.

Пример 8: Различные испытания экспериментов TFF

Различные эксперименты по TFF проводили с учетом таких параметров, как среда для разбавления, используемая для процесса TFF (вирусная среда и ФСБ), диафильтрация и процедура концентрирования. Образцы концентрата TFF были протестированы на концентрацию вируса.

Таблица 18: Эксперименты с TFF						
Код эксперимента	Параметры процесса TFF				Титр вируса (EID ₅₀ /0,5 мл)	
	Используемая среда разбавления	Диафильтрация (DF)	Конц. (C)	Последовательность DF и Конц.	Сбор Титр (EID ₅₀ /0,5мл)	TFF Конц. Титр (EID ₅₀ /0,5мл)
Экс-т.1 (A/Cal)	VM	3X	4X	Конц. затем DF	8,94	8,07
Экс-т.2 (A/Cal)	VM	3X	4X	DF затем Конц.	8,67	8,48
Экс-т.3 (A/Cal)	VM	-	4X	Только Конц.	8,97	8,61
Экс-т.4 (B/Tex)	ФСБ	2X	4X	DF затем Конц.	8,49	8,79
Экс-т.5 (A/HK)	ФСБ	2X	4X	DF затем Конц.	8,79	8,83

A/Cal: A/17/California/2009/38;

B/Tex = B/Texas/02/2013-CDC-LV8B;

A/HK = A/17/Hong Kong/2014/8296;

VM: Вирусная среда

Интерпретация:

Из вышеупомянутой серии экспериментов был выбран процесс TFF, за которым следовал этап 2X DF и 4X концентрации, чтобы получить желаемый концентрат TFF с оптимальным выходом вируса. По сравнению с VM, ФСБ дает лучшую стабильность вирусу.

Пример 9: Результаты иммуногенности

Было проведено исследование для оценки характеристик трехвалентных и четырехвалентных вакцин против сезонного гриппа на основе яиц и культур клеток MDCK

по показателям иммунного ответа и эффективности вакцин на модели хорьков. Всех животных интраназально иммунизировали в день 0 трехвалентным или четырехвалентным препаратом на основе яиц и культур клеток MDCK, содержащим штаммы, подобные A/ Michigan/45/2015 (H1N1), A/Hong Kong/4801/2015 (H3N2), B/Brisbane/60/2008 и B/Phuket/3073/2013, и животных заражали через четыре недели (день 28).

Таблица 19: Среднее геометрическое ингибирование гемагглютинации (HAI) и титры нейтрализации (NT) сывороток, собранных в 28 день

	A/Michigan/ 45/2015		A/Hongkong/4801/ 2014		B/Brisbane/ 60/2008		B/Phuket/ 3073/2013	
Препарат вакцины	HAI	NT	HAI	NT	HAI	NT	HAI	NT
Трехвалентная на основе яиц	305±76	222±66	226±84	323±148	190±69	150±95	6±1	12±1
Четырехвалентная на основе яиц	288±87	183±137	312±90	527±214	125±32	162±39	133±40	323±114
Трехвалентная на основе MDCK	411±114	415±185	452±71	725±192	315±74	333±112	5±0	12±0
Четырехвалентная на основе MDCK	234±70	140±72	214±108	304±236	152±49	148±77	134±37	256±78
Плацебо	10±2	13±1	5±0	13±1	5±0	12±0	6±1	12±1

Вывод: (см. фигуры 12 и 13)

Был сделан вывод, что вакцинация трехвалентными и четырехвалентными вакцинами на основе яиц и MDCK, содержащими A-H1N1, может защитить животных от инфекции A-H1N1 при заражении вирусами, гомологичными A-H1N1.

Другое исследование было предпринято для оценки характеристик моновалентных LAIV (A-H5N2 и A-H7N9) на основе яиц и клеток MDCK по показателям иммунного ответа и эффективности на модели хорьков. Различные группы животных иммунизировали моновалентными LAIV (A-H5N2 и A-H7N9) на основе яиц и культуры клеток MDCK и заражали вирусами, гомологичными A-H5N1 и A-H7N9, соответственно. Результаты показали, что животные, иммунизированные моновалентной H5N2 LAIV, были защищены от заражения вирусом, гомологичным A-H5N1. Животные, иммунизированные моновалентной A-H7N9 LAIV, были защищены от заражения вирусом, гомологичным A-H7N9.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенная композиция, содержащая:

- a) Один или несколько вирусов гриппа;
- b) Один или несколько углеводов;
- c) Одну или несколько аминокислот; и
- d) Желатин.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что вирус гриппа включает в себя вирус пандемического или сезонного гриппа, вирус живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV), инактивированный вирус гриппа, химерный вирус гриппа или рекомбинантный вирус гриппа.

3. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция является моновалентной по вирусу гриппа, полученному из гриппа типа А или типа В, или типа С, или его подтипов.

4. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция является поливалентной по вирусу гриппа, полученному из гриппа типа А или типа В, или типа С, или его подтипов.

5. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что вирус гриппа представляет собой реассортантный вирус LAIV, содержащий генные сегменты, отвечающие за адаптацию к холоду, чувствительность к температуре и/или ослабленный фенотип из основных донорных вирусов (MDV) и генные сегменты гемагглютиниона (HA) и/или нейраминидазы (NA) из штаммов вируса дикого типа пандемического или сезонного гриппа А или В, или С в соотношении 1:7, 2:6, 3:5, 4:4, 5:3, 6:2 или 7:1.

6. Иммуногенная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что основной донорный вирус (MDV) выбран из группы, включающей в себя штамм гриппа А A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), штамма гриппа В B/USSR/60/69.

