

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192671** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.20

(22) Дата подачи заявки
2020.04.06

(51) Int. Cl. **C12N 7/00** (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/44 (2006.01)

(54) ПРОТИВОГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА ШИРОКОГО И ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

(31) **62/830,442**

(32) **2019.04.06**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/026841**

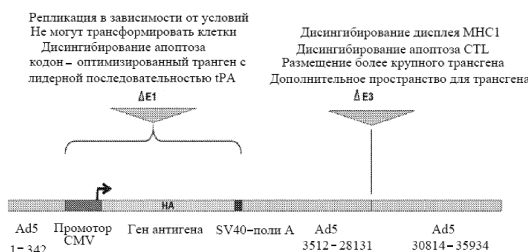
(87) **WO 2020/210149 2020.10.15**

(71) Заявитель:
АЛТИММУН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Робертс Скот, Таскер Сибил (US)

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Парамонова К.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(57) Изобретение относится к моновалентным фармацевтическим композициям (вакцинным композициям) и способам индукции многозвеньевое (мукозального, гуморального и клеточно-опосредованного) иммунного ответа и расширенной серологической защиты в течение по меньшей мере 12 месяцев после вакцинации против вируса гриппа.



A1

202192671

202192671

A1

ПРОТИВОГРИППОЗНАЯ ВАКЦИНА ШИРОКОГО И ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Описание

Ссылка на родственную заявку

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента США № 62/830442, поданной 6 апреля 2019 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0002] Настоящее изобретение в общем относится к моновалентному противогриппозному фармацевтическому составу для интраназального введения, который индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и клеточно-опосредованный защитный иммунный ответ у субъекта-человека и обеспечивает серологическую защиту от подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В в течение увеличенного периода времени.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Вирус гриппа является одной из наиболее распространенных респираторных вирусных инфекций, приводящих к значительной заболеваемости и смертности. Центр США по контролю и профилактике заболеваний рекомендует всем жителям США старше 6 месяцев проходить ежегодную вакцинацию от гриппа. Эффективность вакцины может сильно варьироваться от года к году, и через много лет полная защита является плохой.

[0004] Вирусы гриппа представляют собой оболочечные вирусы рибонуклеиновой кислоты, принадлежащие к семейству *Orthomyxoviridae*, и подразделяются на три различных типа на основе антигенных различий внутренних структурных белков (Lamb RA, Krug RM. *Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields Virology, Editors-in-Chief: Knipe DM and Howley PM. 4th Edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, Publishers; 2001;1487-1531). Два типа вируса гриппа, тип А и В, вызывают ежегодные эпидемические вспышки респираторных заболеваний у людей и дополнительно классифицируются на основе структуры двух основных внешних гликопротеинов, гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА). Вирусы гриппа типа В, которые в значительной степени ограничены человеческим хозяином, имеют один подтип НА и НА.

Напротив, к настоящему времени идентифицированы многочисленные подтипы HA и NA вируса гриппа типа А. Штаммы типа А поражают большое многообразие видов птиц и млекопитающих.

[0005] Вариантные штаммы вируса гриппа типа А и В возникают в результате частых антигенных изменений, главным образом в результате мутаций в гликопротеинах HA и NA. Эти варианты штаммы могут возникать по одному из двух механизмов: селективные точечные мутации в вирусном геноме [Palese P, Garcia-Sastre A. Influenza vaccines: present and future. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002;110:9-13; Nakajima S, Nobusawa E, Nakajima K. Variation in response among individuals to antigenic sites on the HA protein of human influenza virus may be responsible for the emergence of drift strains in the human population. *Virology*. 2000;274:220-231] или в результате реассортации между двумя совместно циркулирующими штаммами [Holmes EC, Ghedin E, Miller N, Taylor J, Bao Y, St. George K, Grenfell BT, Salzberg SL, Fraser CM, Lipman DJ, Taubenberger JK. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biology*. 2005;3:1579-1589; Barr IG, Komadina N, Hurt AC, Iannello P, Tomasov C, Shaw R, Durrant C, Sjogren H, Hampson AW. An influenza A(H3) reassortant was epidemic in Australia and New Zealand in 2003. *Journal of Medical Virology*. 2005;76:391-397].

[0006] С 1977 года подтипы H1N1 и H3N2 вируса гриппа А, а также вирусы гриппа В находились в глобальной циркуляции среди людей. В настоящее время лицензированные в США инактивированные трехвалентные и четырехвалентные (содержащие две линии штаммов вируса гриппа В) вакцины составлены для предотвращения заболевания гриппом, вызываемого этими вирусами гриппа. Из-за частого возникновения новых вариантов штаммов вируса гриппа антигенный состав противогриппозных вакцин необходимо оценивать ежегодно, и противогриппозные вакцины пересоставляют почти каждый год. Иммунный ответ, вызванный предыдущей вакцинацией, может не защищать от новых вариантов.

[0007] Изменения в противогриппозном составе и производстве важны для защиты населения от значительной заболеваемости и смертности, связанных с сезонными инфекциями гриппа. Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) недавно разработал стратегический план для руководства фундаментальными исследованиями и разработкой более эффективных противогриппозных вакцин [Erbelding EJ, et al. A universal influenza vaccine: The strategic plan for the National Institute of Allergy and

Infectious Diseases. J Infect Dis. 2018; 218:347–54]. Этот план выявил многочисленные недостатки существующих в настоящее время вакцин, включая несоответствие штаммам, усугубляемое пассажем на куриных эмбрионах, недостаточную продолжительность иммунного ответа, слабые клеточные иммунные ответы и неадекватный тканевый иммунитет [Erbelding et al., 2018]. Вакцины, произведенные с использованием яиц, не только с большей вероятностью будут антигенно отличаться от соответствующих циркулирующих штаммов, чем вакцины, произведенные с использованием тканевой культуры [Seqirus presents favorable outcomes data for adjuvanted trivalent influenza vaccine (FLUAD®) at 6th annual IDWeek. Seqiris Web site], но также связаны с более длительными сроками производства и рисками в цепочке поставок и вызывают аллергическую реакцию у многих индивидуумов.

[0008] Большинство лицензированных в настоящее время вакцин основаны на циркулирующих штаммах вируса гриппа, адаптированных для роста на куриных яйцах. В целом, эти вакцины хорошо переносятся, но обеспечивают ограниченную защиту от вирусов гриппа, которые не соответствуют штаммам вакцины. Вакцина для интраназального введения на основе живого аттенуированного вируса гриппа (LAIV) была лицензирована с 2003 года, но ее использование ограничено детьми старшего возраста и взрослыми в возрасте до 49 лет. Вакцины для интраназального введения могут быть предпочтительнее вакцин для парентерального введения из-за простоты введения и уменьшения дискомфорта, связанного с введением. Значительная часть населения США боится уколов (McLenon J. et al. The fear of needles: A systematic review and meta-analysis (2019; Jan) J. Adv. Nurs.; 75(1):30-42). Недавние постмаркетинговые исследования показали снижение эффективности, и ее не рекомендовали для использования при сезонном гриппе 2016–2017 и 2017–2018 годов (веб-сайт CDC). Хотя данные с 2010-2011 по 2016-2017 годы показали, что LAIV неэффективна для детей в возрасте от 2 до 17 лет против вирусов гриппа H1N1pdm09 (2009 H1N1) в США, LAIV была эффективна против вирусов гриппа B, а также была подобным образом эффективна против вирусов H3N2 в качестве инактивированной противогриппозной вакцины. На сезон 2018-2019 производитель LAIV4 включил новый компонент вакцины H1N1. Некоторые данные предполагают, что это приведет к улучшению эффективности LAIV4 против H1N1. Однако опубликованные оценки эффективности этого компонента вакцины против вирусов H1N1 пока не доступны.

[0009] Более того, недавно опубликованное исследование вакцины LAIV 2013-2014 показало слабые системные иммунные ответы [King JP, McLean HQ, Meece JK, et al.

Vaccine failure and serologic response to live attenuated and inactivated influenza vaccines in children during the 2013-2014 season. *Vaccine*. 2018; 36:1214–9]. Эффективность для всех типов противогриппозных вакцин может сильно варьироваться из года в год, и через многие годы общая защита будет плохой. Согласно CDC средняя общая скорректированная эффективность вакцины для сезонных вирусов гриппа составляла приблизительно 40% с 2005 по 2015 год и составляла <20% в сезон гриппа 2014-2015 годов.

[0010] Клеточный иммунитет к вирусу гриппа может снизить тяжесть заболевания и заразность у инфицированных, мукозальные иммунные ответы обеспечивают защиту от гриппа в начальном очаге инфекции, и оба могут быть способны защищать от инфекции при отсутствии серологически защитных уровней сывороточного антитела HAI [Gould VMW, Francis JN, Anderson KJ, et al. Nasal IgA provides protection against human influenza challenge in volunteers with low serum influenza antibody titre. *Front Microbiol*. 2017;8:900; McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, et al. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med*. 1983;309:13–7; Seibert CW, Rahmat S, Krause JC, et al. Recombinant IgA is sufficient to prevent influenza virus transmission in guinea pigs. *J Virol*. 2013;87:7793–804; Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, et al. Preexisting influenza specific CD4⁺ T-cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med*. 2012;18:274–80]. Однако ни одна противогриппозная вакцина не индуцирует эти комбинированные ответы звеньев иммунной системы для обеспечения длительной серологической защиты от подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В. Таким образом, сохраняется потребность в противогриппозной вакцине, которая индуцирует длительную серологическую защиту, наряду с комбинированным иммунным ответом мукозального, гуморального и клеточно-опосредованного типов.

Сущность настоящего изобретения

[0010] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к композициям и способам для индукции длительной системной иммунной защиты от подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В у субъекта-человека.

[0011] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к моновалентному противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку. Согласно некоторым вариантам осуществления состав содержит эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который

содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный (т.е., антитела вне слизистой оболочки, такие как антитела в крови или сыворотке) и Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно защищает от заражения вирусом гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно вариантам осуществления состав составлен для обеспечения у субъекта-человека серологической защиты с титром антител $\text{NAI} \geq 40$ в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа.

[0012] Согласно определенному варианту осуществления настоящее изобретение относится к противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, где состав содержит эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный и гуморальный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным, причем предпочтительно сформирован с обеспечением у субъекта-человека серологической защиты с титром антител $\text{NAI} \geq 40$ в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления титр антител NAI составляет по меньшей мере 50.

[0013] Согласно некоторым вариантам осуществления антиген гемагглютинин вируса гриппа происходит из вируса гриппа А. Согласно вариантам осуществления вирус гриппа А представляет собой подтип H1N1.

[0014] Согласно другим определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции комбинированного мукозального, гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, который предпочтительно является защитным у субъекта-человека против вируса гриппа. Согласно предпочтительным вариантам осуществления способы предусматривают интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению, где введение индуцирует сывороточные антитела, антитела слизистой оболочки и Т-клетки против вируса гриппа, посредством чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере 12 месяцев.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления серологическая защита длится по меньшей мере 13 месяцев, по меньшей мере 14 месяцев или дольше. Согласно вариантам осуществления введение индуцирует титр антител HAI по меньшей мере 50 в течение по меньшей мере 12 месяцев после введения.

[0015] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способам, которые обеспечивают комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным против вируса гриппа А. Согласно вариантам осуществления вирус гриппа А относится к подтипу H1N1 и/или H3N2. Согласно вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным против вируса гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным против заражения подтипами вируса гриппа А и вирусом гриппа В.

Краткое описание чертежей

[0017] Следующие чертежи, которые включены в настоящий документ и составляют часть настоящего описания, иллюстрируют один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения и вместе с подробным описанием и примерами служат для пояснения принципов и реализации настоящего изобретения.

[0018] На **Фиг. 1** приведено схематическое изображение аденовирусного вектора, содержащего ген НА вируса гриппа, где цифры относятся к номеру пары оснований в последовательности Ad5 дикого типа, GenBank ID AY339865.1.