7. Иммуногенная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что реассортантный вирус LAIV содержит ген гемагглютиниона (HA) и/или ген нейраминидазы (NA) из вируса гриппа А или H1-H18 и N1-N11 и его подтипов H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H5N3, H9N2, H7N1, H7N3, H7N7, H6N1, H7N9 или H10N8.

8. Иммуногенная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что реассортантный вирус LAIV содержит ген гемагглютиниона (HA) и/или ген нейраминидазы (NA) из штамма pdmH1N1 вируса гриппа А - A/California/07/2009 (называемого A/Cal)-подобного штамма или A/Cal, A/Michigan/45/2015-подобного штамма, A/South-Africa/3626/2013-подобного штамма или H3N2-A/HongKong/4801/2014-подобного штамма.

9. Иммуногенная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что реассортантный вирус LAIV содержит ген гемагглютинина (HA) и/или ген нейраминидазы (NA) из штамма вируса гриппа В, подобного штамму вируса гриппа В линии Victoria B/Brisbane/60/2008 или подобного штамму вируса гриппа В линии Yamagata B/Phuket/3073/2013.

10. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что один или несколько углеводов выбраны из группы, состоящей из природного углевода, синтетического углевода, моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов, олигосахаридов, восстанавливающего сахара, невосстанавливающего сахара, сахарных спиртов, полиола, полигидроксильных соединений, химически модифицированных углеводов, агентов, способствующих стеклованию, где агенты, способствующие стеклованию, выбраны из группы, состоящей из сахарозы, маннита, маннозы, рафинозы, лактита, лактобионовой кислоты, глюкозы, мальтулозы, изомальтулозы, мальтозы, лактозы, декстрозы, фукозы или их комбинации.

11. Иммуногенная композиция по п. 10, отличающаяся тем, что один или несколько углеводов включают в себя сахарозу, присутствующую в количестве от 1 до 10% (мас./об.).

12. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что одна или несколько аминокислот выбраны из группы, состоящей из трицина, лейцина, изолейцина, гистидина, глицина, глутамина, аргинина, лизина, аланина или их комбинации.

13. Иммуногенная композиция по п. 10, отличающаяся тем, что одна или несколько аминокислот включают в себя трицин, присутствующий в количестве от 0,1% до 2% (мас./об.), гистидин, присутствующий в количестве от 0,1% до 2% (мас./об.), аланин, присутствующий в количестве от 0,01% до 1% (мас./об.) и аргинин, присутствующий в количестве от 0,1% до 5% (мас./об.).

14. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что желатин присутствует в количестве от 0,1% до 5% (мас./об.).

15. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит адъювант, выбранный из группы, состоящей из гидроксида алюминия, фосфата алюминия, гидроксифосфата алюминия и сульфата алюминия калия или их смеси.

16. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит иммуностимулирующий компонент, выбранный из группы, состоящей из масляной и водной эмульсии, MF-59, липосомы, липополисахарида, сапонины, липида А, производных липида А, монофосфориллипида А, 3-деацилированного монофосфориллипида А, AS01, AS03, олигонуклеотида, олигонуклеотида, содержащего, по меньшей мере, один неметилированный CpG и/или

липосому, адъюванта Фрейнда, полного адъюванта Фрейнда, неполного адъюванта Фрейнда, адъюванта CRL-8300, мурамилдипептида, агонистов TLR-4, флагеллина, флагеллинов, полученных из грамотрицательных бактерий, агонистов TLR-5, фрагментов флагеллинов, способных связываться с рецепторами TLR-5, QS-21, ISCOMS, хитозана, комбинации сапонины со стеролами и липидами.

17. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что однодозовая композиция не содержит консерванта, а многодозовая композиция содержит один или несколько консервантов, выбранных из группы, состоящей из 2-феноксизанола, бензетония хлорида (Phemerol), фенола, тиомерсала, формальдегида, метилпарабена, пропилпарабена, бензилового спирта или их комбинации.

18. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит буфер, выбранный из хлорида натрия, карбоната, цитрата, лактата, глюконата, тартрата, фосфатно-солевого буфера, HEPES, цитрат-фосфата или ТРИС.

19. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция содержит фармацевтически приемлемый переносчик, вспомогательное вещество, связующее вещество, носитель, изотонический агент, эмульгатор или увлажнитель.

20. Иммуногенная композиция по п. 19, отличающаяся тем, что композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из сахаров, полиолов, солей, включая NaCl, KCl, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 или MgCl_2 , аминокислот или модификаторов pH.

21. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что композиция получена в виде флаконов с одной дозой или флаконов с несколькими дозами или набора с несколькими дозами, или в виде предварительно заполненных шприцев или назальных спреев для применения в способе ослабления при возникновении или предотвращения возникновения патологического состояния здоровья, включающего в себя инфекцию вируса гриппа А или его подтипов, инфекцию вируса гриппа В или его подтипов, или инфекцию вируса гриппа С или его подтипов.

22. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что конечное значение pH иммуногенной композиции составляет от 6,5 до 8.

23. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что вирус гриппа размножается в клетках Мадин-Дарби почки собаки (MDCK), выбранных без ограничения из линий клеток ATCC CCL-34, MDCK 33016 (DSM ACC 2219), MDCK (ATCC CCL34 MDCK (NBL2)), MDCK 33016 (DSM ACC 2219), DSM ACC3309, ATCC CRL-12042, ATCC PTA-7909, ATCC PTA-7910, ATCC PTA-6500, ATCC PTA-6501, ATCC PTA-6502, ATCC PTA-6503, MDCK-S, MDCK-SF101, MDCK-SF102, MDCK-SF103 и FERM BP-7449.

24. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что вирус гриппа размножается в клетках Мадин-Дарби почки собаки (MDCK) (ATCC CCL-34).

25. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся, что вирус гриппа типа В присутствует в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; более предпочтительно не менее 6,5 Log EID₅₀ на 0,5 мл.

26. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что вирус гриппа типа А присутствует в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл; более предпочтительно не менее 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл.

27. Способ получения иммуногенной композиции включающий:

а) Инфицирование культуры клеток-хозяев MDCK вирусом гриппа при МЗ от 1:100 до 1:10000

б) Сбор супернатанта, содержащего вирус гриппа, после инкубации в течение периода времени от 40 до 70 часов в MEM, содержащей трипсин в диапазоне от 5 до 25 Ед./мл;

с) Фильтрование вирусной массы путем прямоточной фильтрации (DFF) через, по меньшей мере, один фильтр очистки, имеющий размер пор от примерно 6 микрометров до примерно 0,45 микрометров;

д) Обработку CVP неспецифичной эндонуклеазой при температуре от 30 до 34°C в течение 2-6 часов, а затем при температуре от 2 до 8°C в течение 5-15 часов;

е) Концентрирование обработанного эндонуклеазой CVP при помощи тангенциальной поточной фильтрации (TFF) с использованием мембраны с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) от 100 кДа до 500 кДа;

ф) Стабилизацию концентрата TFF стабилизирующей композицией, содержащей один или несколько углеводов, одну или несколько аминокислот и желатин, с образованием стабилизированной вирусной массы;

г) Стерилизацию стабилизированного концентрата TFF с помощью DFF через, по меньшей мере, один стерилизационный фильтр, имеющий размер пор от примерно 0,8 микрометров до примерно 0,2 микрометров, с образованием стерилизованного CMVP;

где общее извлечение очищенных вирусов больше или равно 40%.

28. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (д) включает в себя обработку вирусной массы неспецифичной эндонуклеазой, в частности бензоназой, имеющей концентрацию в диапазоне от 0,5 единиц/мл до 5 единиц/мл в присутствии двухвалентного катиона, выбранного из группы, состоящей из Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ и Cu²⁺, в количестве от 0,1 mM до 100 mM.

29. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (д) включает в себя обработку вирусной массы неспецифичной эндонуклеазой, в

частности бензоназой, имеющей концентрацию в диапазоне от 0,5 единиц/мл до 5 единиц/мл в присутствии соли двухвалентного катиона Mg^{2+} в концентрации от 1 до 3 мМ.

30. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (е) включает в себя концентрирование вирусной массы при помощи тангенциальной поточной фильтрации (TFF), что приводит к, по меньшей мере, 4-кратной концентрации вирусной массы.

31. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (f) включает в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей сахарозу в концентрации от 1 до 10% (мас./об.), гистидин в концентрации от 0,1% до 2% (мас./об.), аланин в концентрации от 0,01% до 1% (мас./об.), трицин в концентрации от 0,1% до 2% (мас./об.), аргинин в концентрации 0,1 до 5% (мас./об.) и желатин в концентрации от 0,1 до 5% (мас./об.).

32. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (f) включает в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей сахарозу в концентрации от 3 до 6% (мас./об.), гистидин в концентрации от 0,1% до 1% (мас./об.), аланин в концентрации от 0,05% до 0,5% (мас./об.), трицин в концентрации от 0,1% до 0,5% (мас./об.), аргинин в концентрации 0,1 до 3% (мас./об.) и желатин в концентрации от 0,1 до 3% (мас./об.).

33. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (f) включает в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% (мас./об.) аланина, 0,3% (мас./об.) трицина, 2,1% (мас./об.) аргинин и 0,85% (мас./об.) желатина.

34. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (f) включает в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% (мас./об.) аланина, 0,3% (мас./об.) трицина, 2,1% (мас./об.) аргинина и 1,0% (мас./об.) желатина.

35. Способ получения иммуногенной композиции по п. 27, отличающийся тем, что этап (f) включает в себя стабилизацию вирусной массы с помощью стабилизирующей композиции, содержащей 4% (мас./об.) сахарозы, 0,21% (мас./об.) гистидина, 0,1% (мас./об.) аланина, 0,3% (мас./об.) трицина, 1,6% (мас./об.) аргинина и 1,0% (мас./об.) желатина.

36. Иммуногенная композиция по п. 1, отличающаяся тем, что способ введения иммуногенной композиции субъекту-человеку включает в себя интраназальное, внутримышечное, внутривенное, подкожное, чрескожное или внутрикожное введение.

37. Иммуногенная композиция, содержащая:

- а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл;
- б) сахарозу в количестве от 1 до 10% (мас./об.);
- в) гистидин в количестве от 0,1% до 2% (мас./об.);
- г) аланин в количестве от 0,01% до 1% (мас./об.);
- д) трицин в количестве от 0,1% до 2% (мас./об.);
- е) аргинин в количестве от 0,1 до 5% (мас./об.);
- ж) желатин в количестве от 0,1 до 5% (мас./об.).

38. Иммуногенная композиция по п. 37, отличающаяся тем, что композиция содержит:

- а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл;
- б) сахарозу в количестве от 3 до 6% (мас./об.);
- в) гистидин в количестве от 0,1% до 1% (мас./об.);
- г) аланин в количестве от 0,05% до 0,5% (мас. об.);
- д) трицин в количестве от 0,1% до 0,5% (мас./об.);
- е) аргинин в количестве от 0,1 до 3% (мас./об.);
- ж) желатин в количестве от 0,1 до 3% (мас./об.).