[0019] На **Фиг. 2** показан ответ сывороточных антител (ингибирующее гемагглютинацию антитело, HAI) (гуморальный ответ) на день 29 после введения, индуцированный после однократного введения моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению со 100% серологической защитой при двух уровнях дозы, где антитела являются достаточными для предотвращения заражения вирусом гриппа. Флузон представляет собой инактивированную четырехвалентную сезонную противогриппозную вакцину с высокой дозой.

[0020] На **Фиг. 3** в формате таблицы приведены сывороточные антитела (HAI, MN), измеренные на день 29 после введения моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению, где сывороточные нейтрализующие антитела, измеренные посредством анализа микронейтрализации («MN»), и сывороточные ингибирующие гемагглютинацию антитела, измеренные посредством анализа HAI, представлены как средний геометрический титр («GMT»).

[0021] На **Фиг. 4** показан Т-клеточный иммунный (клеточно-опосредованный иммунный) ответ, индуцированный после однократного введения моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению.

[0022] На **Фиг. 5** показан мукозальный иммунный ответ на основе антител IgA (мукозальный), индуцированный после однократного введения моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению.

[0023] На **Фиг. 6** показана расширенная серологическая защита посредством измерения сывороточного антитела (HAI) при количествах, достаточных для предотвращения заражения вирусом гриппа. На **Фиг. 6** показано среднее геометрическое (доверительный интервал 95%) титра подавления гемагглютинации против вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1) до конечного дня 181 при дозе моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению.

[0024] На **Фиг. 7** показано среднее геометрическое (GMR) (доверительный интервал 95%) титра микронейтрализации против вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1) до конечного дня 181 при дозе моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению.

[0025] На **Фиг. 8** показан клеточный иммунный ответ на дозу моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению. Аббревиатуры: CI = доверительный интервал, GM = средний геометрический титр, LS = метод наименьших квадратов, SFU = пятнообразующие единицы, vp = вирусные частицы. а. Ковариационный анализ использует логарифмически преобразованный уровень в качестве зависимой переменной, группу дозы в качестве фактора и логарифмически преобразованный исходный уровень в качестве ковариаты. Различия средних оценок LS и CI 95% были преобразованы обратно в исходную шкалу, что привело к соотношению средних геометрических. б. Ретроспективный анализ. с. Количество и процент субъектов с

трехкратным увеличением относительно исходного уровня и на 25 SFU/10⁶ большим количество клеток по сравнению с исходным уровнем. d. Точный критерий Фишера.

[0026] На **Фиг. 9** показан гуморальный иммунный ответ, индуцированный моновалентной противогриппозной вакцинной композицией согласно настоящему изобретению (например, NasoVAX) при дозе 11×10^{11} vp и группами Флузон® на дни 29, 91 и 181 после введения, где HAI представлено как соотношение геометрических средних («GMR»), наряду с показателем сероконверсии («SCR») и процентом субъектов с титром HAI $\geq 1:40$ («a»), и степенью серологической защиты («SPR»), где процент субъектов с титром HAI на исходном уровне, 1:10 и титром после вакцинации $\geq 1:40$ («b») (который в 4 раза превышает нижний предел количественного определения анализа) включен в последнюю строку.

[0027] На **Фиг. 10A** показан титр HAI («GMT») за 13 месяцев, индуцированный моновалентной противогриппозной вакцинной композицией согласно настоящему изобретению (например, NasoVAX), где 8/15 субъектов в группе высокой дозы (11×10^{11} vp) вернулись около через 13 месяцев для оценки, в среднем 13,5 месяцев от введения до измерения титра HAI.

[0028] На **Фиг. 10B** показаны степень серологической защиты и показатель сероконверсии, индуцированные моновалентной противогриппозной вакцинной композицией согласно настоящему изобретению (например, NasoVAX), демонстрирующие степень серологической защиты и показатель сероконверсии, идентичные для дней исследования от 15 до 400 (дни после введения моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению). Иммунный ответ не изменился на момент 13 месяцев с неизменными степенью серологической защиты и показателем сероконверсии.

[0029] На **Фиг. 11** показано зависимый от дозы шеддинг вектора, которое отсутствует через 2 недели после введения (моновалентной противогриппозной вакцинной композиции согласно настоящему изобретению (например, NasoVAX)) без обнаруживаемого репликационно-компетентного вируса (как определено с помощью анализа полимеразной цепной реакции («ПЦР»)), и антитела против вектора, представленного в виде GMR, на день 29 по сравнению с исходным уровнем, где была продемонстрирована только 2,3-кратная индукция через 1 месяц при максимальной дозе. Моновалентная противогриппозная вакцинная композиция согласно настоящему изобретению демонстрирует временный шеддинг (Ad-вектора) с ограниченным иммунным ответом против вектора (Ad-вектором).

[0030] На **Фиг. 12** показано влияние на иммуногенность NasoVAX (высокая доза, 11×10^{11} vp) ранее существующего иммунитета против вектора (Ad5), как измерено для гуморального («NAI» или микронеutralизация «MN» на день 29), мукозального («IgA» на день 29) и клеточного («ELISpot» на день 8) ответа, где не наблюдались различия в иммунном ответе среди серонегативных по Ad5 и сероположительных по Ad5 субъектов. Медианный титр субъектов Ad5+ (сероположительных) был в 22 раза выше нижнего предела количественного определения (LLOQ), при этом сероконверсия, как правило, является около четырехкратной по сравнению с фоном или анализом LLOQ.

Подробное описание настоящего изобретения

[0031] Введение

[0032] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для индукции длительной системной иммунной защиты против подтипов вируса гриппа А и вирусов гриппа В у субъекта-человека. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к противогриппозному фармацевтическому составу (предпочтительно моновалентному), подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку. Согласно вариантам осуществления состав содержит эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным от заражения вирусом гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0033] Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, где состав содержит эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный и гуморальный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным от заражения вирусом гриппа, и согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления сформирован с

обеспечением у субъекта-человека серологической защиты с титром антител $\text{NAI} \geq 40$ в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0034] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу индукции комбинированного мукозального, гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, предпочтительно защитного, у субъекта-человека против вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению, где введение индуцирует сывороточные антитела, антитела слизистой оболочки и Т-клетки против вируса гриппа, посредством чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере 12 месяцев.

[0035] Авторы настоящего изобретения разработали аденовирусный вектор (например, на основе Ad5), интраназальную противогриппозную вакцину, полученную в тканевой культуре (NasoVAX). Аденовирус представляет собой встречающийся в природе респираторный вирус, который часто используется в качестве вектора для введения генетического материала в клетки. Путем включения гена НА вируса гриппа в репликационно-дефектный (RD) аденовирус (Ad-НА) и введения Ad-НА в нос (интраназальный путь введения) аденовирусный вектор может трансдуцировать ген НА в клетки слизистой оболочки носа, приводя к временной экспрессии кодируемого белка НА. NasoVAX доставляется интраназально, причем авторы настоящего изобретения продемонстрировали в настоящем документе, что вакцинная композиция индуцирует как локальные, так и длительные системные иммунные ответы. См. Пример 3. Последующее продуцирование антигена НА в нормальных эпителиальных клетках человека обеспечивает иммунный ответ против антигена НА, как это происходит в случае естественной циркуляции вируса гриппа. Более того, авторы настоящего изобретения показали, что использование аденовирусного вектора при интраназальном введении преодолевает иммунитет субъектов против аденовируса, даже у субъектов, сероположительных по Ad5, и, таким образом, на его эффекты не оказывает неблагоприятного воздействия уже существующий иммунный ответ против вектора. См. **Фиг 13**. Согласно вариантам осуществления интраназальную противогриппозную вакцину согласно настоящему изобретению (содержащую аденовирусный вектор) можно вводить повторно (например, в качестве сезонной

противогриппозной вакцины, вводимой около один раз каждые 11-14 месяцев) без индукции значительного иммунного ответа против вирусного вектора.

[0036] Раскрытое в настоящем документе клиническое исследование было разработано для оценки безопасности и иммуногенности моновалентного A/California/04/2009(H1N1)-подобного варианта штамма NasoVAX. Были включены эксплоративные конечные точки для оценки широты иммунного ответа и способности NasoVAX индуцировать клеточный и мукозальный иммунные ответы. См. Примеры 2 и 3. Результаты исследований, раскрытые в настоящем документе, демонстрируют, что моновалентный противогриппозный фармацевтический состав согласно настоящему изобретению удовлетворяет неудовлетворенные потребности, определенные NIAID [Erbelding et al., 2018].

[0037] Как понятно специалисту в данной области, измерение антител HAI используют в качестве суррогатного маркера защиты, где титр антител $HAI \geq 40$, измеренный в сыворотке после вакцинации, демонстрирует серологическую защиту, индуцированную введенной противогриппозной вакциной [Trombetta CM. et al.; Overview of Serological Techniques for Influenza Vaccine Evaluation: Past, Present and Future Vaccines (Basel) (2014) Dec. 2(4): 707-734]. «Суррогатный маркер защиты» означает иммунный маркер, который может заменять клиническую конечную точку и, таким образом, может использоваться для надежного прогнозирования эффективности вакцины. В случае противогриппозных вакцин антитела, измеряемые с помощью анализа подавления гемагглютинации (HAI), представляют собой суррогатный маркер защиты, где анализ HAI основан на способности антител, если они присутствуют в сыворотке, предотвращать агглютинацию между эритроцитами и вирусным гемагглютинином. В общем понятно, что субъекты с титром антител $HAI \geq 40$ защищены от представленных подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В. Другими словами, титр антител HAI, равный 40 (или более), в общем рассматривается как «защитный» пороговый уровень, выше которого вероятность заражения вирусом гриппа снижается на 50% или более. Титр HAI, равный или более 40, используется в качестве иммунологического коррелята защиты и рассматривается как лучший доступный в настоящее время параметр для прогнозирования защиты от инфекции природного происхождения в соответствии с руководствами FDA для вакцин против пандемического гриппа (Noah et al. Qualification of the hemagglutination inhibition assay in support of pandemic influenza vaccine licensure. Clin. Vaccine Immunol. 2009;16:558–566).

[0038] В отдельном исследовании авторы настоящего изобретения показали, что интраназальная противогриппозная вакцина согласно настоящему изобретению (NasoVAX) является стабильной в течение около 3 месяцев при температуре окружающей среды, такой как комнатная температура (например, от 15 до 30°C, предпочтительно 20-25°C). См. **Пример 7**. Согласно вариантам осуществления интраназальная противогриппозная вакцина согласно настоящему изобретению может храниться или транспортироваться без необходимости охлаждения или особых условий хранения. Согласно определенным вариантам осуществления интраназальная противогриппозная вакцина согласно настоящему изобретению содержит антигены вируса гриппа, присутствующие в пандемическом штамме вируса гриппа А, и может быть транспортирована непосредственно к пользователю, т.е., вакцинируемому, для интраназального введения.

[0039] *Определения*

[0040] В контексте настоящего изобретения форма единственного числа, как обычно используется в патентных документах, включает один или более чем один, независимо от любых других случаев или применений «по меньшей мере один» или «один или несколько».

[0041] В контексте настоящего изобретения термин «или» используется для ссылки не исключительно на или, так что «А или В» включает «А, но не В», «В, но не А» и «А и В», если не указано иное.

[0042] В контексте настоящего изобретения термин «около» используется для обозначения количества, которое приблизительно, около, почти или почти равно указанному количеству или равно указанному количеству, например, указанному количеству плюс/минус около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1%.

[0043] Композиции, составы и способы согласно настоящему изобретению могут содержать, состоять по существу из или состоять из компонентов и ингредиентов согласно настоящему изобретению, а также других ингредиентов, описанных в настоящем документе. В контексте настоящего изобретения термин «состоящие по существу из» означает, что композиции, составы и способы могут включать дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты, но только в том случае, если дополнительные стадии, компоненты или ингредиенты не изменяют существенно основные и новые признаки заявленных композиций, составов и способов.

[0044] Также следует отметить, что в контексте описания настоящего изобретения и в приложенной формулы изобретения термин «составленный» описывает систему, устройство или другую структуру, которая сформирована или составлена для выполнения конкретной задачи или принятия конкретной конфигурации. Термин «составленный» может использоваться взаимозаменяемо с другими подобными фразами, такими как сформированный и составленный, выполненный и сформированный, адаптированный и составленный, адаптированный, выполненный, изготовленный и сформированный и тому подобное.

[0045] В контексте настоящего изобретения термин «адъювант» относится к веществу, которое усиливает иммунный ответ организма на антиген. Согласно вариантам осуществления моновалентный противогриппозный фармацевтический состав согласно настоящему изобретению представляет собой вакцинную композицию, не содержащую адъюванты.

[0046] Под «введением» подразумевается введение вакцинной композиции согласно настоящему изобретению субъекту, введение также может относиться к процессу предоставления композиции согласно настоящему изобретению субъекту (например, путем назначения). В контексте настоящего изобретения термин «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству вводимого соединения, которое будет индуцировать комбинированный, мукозальный, гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ. Термин также относится к количеству композиций согласно настоящему изобретению, которое облегчает или предотвращает в некоторой степени один или несколько симптомов состояния, подлежащего лечению. Что касается состояний/заболеваний, которые можно лечить непосредственно композицией согласно настоящему изобретению, терапевтически эффективное количество относится к такому количеству, которое оказывает эффект предотвращения возникновения состояния/заболевания у млекопитающего, которое может быть предрасположено к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет симптомов состояния/заболевания (профилактическое лечение), облегчения симптомов состояния/заболевания, уменьшения степени тяжести состояния/заболевания, стабилизации (например, отсутствие ухудшения) состояния/заболевания, предотвращения распространения состояния/заболевания, отсрочки или замедления прогрессирования состояния/заболевания, улучшения или облегчения состояния/болезненного состояния и их комбинаций. Термин

«эффективное количество» относится к такому количеству вводимого соединения, которое вызывает реакцию, отличную от реакции, которая произошла бы без соединения.

[0047] Согласно вариантам осуществления эффективное количество моновалентного противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере 10^9 инфекционных единиц (ifu) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека.

[0048] В контексте настоящего изобретения термин «температура окружающей среды» означает температуру воздуха для хранения моновалентного противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению. Согласно вариантам осуществления температура окружающей среды представляет собой комнатную температуру, как например любую температуру, выбранную из диапазона от около 15 до 30°C, предпочтительному от около 20 до 25°C.

[0049] В контексте настоящего изобретения термин «человеческий аденовирус» предназначен для охвата всех аденовирусов человека семейства *Adenoviridae*, которые включают представителей родов *Mastadenovirus*. На сегодняшний день идентифицировано более 51 серотипа человеческих аденовирусов (см., например, Fields et al., *Virology* 2, Ch. 67 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers)). Аденовирус может относиться к серотипу A, B, C, D, E или F. Человеческий аденовирус может относиться к серотипу 1 (Ad1), серотипу 2 (Ad2), серотипу 3 (Ad3), серотипу 4 (Ad4), серотипу 5 (Ad5), серотипу 6 (Ad6), серотипу 7 (Ad7), серотипу 8 (Ad8), серотипу 9 (Ad9), серотипу 10 (Ad10), серотипу 11 (Ad11), серотипу 12 (Ad12), серотипу 13 (Ad13), серотипу 14 (Ad14), серотипу 15 (Ad15), серотипу 16 (Ad16), серотипу 17 (Ad17), серотипу 18 (Ad18), серотипу 19 (Ad19), серотипу 19a (Ad19a), серотипу 19p (Ad19p), серотипу 20 (Ad20), серотипу 21 (Ad21), серотипу 22 (Ad22), серотипу 23 (Ad23), серотипу 24 (Ad24), серотипу 25 (Ad25), серотипу 26 (Ad26), серотипу 27 (Ad27), серотипу 28 (Ad28), серотипу 29 (Ad29), серотипу 30 (Ad30), серотипу 31 (Ad31), серотипу 32 (Ad32), серотипу 33 (Ad33), серотипу 34 (Ad34), серотипу 35 (Ad35), серотипу 36 (Ad36), серотипу 37 (Ad37), серотипу 38 (Ad38), серотипу 39 (Ad39), серотипу 40 (Ad40), серотипу 41 (Ad41), серотипу 42 (Ad42), серотипу 43 (Ad43), серотипу 44 (Ad44), серотипу 45 (Ad45), серотипу 46 (Ad46), серотипу 47 (Ad47), серотипу 48 (Ad48), серотипу 49 (Ad49), серотипу 50 (Ad50), серотипу 51 (Ad51) или их комбинации, но без ограничения

этими примерами. Согласно некоторым вариантам осуществления аденовирус относится к серотипу 5 (Ad5).

[0050] В контексте настоящего изобретения «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения у субъект-человека и не отменяет биологическую активность и свойства вводимых вакцинных композиций.

[0051] В контексте настоящего изобретения термин «сероконверсия» представляет собой показатель, определяемый как процент вакцинированных индивидуумов (которым введен вакцинный состав согласно настоящему изобретению), у которых после вакцинации наблюдается не менее 4-кратное увеличение сывороточных титров ингибирования гемагглютинина (HI). В контексте настоящего изобретения термин «коэффициент конверсии» определяется как кратное увеличение сывороточных средних геометрических титров (GMT) HI после вакцинации.

[0052] В контексте настоящего изобретения термин «серологическая защита» относится к титру антител HAI, равному 40 или более, измеренному в сыворотке субъекта-человека после вакцинации. В контексте настоящего изобретения термин «степень защиты» определяется как процент вакцинированных индивидуумов с сывороточным титром HAI, равным или более 1:40 после вакцинации, и в общем принят как указывающий на защиту.

[0053] В контексте настоящего изобретения термин «сезонный вирус гриппа» относится к вирусу гриппа А и/или В, который циркулирует и ответственен за сезонные эпидемии гриппа каждый год. Вирусы гриппа А делятся на подтипы на основе двух белков на поверхности вируса: гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Существует 18 различных подтипов гемагглютинина и 11 различных подтипов нейраминидазы (H1 - H18 и N1 - N11, соответственно). Хотя потенциально существует 198 различных комбинаций подтипов вируса гриппа А, в природе обнаружен только 131 подтип. Существующие в настоящее время подтипы вируса гриппа, которые обычно циркулируют у людей, включают А (H1N1) и А (H3N2). Вирусы гриппа В подразделяются на две линии: В/Yamagata и В/Victoria. Вирусы гриппа А и В можно далее классифицировать на определенные клады и подклады (которые иногда называют группами и подгруппами). Циркулирующие в настоящее время вирусы гриппа А (H1N1) связаны с пандемическим вирусом H1N1 2009, который возник весной 2009 года и вызвал пандемию гриппа. Этот вирус, именуемый «вирусом А (H1N1)pdm09», и в более общем виде называемый «H1N1 2009», продолжает циркулировать и вносить свой

вклад в сезонные эпидемии гриппа каждый год. Из всех вирусов гриппа, которые обычно циркулируют и вызывают заболевания у людей, вирусы гриппа А (H3N2), как правило, изменяются быстрее, как генетически, так и антигенно. Вирусы гриппа А (H3N2) в последние годы сформировали множество отдельных генетически разных клад, которые продолжают совместно циркулировать.

[0054] В контексте настоящего изобретения термин «вирус пандемического гриппа» относится к вирусу гриппа А, который циркулирует во всем мире и ответственен за глобальную пандемию гриппа. Пандемии случаются, когда появляются новые (вновь возникшие) вирусы гриппа А, которые могут легко инфицировать людей и эффективно и устойчиво передаваться от человека к человеку, распространяясь по всему миру.

[0055] Термины «лечить», «лечение» и «обработка» представляют собой подход к получению благоприятных или желаемых клинических результатов. В частности, благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов, уменьшение тяжести заболевания, стабилизацию (например, отсутствие ухудшения) заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, существенное предотвращение распространения заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), либо обнаруживаемую, либо не обнаруживаемую. Кроме того, термины «лечить», «лечение» и «обработка» также могут означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится, и/или могут быть терапевтическими с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного воздействия, связанного с заболеванием. В контексте настоящего изобретения термины «лечить профилактически» или «профилактическое лечение» относятся к полному, существенному или частичному предотвращению заболевания/состояния или его одного или нескольких симптомов у хозяина. Подобным образом, «отсрочка начала состояния» также может быть включена в «профилактическое лечение» и относится к эффекту увеличения времени до фактического начала состояния у пациента, который предрасположен к этому состоянию.

[0056] В контексте настоящего изобретения «вакцина» относится к композиции, содержащей аденовирусный вектор, содержащий и экспрессирующий антиген вируса гриппа, наряду с другими компонентами вакцинной композиции, включая, например, адъюванты, соединения для замедленного высвобождения, растворители и т.д. Согласно

вариантам осуществления вакцины согласно настоящему изобретению улучшают иммунные ответы на любой антиген независимо от источника антигена или его функции.

[0057] Как упоминается в настоящем документе, «вектор» несет генетический код или его часть для антигена, однако, он не является самим антигеном. Согласно иллюстративному аспекту вектор может включать вирусный вектор или бактериальный вектор. В контексте настоящего изобретения «антиген» означает вещество, которое индуцирует специфический иммунный ответ у субъекта, включая людей и/или животных. Антиген может включать целый организм, убитый, ослабленный или живой, субъединицу или часть организма, рекомбинантный вектор, содержащий вставку с иммуногенными свойствами, часть или фрагмент ДНК, способный вызывать иммунный ответ при представлении животному-хозяину, полипептид, эпитоп, гаптен или любую их комбинацию. Согласно различным аспектам антиген представляет собой вирус, бактерию, субъединицу организма, аутоантиген или раковый антиген.

[0058] Вакцинный состав

[0059] Настоящее изобретение относится к противогриппозным фармацевтическим составам, также упоминаемым в настоящем документе как вакцинные составы, подходящим и/или составленным для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку. Согласно вариантам осуществления составы согласно настоящему изобретению содержат эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно иллюстративным вариантам осуществления состав представляет собой моновалентный противогриппозный фармацевтический состав. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор присутствует в буфере для состава, содержащем 10 mM TRIS, 75 mM NaCl, 0,2% полисорбат 80, 5% сахарозу, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 0,5% этанол, 10 mM L-гистидин.

[0060] Согласно альтернативным вариантам осуществления репликационно-дефектный аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, может быть комбинирован с другими антигенами вируса гриппа (например, вирусный вектор, экспрессирующий антигены) с образованием мультивалентного

противогриппозного фармацевтического состава. Другие компоненты могут быть включены для индукции гуморального ответа с антителами к другому эпитопу чем в аденовирусном векторе согласно настоящему изобретению, содержащем антиген гемагглютинин вируса гриппа. Согласно другим вариантам осуществления другой (другие) компонент (компоненты) может (могут) быть включен (включены) для индукции другого звена иммунной системы, такого как клеточно-опосредованный или мукозальный иммунный ответ на антиген вируса гриппа.

[0061] Согласно иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к моновалентному противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ, сформированный с обеспечением серологической защиты субъекту-человеку в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0062] Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный и гуморальный защитный иммунный ответ, сформированный с обеспечением у субъекта-человека серологической защиты с титром антител $\text{NAI} \geq 40$ в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[0063] Согласно определенным вариантам осуществления нереплицирующимся аденовирусным вектором является человеческий аденовирус. Согласно альтернативным вариантам осуществления аденовирусом является аденовирус крупного рогатого скота, аденовирус собак, аденовирус не относящихся к человеку приматов, аденовирус курицы, аденовирус свинообразных или свиньи. Согласно иллюстративным

вариантам осуществления нереплицирующимся вирусным вектором является человеческий аденовирус.

[0064] Согласно вариантам осуществления нереплицирующиеся аденовирусные векторы являются особенно полезными для переноса гена в эукариотические клетки и разработки вакцины, и для животных моделей.