39. Иммуногенная композиция по п. 37, отличающаяся тем, что композиция содержит:

- а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл;
- б) сахарозу в количестве 4% (мас./об.);
- в) гистидин в количестве 0,21% (мас./об.);
- г) аланин в количестве 0,1% (мас./об.);
- д) трицин в количестве 0,3% (мас./об.);
- е) аргинин в количестве 2,1% (мас./об.);
- ж) желатин в количестве 0,85% (мас./об.).

40. Иммуногенная композиция по п. 37, отличающаяся тем, что композиция содержит:

- а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе не менее от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл;
- б) сахарозу в количестве 4% (мас./об.);
- в) гистидин в количестве 0,21% (мас./об.);
- г) аланин в количестве 0,1% (мас./об.);
- д) трицин в количестве 0,3% (мас./об.);

f) аргинин в количестве 2,1% (мас./об.);

g) желатин в количестве 1% (мас./об.).

41. Иммуногенная композиция по п. 37, отличающаяся тем, что композиция содержит:

а) один или несколько вирусов живой аттенуированной вакцины против гриппа (LAIV) в дозе от 6 до 7 Log EID₅₀ на 0,5 мл;

b) сахарозу в количестве 4% (мас./об.);

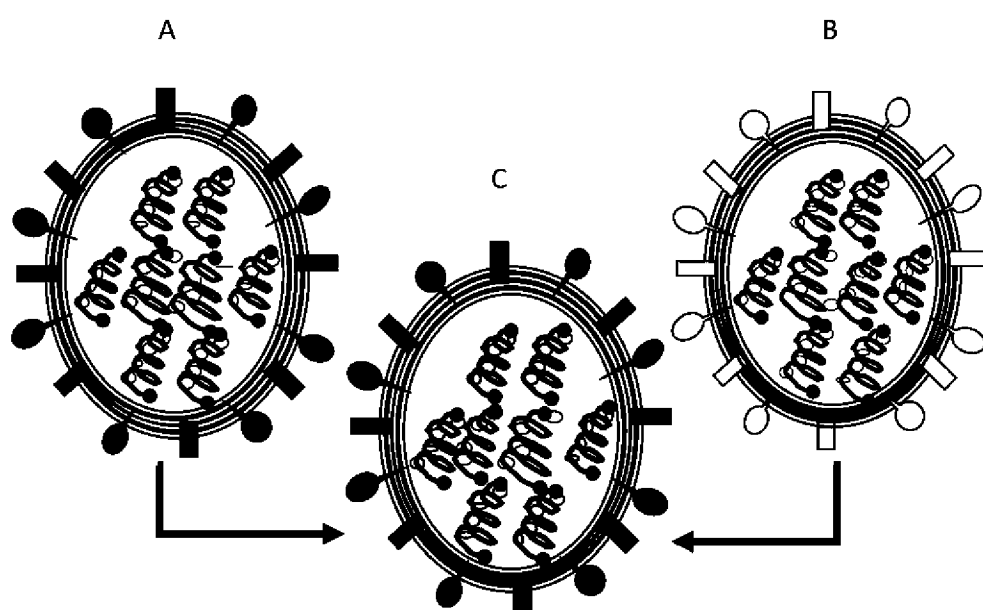
c) гистидин в количестве 0,21% (мас./об.);

d) аланин в количестве 0,1% (мас./об.);

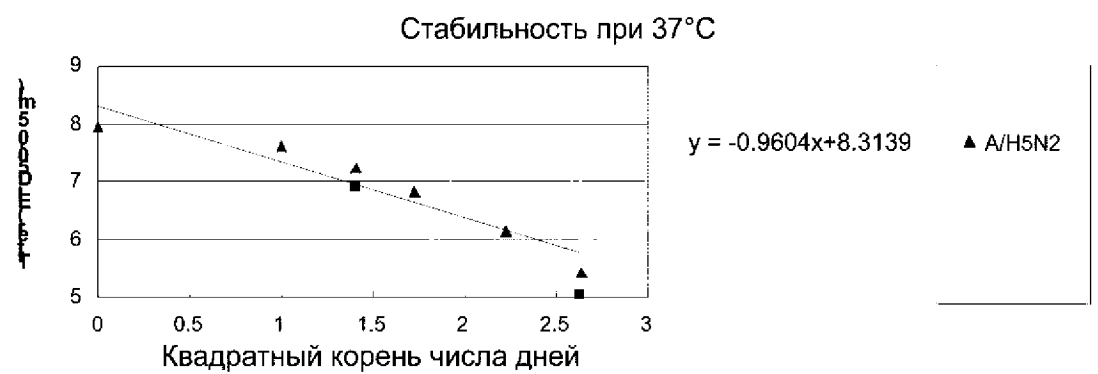
e) трицин в количестве 0,3% (мас./об.);

f) аргинин в количестве 1,6% (мас./об.);

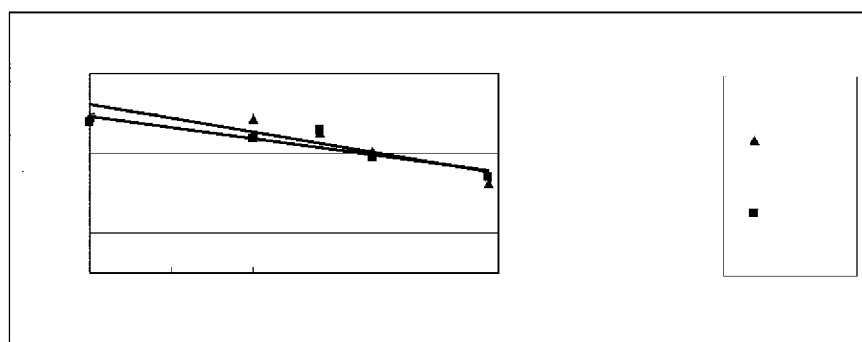
g) желатин в количестве 1% (мас./об.).