[0065] Согласно вариантам осуществления любой аденовирусный вектор (Ad-вектор), известный специалисту в данной области техники и полученный для введения млекопитающему, который может содержать и экспрессировать антиген вируса гриппа, может применяться в композициях и способах согласно настоящему изобретению. Такие Ad-векторы включают любой из раскрытых в патентах США № 6706693, 6716823, 6348450 или публикациях патентов США № 2003/0045492, 2004/0009936, 2005/0271689, 2007/0178115, 2012/0276138 (включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0066] Согласно определенным вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор может быть нереплицирующимся или репликационно-дефектным, нуждающимся в комплементарной активности E1 для репликации. Согласно вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор может включать E1-дефектные, E3-дефектные и/или E4-дефектные аденовирусные векторы, или «выпотрошенный» аденовирусный вектор, в котором вирусные гены удалены. Мутация E1 повышает предел безопасности вектора, поскольку E1-дефектные аденовирусные мутанты не способны к репликации в непермиссивных клетках. Мутация E3 усиливает иммуногенность антигена, нарушая механизм, посредством которого аденовирус понижающее регулирует молекулы МНС класса I. Мутация E4 снижает иммуногенность аденовирусного вектора посредством подавления экспрессии позднего гена, таким образом, может позволить повторную ревакцинацию с использованием того же вектора. Согласно иллюстративным вариантам осуществления рекомбинантный аденовирусный вектор представляет собой в E1- и E3-дефектный вектор.

[0067] Для репликации «выпотрошенного» аденовирусного вектора необходим вирус-помощник и специальная клеточная линия человека 293, экспрессирующая как E1a, так и Cte, условие, которое не существует в естественной среде. Вектор лишен вирусных генов, поэтому вектор в качестве носителя для вакцины является неиммуногенным и может быть многократно инокулирован для повторной вакцинации. «Выпотрошенный» аденовирусный вектор также содержит пространство размером 36 т.п.н. для размещения трансгенов, таким

образом позволяя совместно доставлять большое число антигенных генов в клетки. Специфические мотивы последовательности, такие как мотив RGD, могут быть вставлены в петлю Н-I аденовирусного вектора для повышения его инфекционности. Рекомбинант аденовируса может быть сконструирован путем клонирования специфических трансгенов или фрагментов трансгенов в любой из аденовирусных векторов, таких как описанные ниже. Рекомбинантный аденовирусный вектор используют для трансдукции эпидермальных клеток позвоночного неинвазивным образом для использования в качестве иммунизирующего агента. Аденовирусный вектор также можно использовать для инвазивных способов введения, таких как внутривенная, внутримышечная или подкожная инъекция.

[0068] Что касается доз, способов введения, составов, адъювантов и применений рекомбинантных вирусов и продуктов их экспрессии, композиции согласно настоящему изобретению можно использовать для парентерального введения или введения через слизистую оболочку, предпочтительно внутрикожным, подкожным, интраназальным или внутримышечным путями. Когда используется введение через слизистую оболочку, можно использовать пероральный, глазной или назальный пути. Согласно иллюстративным вариантам осуществления вакцинные составы согласно настоящему изобретению вводят интраназально.

[0069] Составы, которые содержат представляющий интерес аденовирусный вектор, могут быть получены в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалистам в области фармацевтики или ветеринарии. См. Пример 1. Такие составы можно вводить при дозах и способами, хорошо известными специалистам в клинической области, принимая во внимание такие факторы, как возраст, пол, вес и способ введения. Составы можно вводить отдельно или их можно вводить совместно или последовательно с композициями, например, с «другой» иммунологической композицией, или аттенуированной, инактивированной, рекомбинантной вакциной или терапевтическими композициями, тем самым обеспечивая поливалентные, или «коктейльные», или комбинированные композиции согласно настоящему изобретению и способы их использования. Согласно вариантам осуществления составы могут содержать сахарозу в качестве криопротектора и полисорбат-80 в качестве неионного поверхностно-активного вещества. Согласно некоторым вариантам осуществления составы дополнительно содержат ингибиторы свободнорадикального окисления этанол и гистидин, комплексообразователь ионов металлов этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) или другие агенты с

сопоставимой активностью (например, блокирующие или предотвращающие катализируемое ионами металлов свободнорадикальное окисление).

[0070] Составы могут присутствовать в жидком препарате для введения через слизистую оболочку, например, составах для перорального, назального, глазного введения и т.д., таких как суспензии, и препаратах для парентерального, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутривенного введения (например, инъекционное введение), таких как стерильные суспензии или эмульсии. В таких составах аденовирусный вектор может быть в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический раствор или тому подобное. Составы также могут быть лиофилизированы или заморожены. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для регулирования pH, адъюванты, консерванты и т.п., в зависимости от пути введения и желаемого препарата. Составы могут содержать по меньшей мере одно соединение адъюванта. Согласно иллюстративным вариантам осуществления вакцинные составы согласно настоящему изобретению не содержат адъювант.

[0071] Можно обратиться к стандартным текстам, таким как "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985, включенный в настоящий документ посредством ссылки, для получения подходящих препаратов, без излишних экспериментов.

[0072] Согласно вариантам осуществления эффективное количество (например, количество, которое индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ) аденовирусного вектора составляет по меньшей мере 10^9 инфекционных единиц (ifu) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека. Как понятно специалисту в данной области техники, оптимизация кодонов улучшает экспрессию гетерологичных генов в организме-хозяине. Антиген вируса гриппа согласно настоящему изобретению был кодон-оптимизирован для млекопитающего-хозяина, который включает человека.

[0073] Согласно определенным вариантам осуществления моновалентный противогриппозный состав согласно настоящему изобретению содержит эффективное количество около 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора. Согласно иллюстративным вариантам осуществления моновалентный противогриппозный состав согласно настоящему изобретению содержит эффективное

количество около 10^{10} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора. Согласно другим иллюстративным вариантам осуществления моновалентный противогриппозный состав согласно настоящему изобретению содержит эффективное количество около 10^{11} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора.

[0074] Согласно вариантам осуществления эффективное количество аденовирусного вектора в вакцинном составе согласно настоящему изобретению индуцирует комбинированный специфический в отношении вируса гриппа мукозальный (как продемонстрированного посредством измерения IgA), гуморальный (как продемонстрировано посредством сывороточных HAI и микронейтрализующих антител) и клеточно-опосредованный (как продемонстрировано посредством специфичной к антигену HA вируса гриппа Т-клеточной активации) иммунный ответ у субъекта-человека против вируса гриппа. Согласно вариантам осуществления сывороточные антитела обеспечивают серологическую защиту в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев.

[0075] Согласно вариантам осуществления комбинированный иммунный ответ обеспечивает защиту против вируса гриппа А. Согласно определенным вариантам осуществления комбинированный иммунный ответ, индуцированный моновалентным противогриппозным фармацевтическим составом согласно настоящему изобретению, обеспечивает защиту против вируса гриппа В. Согласно вариантам осуществления вирус гриппа А и/или вирусы гриппа В представляют собой «сезонный» вирус гриппа, вызывающий сезонную эпидемию, в основном в ходе зимних месяцев. Согласно другим вариантам осуществления вирус гриппа А представляет собой «пандемический» вирус гриппа, который может вызвать широко распространенное заболевание из-за новых и различных антигенных эпитопов, присутствующих в вирусе.

[0076] Вирусы гриппа А подразделяются на подтипы на основе двух белков на поверхности вируса: гемагглютинин (H) и нейраминидаза (N). Существует по меньшей мере 18 различных подтипов гемагглютинина и по меньшей мере 11 различных подтипов нейраминидазы (H1 - H18 и N1 - N11, соответственно). Вирусы гриппа А далее могут подразделяться на различные штаммы. Существующие в настоящее время подтипы вирусов гриппа А, обнаруживаемые у людей, представляют собой вирус гриппа А (H1N1) и вирус гриппа А (H3N2). Вирусы гриппа В не делятся на подтипы, но могут быть далее разделены на

линии и штаммы. Циркулирующие в настоящее время вирусы гриппа В принадлежат к одной из двух линий: В/Yamagata и В/Victoria. Соглашение о наименовании вирусов гриппа включает несколько компонентов и соответствует подходу: антигенный тип (например, А, В, С), хозяин происхождения (например, свинья, лошадь, курица и т.д., для вирусов человеческого происхождения не указывается хозяин происхождения), географическое происхождение (например, Денвер, Тайвань и т.д.), номер штамма (например, 15, 7 и т.д.), год выделения (например, 57, 2009 г. и т.д.), а для вирусов гриппа А в скобках приводят описание антигена гемагглютинина и нейраминидазы (например, (H1N1), (H5N1)).

[0077] Согласно иллюстративным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит генетическую вставку, кодирующую антиген поверхностного белка НА из вируса А/California/04/2009(H1N1). Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из подтипа H1N1 вируса гриппа А. Согласно другим определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из подтипа H3N2 вируса гриппа А. Согласно другим вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из вируса гриппа В. Согласно определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин из подтипа пандемического вируса гриппа А. Согласно другим определенным вариантам осуществления аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин (НА) сезонного вируса гриппа.

[0078] Способы применения

[0079] Настоящее изобретение относится к способу индукции комбинированного мукозального, гуморального и Т-клеточного защитного иммунного ответа у субъекта-человека против вируса гриппа, посредством чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или более. Согласно вариантам осуществления способы предусматривают интраназальное введение однократной дозы эффективного количества по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, содержащего и экспрессирующего антиген гемагглютинин вируса

гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где введение индуцирует сывороточные антитела, антитела слизистой оболочки и Т-клетки против вируса гриппа.

[0080] Согласно вариантам осуществления моновалентный противогриппозный фармацевтический состав согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения защиты против сезонного вируса гриппа. Согласно другим определенным вариантам осуществления моновалентный противогриппозный фармацевтический состав согласно настоящему изобретению применяют для обеспечения защиты против пандемического вируса гриппа.

[0081] Согласно вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают защиту против заражения подтипами вируса гриппа А. Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают защиту против заражения подтипами H1N1 и/или H3N2 вируса гриппа А. Согласно другим вариантам осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают защиту против заражения вирусом гриппа В.

[0082] Согласно вариантам осуществления серологическая защита длится по меньшей мере около 13 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления серологическая защита длится по меньшей мере около 14 месяцев или дольше.

[0083] Согласно вариантам осуществления стадия введения однократной дозы (моновалентного) противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению индуцирует антитела HAI при титре 50 или более в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев, по меньшей мере 14 месяцев или более. Согласно вариантам осуществления титр антител HAI у субъекта-человека через 12 месяцев после вакцинации (введения противогриппозного фармацевтического состава) составляет по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100.

[0084] Таким образом, как раскрыто в настоящем документе и в приведенных ниже примерах, неожиданно было обнаружено, что NasoVAX обеспечивает серологическую защиту и индуцирует скорость образования нейтрализующих антител, подобную коммерческой противогриппозной вакцине (Флузон®), иммунный ответ, который длится в течение по меньшей мере одного года, сильные мукозальный (IgA) и клеточный (например, Т-клетки, как измерено с помощью ELISpot) ответы, минимальную индукцию антител против вектора (например, Ad5), с незначительным влиянием или без влияния ранее

существующего антитела против вектора (например, Ad5), хорошо переносится при всех исследованных уровнях доз и является стабильной (т.е. содержит эффективное количество вирусных частиц) после около трех месяцев при температуре окружающей среды (например, около 20-25°C).

[0085] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к противогриппозным фармацевтическим составам (например, моновалентным), подходящим для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, причем составы содержат эффективное количество, такое как по меньшей мере около любое из 10^6 vp, 10^7 vp, 10^8 vp, 10^9 vp, 10^{10} vp или 10^{11} vp, предпочтительно по меньшей мере 10^9 vp или 10^{11} vp репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа (HA), кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления мукозальный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным, либо отдельно, либо в комбинации с другими иммунными ответами, определяют посредством анализа ELISA антител IgA против гемагглютинина (HA), гуморальный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным, либо отдельно, либо в комбинации с другими иммунными ответами, определяют посредством титра анализа подавления гемагглютинации (HAI) и/или присутствия нейтрализующего антитела, как определено посредством применения анализа микронейтрализации, необязательно как измерено с применением одного или нескольких из среднего геометрического титра (GMT), соотношения геометрических средних (GMR), показателя сероконверсии (SCR), положительной серологической реакции (SPR), и/или Т-клеточный иммунный ответ, который предпочтительно является защитным, либо отдельно, либо в комбинации с другими иммунными ответами, определяют посредством применения ELISpot γ -интерферона. Согласно некоторым вариантам осуществления состав составлен для обеспечения серологической защиты у субъекта-человека, как определено посредством присутствия у субъекта титра антител HAI ≥ 40 в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим составам, подходящим для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащим эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных

частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа (НА), кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный и гуморальный защитный иммунный ответ, сформированный с обеспечением серологической защиты у субъекта-человека, как определено посредством присутствия у субъекта титра антител $\text{NAI} \geq 40$ (или согласно некоторым вариантам осуществления ≥ 50) в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество составляет по меньшей мере около 10^{10} вирусных частиц (vp) или по меньшей мере около 10^{11} вирусных частиц (vp) и согласно другим вариантам осуществления индуцирует Т-клеточный ответ. Согласно предпочтительным вариантам осуществления состав не содержит адьювант. Согласно некоторым вариантам осуществления состав не содержит адьювант. Согласно предпочтительным вариантам осуществления антиген НА происходит из вируса гриппа А (согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления из подтипа H1N1 или H3N2) или вируса гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления состав содержит Tris HCl (pH 7,4), гистидин, сахарозу, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусную кислоту и этанол. Согласно некоторым вариантам осуществления состав содержит однократную дозу, предпочтительно интраназальную дозу, составляющую около 1×10^9 vp, около 1×10^{10} vp или около 1×10^{11} vp. Согласно некоторым вариантам осуществления состав замораживают. Согласно предпочтительным вариантам осуществления состав является стабильным при температуре окружающей среды в течение по меньшей мере около трех месяцев. Согласно вариантам осуществления температурой окружающей среды является комнатная температура от около 15 до 30°C, предпочтительно от около 20 до 25°C. Согласно некоторым вариантам осуществления состав хранят при около -20°C или около 4-8°C до распространения, которое может потребовать хранения при температуре окружающей среды. Согласно некоторым вариантам осуществления состав составлен как сезонная противогриппозная вакцина, содержащая антигены сезонного вируса гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления состав составлен в качестве пандемической противогриппозной вакцины, содержащей антигены пандемического штамма вируса гриппа А. Согласно предпочтительным вариантам осуществления репликационно-дефектный аденовирусный вектор представляет собой человеческий аденовирус серотипа 5 (Ad5). Согласно некоторым

вариантам осуществления состав содержится в контейнере, который согласно некоторым вариантам осуществления может быть выбран из группы, состоящей из стеклянной ампулы, разбрызгивателя для носа, дозатора капель, генератора аэрозоля и опрыскивателя. Согласно некоторым вариантам осуществления ампулой может быть многодозовая ампула (т.е., ампула, содержащая множество доз (например, каждая доза содержит эффективное количество вирусных частиц) состава), которую можно использовать, например, в пандемических ситуациях в сочетании с пипеткой и/или дозатором капель и введением субъектам по каплям). Согласно некоторым вариантам осуществления контейнер содержал состав в течение по меньшей мере около трех месяцев при температуре окружающей среды (например, комнатной температуре). Согласно некоторым вариантам осуществления состав составлен таким образом, что содержит по меньшей мере около 33% (т.е., позволяя уменьшение около 0,5 log (около трехкратное уменьшение)), согласно некоторым вариантам осуществления предпочтительно около 50%, инфекционных вирусных частиц после около трех месяцев при температуре окружающей среды (например, комнатной температуре) внутри контейнера. Согласно некоторым вариантам осуществления состав содержит по меньшей мере около 33%, предпочтительно около 50%, присутствующих инфекционных вирусных частиц по сравнению с сопоставимым составом, который находился в контейнерах того же типа при температуре окружающей среды в течение менее одного месяца (например, согласно некоторым вариантам осуществления позволяя уменьшение около 0,5 log (около трехкратное уменьшение)). Согласно некоторым вариантам осуществления контейнером является одноразовый контейнер и/или выполнен для интраназального введения состава. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к применению таких составов для получения лекарственного средства для введения субъекту-человеку для профилактики и/или лечения заражения вирусом гриппа у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к применению таких контейнеров для получения лекарственного средства для введения субъекту-человеку для профилактики и/или лечения заражения вирусом гриппа у субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к наборам для получения препарата лекарственного средства для введения субъекту-человеку для профилактики и/или лечения заражения вирусом гриппа у субъекта, причем указанный набор содержит по меньшей мере один из таких составов и/или контейнеров.

[0086] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к способам индукции комбинированного мукозального, гуморального и Т-клеточного защитного иммунного ответа у субъекта-человека против вируса гриппа, предусматривающим интраназальное введение субъекту-человеку по меньшей мере однократной дозы противогриппозного фармацевтического состава, раскрытого в настоящем документе, где введение индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ против вируса гриппа, и субъект-человек является серологически защищенным от заражения вирусом гриппа в течение по меньшей мере 12 месяцев после указанного введения. Согласно некоторым вариантам осуществления мукозальный защитный иммунный ответ определяют посредством анализа ELISA антител IgA против гемагглютинина (HA), гуморальный защитный иммунный ответ определяют посредством титра анализа подавления гемагглютинации (HAI) и/или присутствия нейтрализующего антитела, как определено с применением анализа микронейтрализации, необязательно как измерено с применением одного или нескольких из среднего геометрического титра (GMT), соотношения геометрических средних (GMR), показателя сероконверсии (SCR), положительной серологической реакции (SPR), и/или Т-клеточный защитный иммунный ответ определяют посредством применения ELISpot γ -интерферона. Согласно некоторым вариантам осуществления способ (способы) может (могут) предусматривать введение множества доз состава (например, в ходе эпидемической или пандемической ситуации). Согласно предпочтительным вариантам осуществления серологическая защита длится в течение по меньшей мере около 13 месяцев или по меньшей мере около 14 месяцев. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусом гриппа является вирус гриппа А (согласно некоторым предпочтительным вариантам осуществления подтип H1N1 или H3N2) и/или вирус гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированный иммунный ответ обеспечивает защиту против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В. Согласно некоторым вариантам осуществления вирусом гриппа является сезонный вирус гриппа. Согласно некоторым вариантам осуществления введение индуцирует титр антител HAI, равный по меньшей мере 50, в течение по меньшей мере 12 месяцев после введения. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект показывает иммунитет против аденовирусного вектора (где предпочтительно репликационно-дефектный аденовирусный вектор относится к человеческому аденовирусу серотипа 5 (Ad5)) до интраназального введения, причем указанный иммунитет определяют посредством

анализа подавления гемагглютинации, анализа микронеutralизации, анализа ELISA IgA и/или ELIspot. Согласно предпочтительным вариантам осуществления введение состава не значительно усиливает иммунитет против аденовирусного вектора у субъекта (например, не более около трехкратно, четырехкратно, пятикратно или шестикратно по сравнению с иммунитетом против аденовирусного вектора у субъекта до введения состава), причем согласно предпочтительным вариантам осуществления указанный иммунитет определяют посредством анализа подавления гемагглютинации, анализа микронеutralизации, анализа ELISA IgA и/или ELIspot. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект является сероположительным по человеческому аденовирусу до введения. Согласно некоторым вариантам осуществления способ (способы) может (могут) дополнительно предусматривать введение однократной дозы второго противогриппозного фармацевтического состава около через год после введения по меньшей мере одной дозы ранее введенного противогриппозного фармацевтического состава. Согласно некоторым таким вариантам осуществления второй противогриппозный фармацевтический состав содержит антигены сезонного вируса гриппа, которые являются такими же или отличными от тех, которые содержатся в ранее введенном противогриппозном фармацевтическом составе. Согласно некоторым вариантам осуществления субъектом-человеком является взрослый человек.

[0087] В настоящем документе также рассматриваются другие варианты осуществления, как будет понятно специалистам в данной области техники.

[0088] Примеры

[0089] Следующие ниже примеры представлены с целью предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как использовать варианты осуществления, представленные в настоящем документе, и не предназначены для ограничения объема раскрытия и не предназначены для ограничения, что приведенные ниже примеры представляют собой все эксперименты или единственные выполненные эксперименты. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются частями по объему, а температура указывается в градусах Цельсия. Следует понимать, что изменения в способах, как описано, могут быть сделаны без изменения фундаментальных аспектов, которые проиллюстрированы в Примерах.

[0090] Пример 1. Получение моновалентного противогриппозного фармацевтического состава (NasoVAX)

[0091] Репликационно-дефектный аденовирусный вектор, содержащий и экспрессирующий антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, получали согласно следующей методике, подробно изложенной в [Lui J. et al.; A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system; Nat. Protoc. (2007) 2(5):1236-47].

[0092] Аденовирусный вектор согласно настоящему изобретению представляет собой вектор Ad5 с делецией E1/E3 и дефектом по репликации (RD), который экспрессирует представляющий интерес белок (например, HA гриппа) в респираторных эпителиальных клетках. В случае NasoVAX вектор содержит генетическую вставку, кодирующую антиген поверхностный белок HA из вируса гриппа типа А или В. В рекомбинантном векторе Ad5 отсутствует область E1 вирусного генома (нуклеотиды 343-3511), что придает вирусу RD и отсутствие способности продуцировать инфекционные вирусные частицы при входе в клетку-хозяина. Дополнительная делеция нуклеотидов с 28132 по 30813 в области E3 вектора удаляет гены, которые участвуют в уклонении от иммунного ответа хозяина и несут существенны для репликации вируса. Экспрессионная кассета, состоящая из энхансера/промотора транскрипции цитомегаловируса для управления экспрессией гена HA, биоинженерного гена HA и сигнала полиаденилирования вируса обезьяны 40, была вставлена вместо последовательностей гена E1. На **Фиг. 1** представлено схематическое изображение вектора RD-Ad5 и указаны те последовательности из генома родительского аденовируса, которые сохраняются в векторе.

[0093] Согласно настоящему изобретению вектор содержит генетическую вставку, кодирующую антиген поверхностный белок HA из A/California/04/2009(H1N1)-подобного штамма вируса гриппа (AdcoCA09.HA).

[0094] NasoVAX получали путем размножения вектора RD-Ad5 в позволяющих репликацию клетках PER.C6 с последующей очисткой вируса от собранных инфицированных клеток, и конечный продукт включал следующие вспомогательные вещества: Tris HCl (pH 7,4), гистидин, сахароза, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусная кислота и этанол.

[0095] NasoVAX поставляли в одноразовых стеклянных ампулах, каждая из которых содержала номинальный объем 0,7 мл стерильной замороженной суспензии вакцины, составленной для доставки номинальных доз 1×10^9 vp (номер партии: 17142001), 1×10^{10} vp (номер партии: 17143001) или 1×10^{11} vp (номер партии: 17144001).

[0096] **Пример 2. Протокол исследования: исследование действия однократных нарастающих доз на иммуногенность NasoVAX**

[0097] В настоящем документе представлен протокол клинического исследования, в котором 60 здоровых взрослых рандомизировали для введения моновалентной NasoVAX на основе A/California 2009 (моновалентная вакцинная композиция согласно настоящему изобретению) при дозах 10^9 , 10^{10} или 10^{11} вирусных частиц или физиологического раствора в качестве плацебо, всем вводили в виде дозы 0,5 мл, разделенной приблизительно как 0,25 мл назального спрея в каждую ноздрю.

Таблица 1

Модель исследования

Группа	Доза (vp)	Число субъектов	
		NasoVAX	Плацебо
1	1×10^9	15	5
2	1×10^{10}	15	5
3	1×10^{11}	15	5
Всего исследовано		45	15
В общем		60	

[0098] Цели этого исследования включали: 1) оценку гуморального иммунного ответа на NasoVAX при введении с помощью интраназального спрея при однократной дозе 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp, 2) оценку клеточного иммунного ответа на NasoVAX при введении с помощью интраназального спрея при однократной дозе 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp, 3) оценку мукозального иммунного ответа NasoVAX при введении с помощью интраназального спрея при однократной дозе 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp, и 4) оценку гуморального иммунного ответа против не представленных штаммов гриппа после введения NasoVAX.