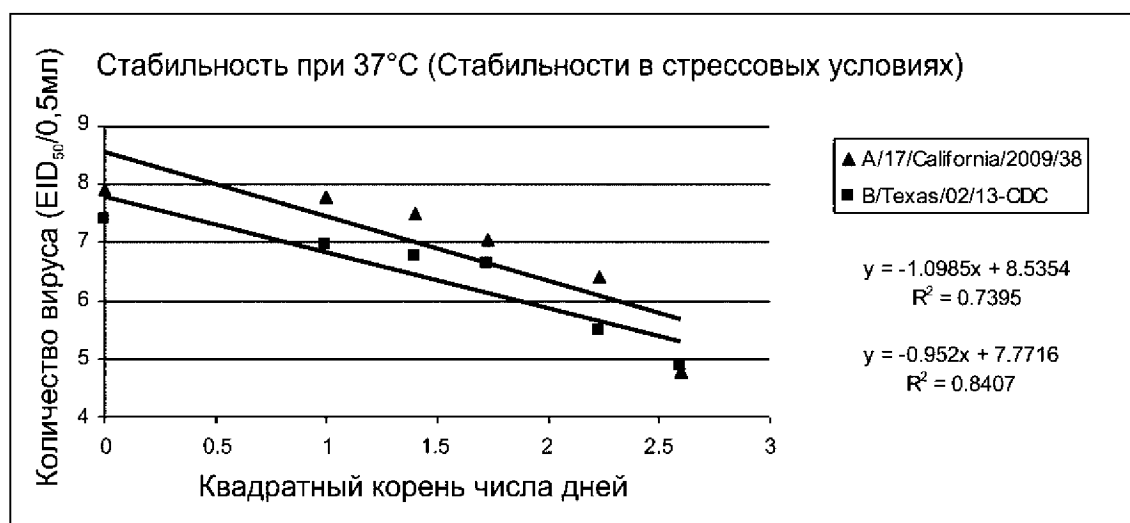
Фиг. 1



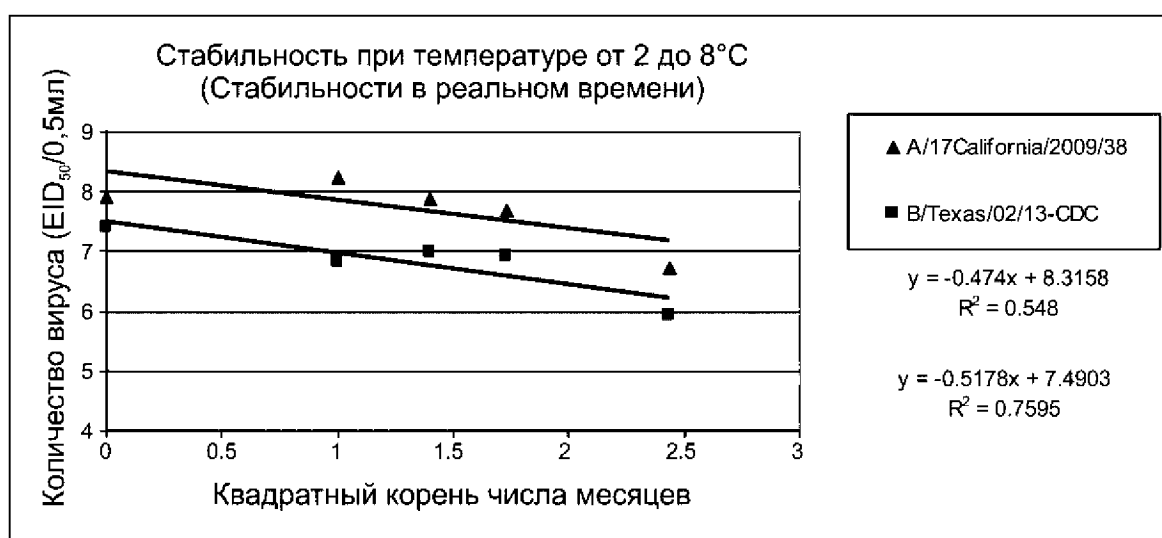
Фиг. 2



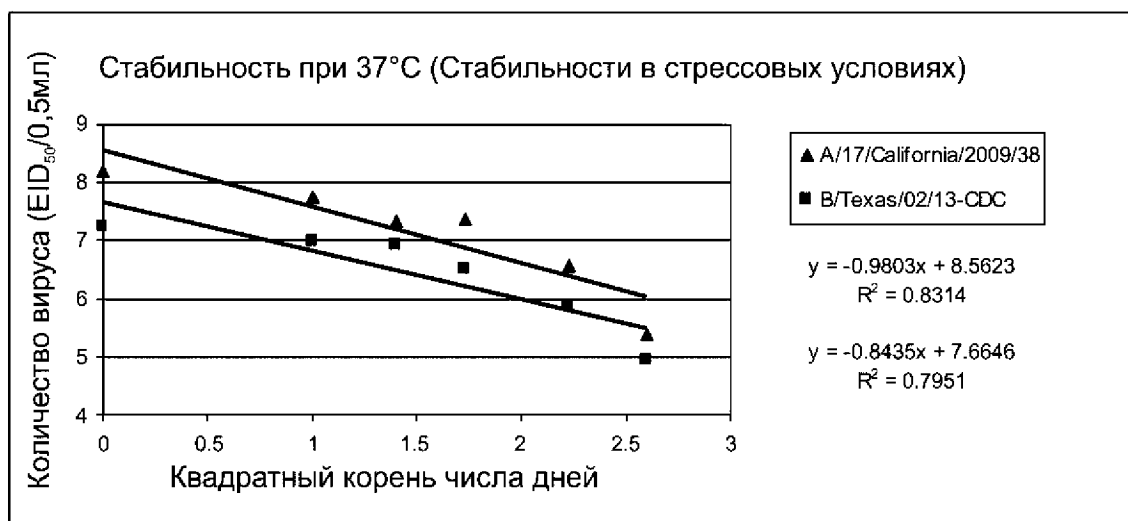