[0099] За субъектами наблюдали на предмет безопасности, включая опрос в отношении локальных и системных побочных эффектов. Меры иммунитета включали подавление гемагглютинации (HAI) и нейтрализующие антитела (MN) в дни один (1), 15, 29, 90 и 180, и ELISpot γ -интерферона в день 1 и 8. Параллельной группе из 20 подобных субъектов вводили дозу инъецируемой противогриппозной вакцины Флузон®, содержащей компонент A/California 2009, и их оценивали в те же моменты времени.

[00100] Это исследование представляло собой рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование фазы 2a для оценки безопасности и иммуногенности NasoVAX (моновалентная Adco.CA.HA), т.е. NasoVAX, у здоровых взрослых в возрасте от 18 до 49 лет. Субъектов подвергали скринингу в течение 28 дней после рандомизации (день 1). Шестьдесят субъектов, которые соответствовали всем критериям включения и не имели критериев исключения и предоставили письменное информированное согласие, были включены в три (3) последовательные группы по 20 субъектов, каждая из которых определялась дозой вакцины (1×10^9 , 1×10^{10} и 1×10^{11} vp). Внутри каждой группы и ее контрольной группы субъектов рандомизировали при соотношении 3: 1 для получения одной (1) интраназальной дозы NasoVAX или плацебо в первый день (день 1).

[0033] Контрольной группе из пяти (5) субъектов из каждой группы вводили дозу. Введение дозы оставшейся части каждой группы продолжали после того, как последний контрольный субъект завершил восьмой (8) день, если не произошло никаких событий, отвечающих критериям остановки. Образцы сыворотки собирали у каждого субъекта для анализа HAI и микронеutralизации против вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1) [штамм, гомологичный используемому для NasoVAX (моновалентная AdcoCA,09.HA)] перед введением дозы в день 1 и в дни 4, 8, 15, 29, 91 и 181. Анализ антител против Ad5 и анализы HAI и микронеutralизации против не представленных штаммов гриппа также проводили в образцах в день 1 и день 29. Образец цельной крови собирали у каждого субъекта и обрабатывали для выделения PBMC для оценки Т-клеточных ответов с помощью ELISpot перед введением дозы в день 1 и в день 8.

[0034] Образец мазка из носоглотки собирали у каждого субъекта в ходе скрининга (момент времени до введения) и в день 4, 8, 15, 29 и 91 для измерения концентрации вектора Ad5 для оценки шеддинга вакцинного вектора количественным анализом полимеразной цепной реакцией. После получения отрицательного результата для данного субъекта более

поздние образцы не тестировали. Анализ ELISA для измерения IgA также проводили на образцах мазков из скрининга и в день 29 для оценки мукозального иммунного ответа.

[00101] Иммуногенность: Иммунологические анализы проводили с использованием популяции без нарушения протокола (PP) в качестве первичной анализируемой популяции. Анализы, основанный на исследовании популяции, включающей в себя всех пациентов, первоначально отобранных для исследования (ITT), проводили и представляли только в том случае, если > 5% субъектов в любой группе с 1 дозой были исключены из популяции PP.

[00102] Ковариационный анализ (ANCOVA) использовали при анализе титра антител при каждом посещении после исходного уровня, с логарифмически трансформированным титром антител в качестве зависимой переменной, группой дозы в качестве фактора и логарифмически преобразованным исходным уровнем в качестве ковариаты. Сравнение логарифмически трансформированных титров антител после исходного уровня проводили для каждой группы дозы NasoVAX с группой плацебо и с группой Флузон®, если применялась. На основе анализа ANCOVA были получены средние значения метода наименьших квадратов (LS) и 95 CI средних значений LS для группы дозы, разность средних значений LS и CI 95% разности средних значений LS. Обратное преобразование разности средних значений LS и их 95% доверительных интервалов к исходной шкале приводит к соотношению средних геометрических, эти соотношения были включены в результаты.

[00103] Категориальные данные, полученные на основе данных анализа (например, SPR, SCR, частота ответа на лечение), были сведены в таблицу по количествам и процентам на группу дозы, а также 95% точный доверительный интервал Клоппера-Пирсона в процентах. Кроме того, сравнения ответов на лечение в каждой группе дозы NasoVAX с группой плацебо и с группой Флузон®, если применялась, проводили с использованием точного критерия Фишера.

[00104] Был добавлен анализ изменения медианы от исходного уровня для SFU ELISpot на день 8, поскольку медиана является стандартным параметром для описательного анализа необработанных данных ELISpot и для учета различий в средних значениях группы на исходном уровне.

[00105] Диаграммы рассеяния исходных уровней антител против Ad5 вдоль оси x были представлены с каждой из следующих переменных вдоль оси y: титр антител HAI на

день 29, ответ ELISpot на день 8 и титр IgA на день 29. Анализ диаграммы рассеяния влияния ранее существовавших уровней сывороточных антител против Ad5 на иммуногенность NasoVAX был неинформативным, поэтому проводили ретроспективный анализ подгруппы по серостатусу по Ad5 исходного уровня (положительный, определяемый как титр $\geq$ LLOQ, или отрицательный) на день 29, GMR анализа HAI, GMR анализа микронеutralизации на день 29, изменению медианы на день 8 от исходного уровня в SFU ELISpot и GMR IgA на день 29.

[00106] Пример 3. Комбинированный мукозальный, гуморальный и клеточно-опосредованный иммунный ответ, индуцированный моновалентным противогриппозным фармацевтическим составом (NasoVax)

[00107] Как описано в примере 2, NasoVAX (моновалентный AdcoCA09.HA), введенный посредством интраназального спрея при дозе 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp, вызывал комбинированные гуморальный и мукозальный иммунные ответы, и при дозе 1×10^{11} вызывал комбинированный иммунный ответ, включающий клеточный ответ (например, Т-клеточный).

[00108] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к моновалентному противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный защитный иммунный ответ, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[00109] Согласно другим определенным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к противогриппозному фармацевтическому составу, подходящему для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащему эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа, кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный и гуморальный защитный иммунный ответ, сформированный с обеспечением у субъекта-человека серологической защиты с титром

антител HAI ≥ 40 в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

[00110] Согласно определенным вариантам осуществления настоящее изобретение также относится к способу индукции комбинированного мукозального, гуморального и Т-клеточного защитного иммунного ответа у субъекта-человека против вируса гриппа, посредством чего субъект-человек является серологически защищенным в течение по меньшей мере 6 месяцев. Согласно вариантам осуществления способ предусматривает интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы любого противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению, где введение индуцирует сывороточные антитела, антитела слизистой оболочки и Т-клетки против вируса гриппа.

[00111] NasoVAX (моновалентная AdcoCA09.HA) вводили с помощью интраназального спрея при дозе 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp и обнаруживали вызов гуморального иммунного ответа на вирус гриппа A/California/07/2009(H1N1). Все результаты иммунологического исследования после вакцинации в группах NasoVAX были лучше, чем в группе плацебо в дни с 15 по 181. Например, очевидную зависимость от дозы наблюдали в группах NasoVAX для среднего геометрического титра (GMT), соотношения геометрических средних (GMR), показателя сероконверсии (SCR) и степени серологической защиты (SPR) для анализа HAI, и для GMT, GMR и частоты ответа на лечение (2-кратное и 4-кратное) для анализа микронеutralизации. За исключением SCR HAI в общей группе, все результаты в группе 1×10^{11} vp NasoVAX и общей на день 29 были статистически значимо выше, чем в группе плацебо ($P < 0,05$). Для анализа микронеutralизации результаты на день 29 в группе 1×10^{11} vp NasoVAX были аналогичны таковым в группе Флузон®, в анализе HAI результаты на день 29 в группе Флузон® были в целом выше, чем в группах NasoVAX. Однако средние значения GMT в группах NasoVAX оставались стабильными с течением времени, в то время как в группе Флузон® значительно снижались ко дню 181. Ретроспективный анализ подгруппы GMT HAI и микронеutralизации по исходному серостатусу по Ad5 показал некоторое подавление иммунного ответа на генетическую вставку гемагглютинаина в векторе Ad5 при двух более низких дозах, но этот эффект, по-видимому, был преодолен в группе с самой высокой дозой. См. **Фиг. 2-9**.

[00112] NasoVAX вызывала HA-специфический клеточный иммунный ответ. Результаты ELISpot на день 8 в группах NasoVAX были выше, чем в группе плацебо, и

различие было статистически значимым в группе 1×10^{11} vp (CI 95% для соотношения LS GM SFU по сравнению с плацебо: 3,5, 102,2, неперекрывающиеся CI 95% для изменения медианы от исходного уровня, $P = 0,0028$ для частоты ответа на лечение), и в целом в группе NasoVAX (CI 95% для соотношения LS GM SFU по сравнению с плацебо: 1,6, 24,5, $P = 0,0351$ для частоты ответа на лечение). Результаты в группах дозы 1×10^9 vp и 1×10^{10} vp были значительно ниже, чем в группе Флузон®, тогда как результаты в группах дозы 1×10^{11} vp были значительно выше, чем в группе Флузон®.

[00113] NasoVAX вызывала НА-специфическую мукозальную иммуногенность, не обнаруживаемую у субъектов, которые получали Флузон®. Значения GMR на день 29 показали мукозальный ответ во всех группах NasoVAX и отсутствие ответа в группах Флузон® или плацебо, различие было статистически значимым для групп дозы 1×10^{10} vp и 1×10^{11} vp (CI 95%: 1,6, 3,3 и 1,2, 2,9, соответственно). Ранее существовавшая иммуногенность в отношении Ad5 не оказывала заметного влияния на мукозальную иммуногенность.

[00114] *Гуморальный иммунный ответ*

[00115] Гуморальный иммунный ответ (т.е., антитела в крови или сыворотке) на белок НА вируса гриппа, как измерено посредством НAI, является признанным коррелятом защиты от вируса гриппа (Клинические данные, необходимые для поддержки лицензирования сезонных инактивированных противогриппозных вакцин, май 2007). Защита может быть продемонстрирована посредством ответа антител подавления гемагглютинации (HI) на вирусный штамм, включенный в вакцину, где GMT и SCR (определяемая как процент субъектов с титром HI до вакцинации $< 1:10$ и титром HI после вакцинации $\geq 1:40$ или титром HI до вакцинации $\geq 1:10$ и минимальным четырехкратным увеличением титра антител HI после вакцинации) оцениваются как в исследовании отсутствия меньшей эффективности, так и в плацебо-контролируемом исследовании. Для исследования иммуногенности при исследовании отсутствия меньшей эффективности (ответы антител HI на новую вакцину по сравнению с разрешенной противогриппозной вакциной): 1) верхняя граница двустороннего 95% доверительного интервала соотношения GMT (GMT лицензированной вакцины США, поделенное на GMT новой вакцины) не должна превышать 1,5, и 2) верхняя граница двустороннего 95% доверительного интервала для разности между SCR (SCR для лицензированной вакцины США за вычетом SCR для новой вакцины) не должна превышать 10 процентных точек.

[00116] Для исследования иммуногенности при плацебо-контролируемом исследовании ответ HI антител на новую вакцину может демонстрировать защиту, когда процент субъектов достигает титра антител HI $\geq 1:40$.

[00117] Образец крови собирали в пробирку для отделения сыворотки у каждого субъекта в день от дня -28 до дня -1, день 1, 2, 4, 8, 15, 29, 91 и 181 для оценки гуморального ответа. Анализы HAI и микронеutralизации против A/California/07/2009 (H1N1) выполняли для всех собранных образцов. После сбора образцы оставляли для свертывания при комнатной температуре в течение от 30 минут до 1 часа перед центрифугированием. Полученный сывороточный компонент крови переносили в аликвотах в криопробирки и хранили при -80 °C в течение 24-48 часов перед отправкой на сухом льду в лаборатории для испытаний. Перед тестированием образцы хранили при -80 °C.

[00118] Для анализа HAI до 9 образцов анализировали в каждом случае на 96-луночном микротитровальном планшете с V-образным дном (тестовый планшет) наряду с контролями качества (QC) на каждом планшете, состоящими из положительных (контрольная антисыворотка), отрицательных, вирусных и клеточных контролей качества. Один планшет QC включали в каждый анализ, и он содержал контроли качества и вирусный обратный титр (VBT) для подтверждения концентрации вируса на 96-луночном микротитровальном планшете с V-образным дном. Образцы обрабатывали ферментом, разрушающим рецептор, в соответствии со стандартной методикой лаборатории. И тестовые планшеты, и планшеты QC закрывали и инкубировали от 120 до 140 минут при комнатной температуре (от 15 до 30 °C). Затем в каждую лунку всех планшетов добавляли 50 мкл 1% эритроцитов лошади и инкубировали в течение 30-60 минут при комнатной температуре. Затем каждую лунку считывали на агглютинацию или отсутствие агглютинации и оценивали в соответствии со следующими критериями: 1) титр определяли по последней лунке в колонке, которая показывала отсутствие агглютинации, и ему присваивали значение обратной величины этого разведения, разведения сыворотки были обозначены как 1:10 - 1:1280, отрицательный титр обозначали как титр 5, титры ≥ 1280 обозначали как титр 1280 для использования при вычислении GMT, и 2) VBT на планшете QC должен составлять 4 единицы HA/25 мкл ± 1 разведение для валидированного анализа. Образцы анализировали с тремя повторениями для всех анализов.

[00119] Для анализа микронеutralизации до девяти (9) образцов анализировали в каждом случае на 96-луночном микротитровальном планшете с плоским дном (тестовый

планшет), наряду с QC на каждом планшете, состоящих из положительных (контрольная антисыворотка), вирусных и клеточных контролей. По меньшей мере три (3) планшета QC включали в каждый анализ, и они содержали контроли качества и VBT для подтверждения концентрации вируса на 96-луночном микротитровальном планшете с плоским дном. Пятьдесят микролитров (50 мкл) разведенного вируса (разведенного до целевого VBT в диапазоне от 1,17 до 9, $38 \times \text{TCID}_{50}$ [количество вируса, необходимое для уничтожения 50% инфицированных хозяев или для достижения цитопатического эффекта в 50% инокулированных клеток культуры ткани]/50 мкл) добавляли во все лунки всех колонок, содержащих сыворотку, и лунки, обозначенные как вирусный контроль. Вирус не добавляли в лунки клеточного контроля. И тестовые планшеты, и планшеты QC инкубировали при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ с 0% - 5% CO_2) в течение от 2 до 2,5 часов. Сто микролитров (100 мкл) клеток MDCK ($1,5 \times 10^5$ клеток/мл в разбавителе, конфлюэнтность от 50% до 99%) добавляли во все лунки каждого планшета. Планшеты инкубировали в течение от 19 до 21 часа при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ с $5\% \pm 1\%$ CO_2 . Среду удаляли из всех планшетов, и каждую лунку промывали 100 мкл физиологического раствора, забуференного фосфатом Дульбекко (DPBS, $1 \times$ концентрация). DPBS удаляли, и в каждую лунку добавляли 100 мкл фиксатора. Планшеты закрывали и инкубировали при комнатной температуре (от 15°C до 30°C) в течение 10-15 минут. Фиксатор удаляли, и планшеты сушили на воздухе перед 3-кратной промывкой с 200 мкл/лунку промывочного буфера. В каждую лунку добавляли 100 мл разведенного первичного антитела, и планшеты инкубировали в течение от 1 до 1,25 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали четыре раза с 200 мкл/лунку промывочного буфера, и в каждую лунку добавляли 100 мл разведенного вторичного антитела. Планшеты инкубировали в течение от 1 до 1,25 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали четыре раза с 200 мл/лунку промывочного буфера и добавляли 100 мл свежего субстрата (при слабом освещении) в каждую лунку с последующей инкубацией в течение 15-25 минут при слабом освещении при комнатной температуре. Стоп-раствор (100 мл) немедленно добавляли в каждую лунку, и измеряли оптическую плотность при 490-495 нм. Полученные данные оценивали в соответствии со следующими критериями: 1) пороговое значение планшета для каждого планшета вычисляли в соответствии со следующим уравнением: (среднее значение лунок вирусного контроля - среднее значение лунок клеточного контроля)/2, и 2) образцы сыворотки со значением оптической плотности ниже порогового значения планшета были положительными в отношении нейтрализующего антитела, тогда как образцы со значением

выше порогового значения планшета были отрицательными в отношении нейтрализующего антитела. Значения VBT со значением оптической плотности выше порогового значения планшета были положительными в отношении репликации вируса. Значения VBT со значением оптической плотности ниже порогового значения планшета были отрицательными в отношении репликации вируса. Титр вычисляли как обратную величину наивысшего разведения, оцененного как положительное. Отрицательному титру (все значения оптической плотности выше порогового значения планшета) присваивали значение 5. Разведения обозначали от 1:10 до 1: 1280. Титры > 1280 обозначали как титр 1280 для использования в вычислениях GMT, но в данных таблиц указано > 1280. Исключения включали: если значение оптической плотности, которое пересекало пороговое значение планшета (значение падало ниже порогового значения, поднималось выше него (обозначено «флажком»), затем снова падало ниже), тогда титр обозначали на основе конечного значения оптической плотности, которое падало ниже порогового значения планшета, если не было ≥ 2 -кратной разницы между начальным падением оптической плотности и тем значением, когда она снова поднималась выше порогового значения, при этом образцы с более чем одним флажком не принимались, если только при оценке данных не была отмечена механическая проблема или окончательное значение оптической плотности не превышало двух разведений от последнего флажка. Значения, которые пересекали пороговое значение планшета в VBT, сообщали как титр до пересечения, и, при оценке значений оптической плотности на всех планшетах, тенденцию данных оценивали вниз и вдоль планшетов, чтобы найти признаки механических проблем (например, частичное или полное засорение наконечника, которое может привести к значениям оптической плотности выше или ниже ожидаемых). Эти значения были приняты во внимание при оценке и обозначении окончательного титра образца.

[00120] Тестовые планшеты и анализ принимали, если выполнялись следующие критерии: 1) положительные значения QC на отдельных тестовых планшетах находились в пределах ($\pm$) 1 разведения от вычисленного медианного значения для анализа, или отдельный планшет отклоняли, 2) медианное значение VBT, определенное для всех принятых планшетов QC для анализа, находилось в диапазоне от 1,17 до 9,38, или анализ отклоняли, и 3) по меньшей мере 5 из 9 образцов сыворотки на тестовом планшете совпадают по меньшей мере с 1 из их соответствующих повторов, или все 9 тестовых образцов повторно анализировали. Образцы анализировали с тремя повторениями для всех анализов.

[00121] Все результаты после вакцинации в группах NasoVAX были выше, чем в группе плацебо на день с 15 по 181. В группах NasoVAX видна явная зависимость эффекта от дозы для всех измеренных конечных точек. За исключением SCR HAI в общей группе, все результаты гуморальной иммуногенности в группах NasoVAX 1×10^{11} vp и общей на день 29 были статистически значимо выше, чем в группе плацебо. См. **Фиг. 2, 3, 6 и 7.**

Таблица 1

Гуморальный иммунный ответ на NasoVAX на день 29 для группы дозы

Статистические данные	NasoVAX				Плацебо N = 15	Флузон N = 20
	1×10 ⁹ vp N = 15	1×10 ¹⁰ vp N = 15	1×10 ¹¹ vp N = 15	Общая N = 45		
Анализ HAI						
GMT LS (CI 95%) ^a	87,2 (52,7, 144,3)	136,1 (81,7, 226,6)	164,0 (99,0, 271,6)	124,8 (92,3, 167,0)	31,3 (18,9, 52,0)	277,7 (179,4, 429,9)
соотношение GMT LS по сравнению с плацебо (CI 95%) ^a	2,8 (1,4, 5,7)	4,3 (2,1, 9,0)	5,2 (2,6, 10,7)	4,0 (2,2, 7,2)		
соотношение GMT LS по сравнению Флузоном (CI 95%) ^a	0,3 (0,2, 0,6)	0,5 (0,3, 1,0)	0,6 (0,3, 1,2)	0,4 (0,3, 0,8)		
GMR (CI 95%)	2,1 (1,1, 4,2)	2,2 (1,2, 4,3)	4,3 (1,5, 12,0)	2,7 (1,8, 4,2)	0,9 (0,7, 1,2)	5,7 (2,9, 11,2)
SCR ^b (CI 95%)	13,3% (1,7%, 40,5%)	26,7% (7,8%, 55,1%)	33,3% (11,8%, 61,6%)	24,4% (12,9%, 39,5%)	0,0% (0,0%, 21,8%)	50,0% (27,2%, 72,8%)
<i>P</i> -значение по сравнению с плацебо ^c	0,4828	0,0996	0,0421	0,0505		
<i>P</i> -значение по сравнению с Флузоном ^c	0,0340	0,2958	0,4916	0,0506		

SPR ^d (CI 95%)	80,0% (51,9%, 95,7%)	100,0% (78,2%, 100,0%)	100,0% (78,2%, 100,0%)	93,3% (81,8%, 98,6%)	53,3% (26,6%, 78,7%)	95,0% (75,1%, 99,9%)
<i>P</i> -значение по сравнению с плацебо ^c	0,2451	0,0063	0,0063	0,0013		
<i>P</i> -значение по сравнению с Флузоном ^c	0,2924	1,000	1,000	1,000		
Анализ микронейтрализации						
GMT (CI 95%)	44,9 (21,8, 92,3)	113,1 (58,0, 220,8)	142,5 (93,6, 217,1)	89,8 (62,6, 128,8)	17,8 (9,1, 35,0)	162,8 (95,8, 276,6)
GMR (CI 95%)	2,1 (1,0, 4,2)	2,5 (1,3, 4,8)	5,2 (2,2, 12,0)	3,0 (2,0, 4,5)	1,1 (1,0, 1,2)	6,2 (2,8, 13,8)
частота ответа на лечение /2-кратное увеличение (CI 95%)	40,0% (16,3%, 67,7%)	46,7% (21,3%, 73,4%)	73,3% (44,9%, 92,2%)	53,3% (37,9%, 68,3%)	0,0% (0,0%, 21,8%)	70,0% (45,7%, 88,1%)
<i>P</i> -значение по сравнению с плацебо ^c	0,0169	0,0063	<0,0001	0,0001		
<i>P</i> -значение по сравнению с Флузоном ^c	0,0966	0,1871	1,0000	0,2785		
частота ответа на лечение /4-кратное увеличение (CI 95%)	13,3% (1,7%, 40,5%)	26,7% (7,8%, 55,1%)	53,3% (26,6%, 78,7%)	31,1% (17,6%, 44,6%)	0,0% (0,0%, 21,8%)	50,0% (27,2%, 72,8%)
<i>P</i> -значение по сравнению с плацебо ^c	0,4828	0,0996	0,0022	0,0130		
<i>P</i> -значение по сравнению с Флузоном ^c	0,0340	0,2958	1,0000	0,1716		

Значения, выделенные жирным шрифтом, статистически выше значений в группе плацебо.

Аббревиатуры: CI = доверительный интервал, GMT = средний геометрический титр, GMR = соотношение геометрических средних, HAI = подавление гемагглютинации, LS = метод наименьших квадратов;

SCR = показатель сероконверсии, SPR = степень серологической защиты, vp = вирусные частицы.

a. Ковариационный анализ использует логарифмически преобразованный уровень в качестве зависимой переменной, группу дозы в качестве фактора и логарифмически преобразованный исходный уровень в качестве ковариаты. Различия средних оценок LS и CI 95% были преобразованы обратно в исходную шкалу, что привело к соотношению средних геометрических.

b. Процент субъектов с титром HAI $\geq 1:40$

c. Точный критерий Фишера

d. Процент субъектов с титром HAI до вакцинации $< 1:10$ и титром после вакцинации $\geq 1:40$ (который в 4 раза превышает нижний предел количественного определения анализа), или титром HAI на исходном уровне $\geq 1:10$ и 4-кратным увеличением титра HAI после вакцинации относительно исходного уровня

[00122] *Клеточный иммунный ответ*

[00123] Образец крови собирали в гепаринизированную пробирку у каждого субъекта на день от -28 до -1, день 1, 2, 4, 8, 15, 29, 91 и 181 для оценки НА-специфического Т-клеточного ответа посредством ELISpot.