Фиг. 3



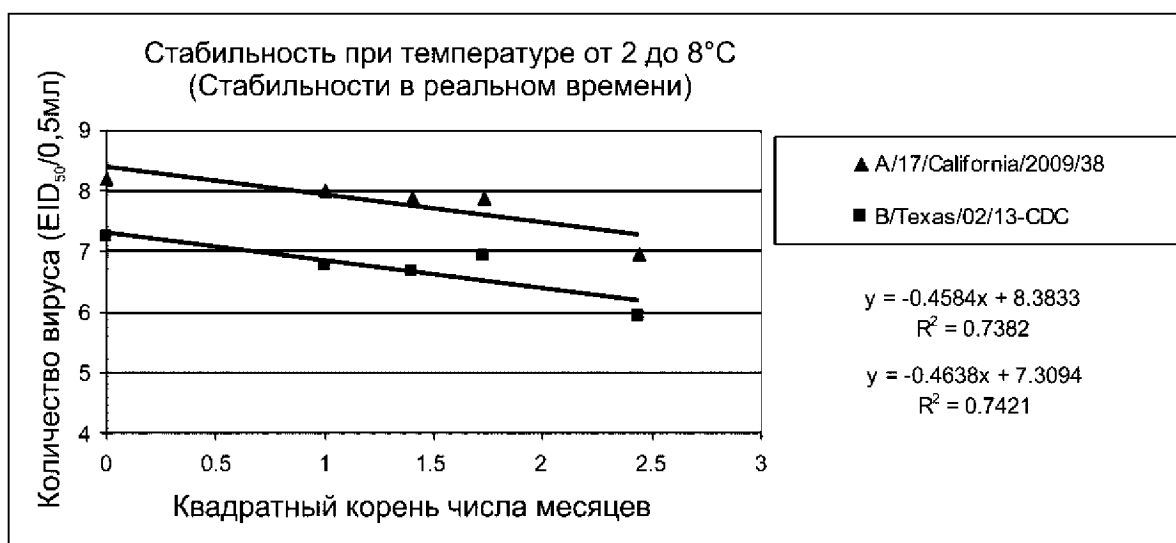
Фиг. 4



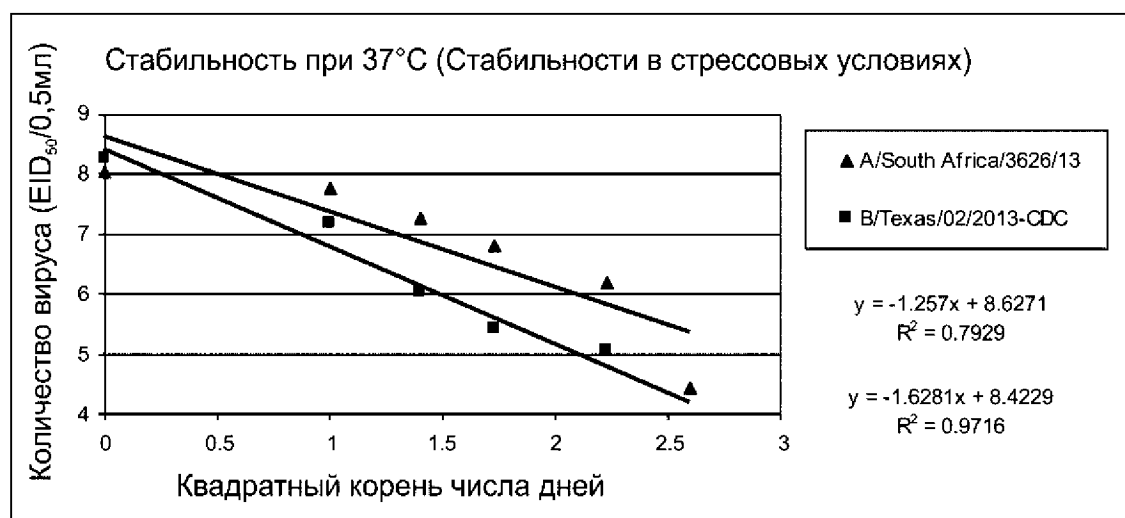
Фиг. 5



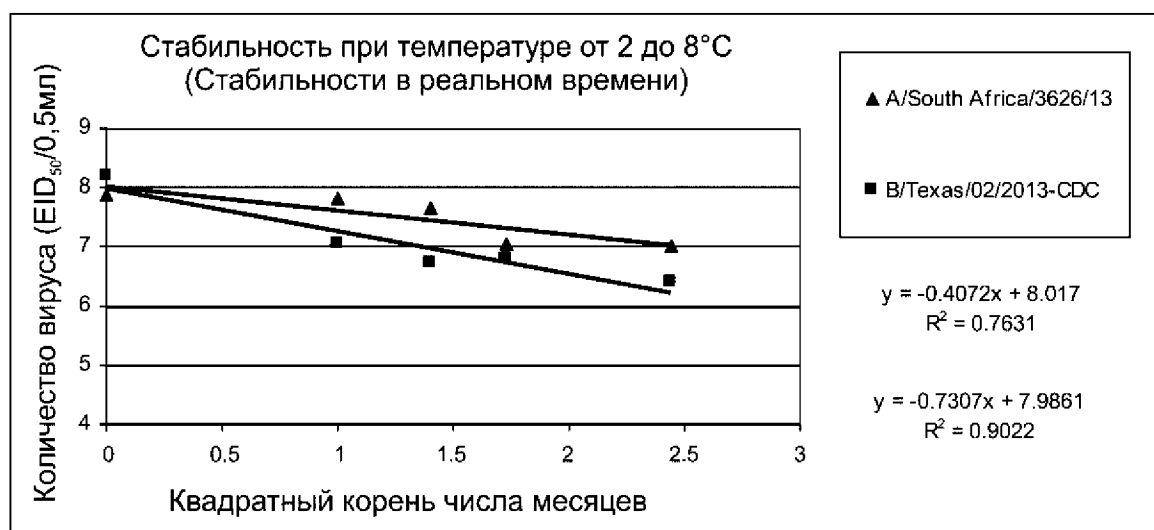
Фиг. 6



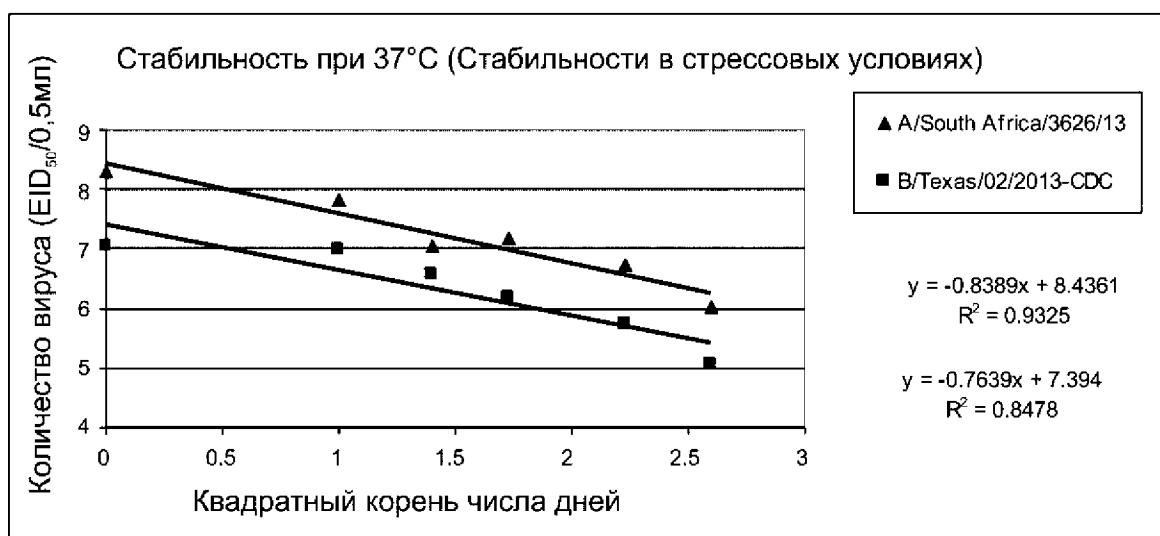
Фиг. 7



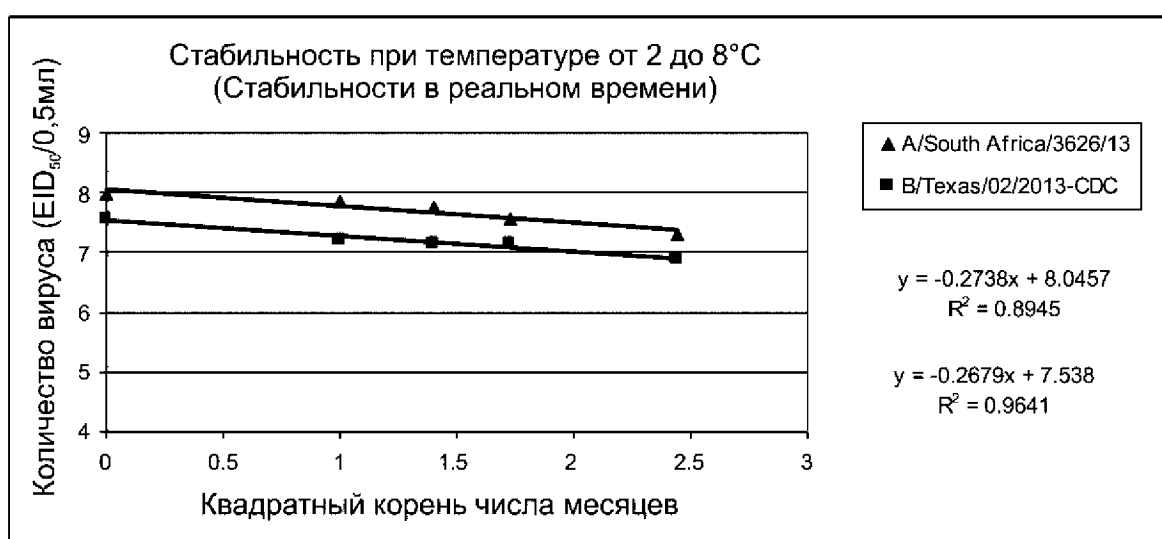
Фиг. 8



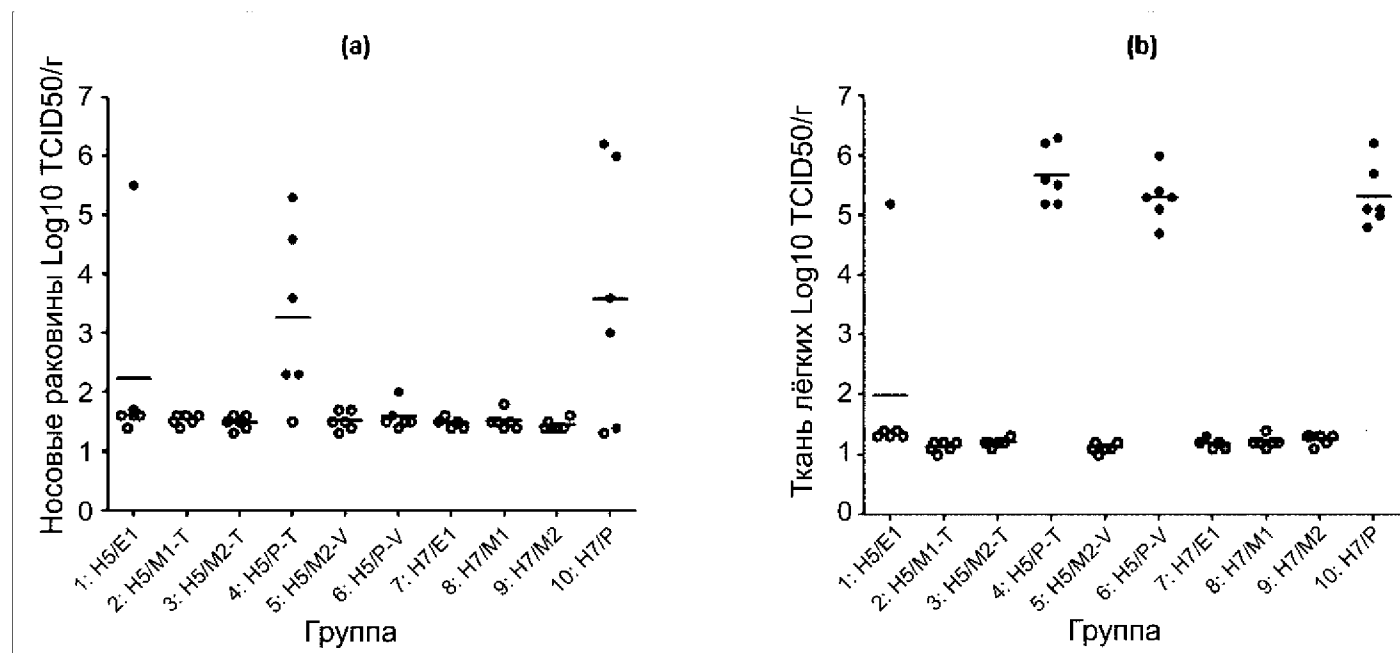
Фиг. 9



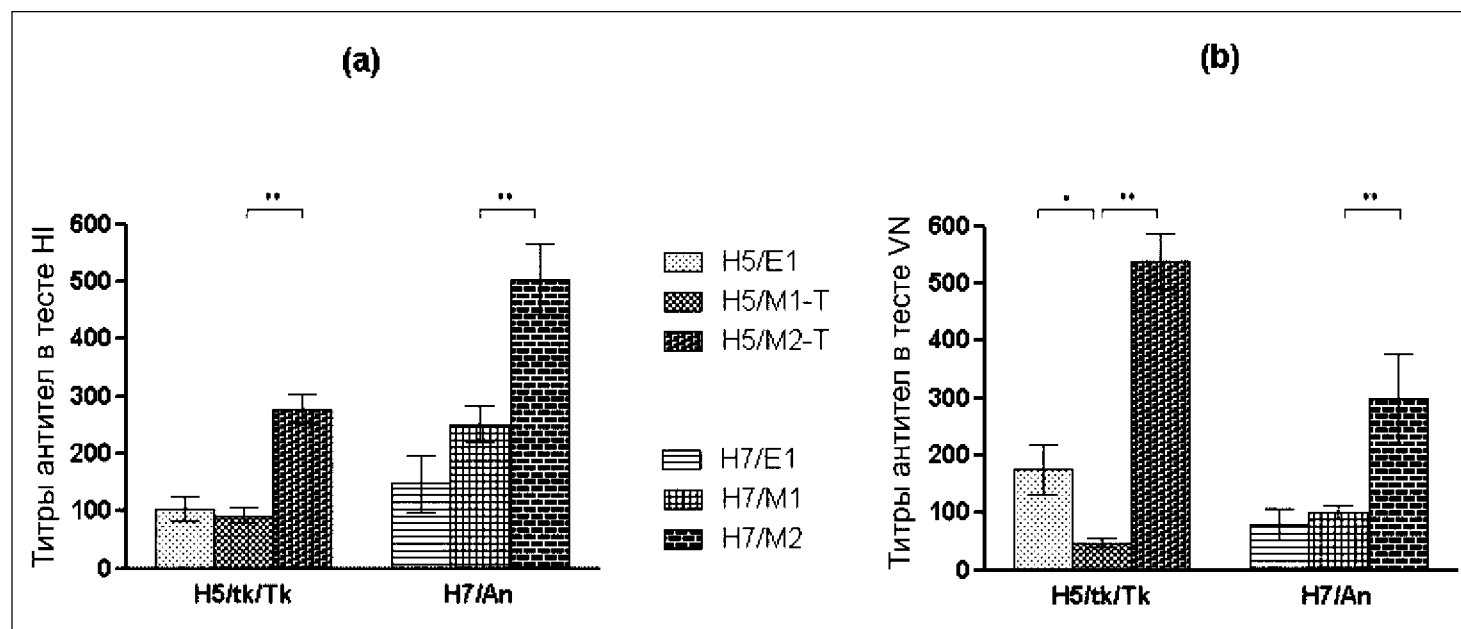
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13