[00124] PBMC выделяли с помощью стандартной методики градиента плотности Ficoll-Нугае со стадиями центрифугирования, отрегулированными для получения оптимального выхода и жизнеспособности с помощью оборудования на рабочем месте. PBMC криоконсервировали при плотности 10^7 клеток/мл и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ перед отправкой на сухом льду в лабораторию для исследований. Перед исследованием образцы хранили в жидком азоте.

[00125] После оттаивания PBMC добавляли при концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток на лунку в 96-луночный планшет ELISpot с поливинилдифторидной мембраной, покрытый иммобилизованным антителом к интерферону гамма (IFN- γ). PBMC стимулировали в течение 18 часов в присутствии 7 объединенных пептидов, происходящих из НА, положительного и отрицательного контроля. Пулы пептидов, происходящих из НА (от 19 до 20 пептидов в каждом), получали из 139 коротких пептидов (длиной 14 или 15 аминокислот, перекрытие 11 аминокислот), полученных из последовательности НА из штамма A/California/04/2009 (H1N1). В качестве положительного контроля использовали пул пептидов CEF (цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра и вирус гриппа) и фитогемагглютинин. Отрицательные контроли были основаны на нерелевантном пуле пептидов гликопротеина миеллина олигодендроцитов человека и только на среде. Все условия тестировали с тремя повторениями, за исключением только среды, которую тестировали с двумя повторениями. После обнаружения на планшете ELISpot IFN- γ количество пятен подсчитывали автоматическим счетчиком ELISpot и выражали как SFU/ 10^6 PBMC.

[00126] На **Фиг. 4** и **8** приведены данные клеточного иммунного ответа (SFU из ELISpot) на день 8. Исходное геометрическое среднее значение SFU/ 10^6 клеток широко варьировалось в группах дозы, поэтому был добавлен ретроспективный анализ изменения от исходного уровня. Результаты после вакцинации в группах NasoVAX были выше, чем в группе плацебо, и различие было статистически значимым в группе 1×10^{11} vp, общей группе NasoVAX для LS GM SFU и частоты ответа на лечение, и в группе 1×10^{11} vp для изменения медианы от исходного уровня.

[00127] *Мукозальный иммунный ответ*

[00128] Образцы мазков из носоглотки, собранные на стадии скрининга и на день 29, использовали для оценки мукозального ответа с помощью анализа ELISA антител IgA против НА. После взятия пробы мазка из носоглотки его замораживали при -80 °С перед отправкой на сухом льду в лабораторию для исследования и хранили при -20 °С перед использованием.

[00129] Белок НА вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1) адсорбировали на поверхности лунок микротитровального планшета. Экстракт мазка из носа (т.е. образец) инкубировали с НА (т.е. позволяли ему связываться с НА), и в лунки добавляли биотинилированное детектирующее антитело для обнаружения захваченного IgA (т.е. IgA слизистой оболочки). Титр IgA против НА определяли с использованием метода, основанного на пороговой оптической плотности. Общий IgA на образец также определяли количественно с использованием набора для количественного определения IgA человека посредством ELISA, E80-102 (Bethyl Laboratories; Montgomery, TX). Результаты были представлены как соотношение НА-специфический IgA (Ед/мл) и общего Ig A (мкг/мл) для того, чтобы можно было провести прямое сравнение между разными образцами мазков из носа. Результаты переносили в электронном виде в базу данных исследования.

[00130] В **Таблице 2** и на **Фиг. 5** приведены данные по мукозальному иммунному ответу на белок НА штамма вакцины (IgA посредством ELISA) на день 29. В отличие от гуморальных антител (т.е. антител, присутствующих в крови), GMT IgA слизистой оболочки были одинаковыми во всех группах на исходном уровне (диапазон от 1,8 до 3,0). GMR на день 29 не показали мукозального ответа в группе плацебо и показали мукозальный ответ во всех группах NasoVAX, при этом разница с плацебо была статистически значимой для групп дозы 1×10^{10} vp и 1×10^{11} vp.

Таблица 2**Мукозальный иммунный ответ на NasoVAX на день 29 для группы дозы**

Статистические данные	NasoVAX				Плацебо N = 15	Флузон® N = 20
	1×10 ⁹ vp N = 15	1×10 ¹⁰ vp N = 15	1×10 ¹¹ vp N = 15	Общая N = 45		
GMT (CI 95%)	3,3 (2,1, 5,1)	5,6 (3,8, 8,3)	5,4 (3,2, 9,4)	4,6 (3,6, 6,0)	2,4 (2,0, 2,9)	1,8 (1,2, 2,3)
GMR (CI 95%)	1,4 (0,9, 2,0)	2,3 (1,6, 3,3)	1,8 (1,2, 2,9)	1,8 (1,1, 1,2)	1,0 (0,8, 1,3)	1,0 (0,8, 1,2)
Аббревиатуры: CI = доверительный интервал, GMT = средний геометрический титр, GMR = соотношение геометрических средних, vp = вирусных частиц.						

[00131] Обсуждение

[00132] Гуморальная, клеточная и мукозальная иммуногенность, вызванная NasoVAX (моновалентная AdcoCA09.HA), вводимой с помощью интраназального спрея при однократной дозе 1×10⁹, 1×10¹⁰ или 1×10¹¹ vp, показала потенциал для устранения некоторых из недостатков существующих в настоящее время вариантов противогриппозной вакцины, отмеченных в недавнем обзоре NIAID (Erbelding EJ, et al. (2018)), в частности, недостаточной устойчивости иммунного ответа, слабого клеточного ответа и отсутствия тканевого иммунитета (т.е. слизистых оболочек). В этом исследовании гуморальный иммунный ответ (включая измеренный с помощью анализа HAI, стандартный коррелят защиты) оставался стабильным в группах NasoVAX в течение шести (6) месяцев после введения дозы, в то время как ответ в группе Флузон® существенно снижался за этот период времени.

[00133] Клеточная и мукозальная иммуногенность может играть роль в сокращении продолжительности, тяжести и трансмиссивности гриппа (Gould, et al. Nasal IgA provides protection against human influenza challenge in volunteers with low serum influenza antibody titre. Front Microbiol. 2017;8:900; McMichael, et al. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. N Engl J Med. 1983;309:13–7; Seibert, et al. Recombinant IgA is sufficient to prevent influenza virus transmission in guinea pigs. J Virol. 2013;87:7793–804; Wilkinson, et al. Preexisting influenza specific CD4+ T-cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. Nat Med. 2012;18:274–80), характеристик, которые особенно важны в условиях пандемии гриппа. Мукозальный иммунный ответ, наблюдаемый в этих исследованиях, может

оказывать эффект в дополнение к гуморальным и клеточным путям ответа, блокируя грипп в очаге инфекции. В этом исследовании клеточный ответ, вызванный NasoVAX, был выше, чем ответ на Флузон®, а мукозальный иммунный ответ был вызван NasoVAX, но не был вызван введением вакцины Флузон.

[00134] Результаты иммуногенности этого исследования ясно показывают, что доза 1×10^{11} vp вызывает сильную гуморальную, клеточную и мукозальную иммуногенность. Эффект дозы 1×10^{10} vp был менее явным, возможно, из-за необычно высоких титров HAI и микронеutralизации исходного уровня в этой группе.

[00135] Пример 4. Сравнение иммунного ответа, индуцированного моновалентным противогриппозным фармацевтическим составом (NasoVAX) и вакциной Флузон® (Fluzone®)

[00136] Иммуногенность, включая способность индуцировать гуморальный, клеточный и мукозальный иммунный ответ, оценивали для моновалентного противогриппозного фармацевтического состава согласно настоящему изобретению и сравнивали с Флузон®. Флузон® представляет собой четырехвалентную противогриппозную вакцину высокой дозы, вводимую путем инъекции, против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В, присутствующих в вакцине. Антитела к HAI измеряли на день 29, 91 и 181, и результаты представлены для анализа HAI, показателя сероконверсии и серологической защиты. См. **Фиг. 9**.

[00137] Для анализа микронеutralизации (MN), как показано на **Фиг. 3**, на день 29 результаты в группе 1×10^{11} vp NasoVAX были аналогичны результатам в группе Флузон®, для анализа HAI результаты на день 29 в группе Флузон в целом были выше, чем в группах NasoVAX. Тем не менее, средние значения GMT для обоих анализов и значения GMR, SCR и SPR HAI в группах NasoVAX оставались стабильными с течением времени, в то время как в группе Флузон® значения существенно снижались ко дню 181. См. **Фиг. 9**.

[00138] NasoVAX (моновалентная AdcoCA09.HA), введенная посредством интраназального спрея при дозах 1×10^9 , 1×10^{10} или 1×10^{11} vp, вызывала гуморальный иммунный ответ на вирус гриппа A/California/07/2009(H1N1). Все результаты после вакцинации в группах NasoVAX были выше, чем в группе плацебо от дня 15 до дня 181. Очевидный эффект зависимости от дозы наблюдался в группах NasoVAX для GMT, GMR, SCR и SPR анализа HAI и для GMT, GMR и частоты ответа на лечение (2-кратная и 4-

кратная) анализа микронеutralизации. За исключением SCR HAI в общей группе, все результаты в группе NasoVAX 1×10^{11} vp и общей группе на день 29 были статистически значимо выше, чем в группе плацебо ($P < 0,05$). Для анализа микронеutralизации на день 29 результаты для группы 1×10^{11} vp NasoVAX были подобны результатам для группы Флузон[®], а для анализа HAI результаты на день 29 для группы Флузон[®] были в общем выше, чем для групп NasoVAX. Однако средние GMT в группах NasoVAX оставались стабильными с течением времени, тогда как для группы Флузон[®] существенно снижались ко дню 181.

[00139] Для анализа клеточной иммуногенности (ELISpot) результаты для групп дозы 1×10^9 vp и 1×10^{10} vp были слегка ниже, чем для группы Флузон[®], тогда как результаты для группы дозы 1×10^{11} vp были существенно выше, чем для группы Флузон[®]. См. Фиг. 8.

[00140] NasoVAX вызывала штамм-специфический клеточный иммунный ответ. Результаты ELISpot на день 8 в группах NasoVAX были выше, чем в группе плацебо, и различие было статистически значимым для группы дозы 1×10^{11} vp (CI 95% для соотношения LS GM SFU по сравнению с плацебо: 3,5, 102,2, неперекрывающиеся CI 95% для изменения медианы от исходного уровня, $P = 0,0028$ для частоты ответа на лечение) и общей группы NasoVAX (CI 95% для соотношения LS GM SFU по сравнению с плацебо: 1,6, 24,5, $P = 0,0351$ для частоты ответа на лечение). Результаты для групп дозы 1×10^9 vp и 1×10^{10} vp были слегка ниже, чем в группе Флузон[®], тогда как результаты в группах дозы 1×10^{11} vp были значительно выше, чем в группе Флузон[®]. См. Фиг. 8.

[00141] Для анализа мукозальной иммуногенности (ELISA антител IgA в образцах мазка носоглотки), GMR на день 29 показали мукозальный ответ во всех группах NasoVAX и не показали мукозальный ответ в группе Флузон[®], причем различие было статистически значимым для группы дозы 1×10^{10} vp и 1×10^{11} vp (CI 95% для GMT, и GMR не перекрывается с CI 95% для группы Флузона). См. Фиг. 5.

[00142] NasoVAX вызывала штамм-специфическую мукозальную иммуногенность, не обнаруживаемую у субъектов, которые получали Флузон[®]. GMR на день 29 показал мукозальный ответ во всех группах NasoVAX и не показал ответ в группах Флузон[®] или плацебо, причем различие было статистически значимым для групп дозы 1×10^{10} vp и 1×10^{11} vp (CI 95%: 1,6, 3,3 и 1,2, 2,9, соответственно).

[00143] Пример 5. Продолжительность: серологическая защита в течение 13 месяцев, индуцированная моновалентным противогриппозным фармацевтическим составом (NasoVAX)

[00144] Указанное выше исследование, раскрытое в Примерах 2 и 3, продлевали на дополнительные шесть (6) месяцев, при этом образец крови собирали в пробирку для отделения сыворотки у каждого доступного субъекта между днем 403 и днем 433 для оценки гуморального ответа. В общей сложности восемь из 15 субъектов в группе с дозой 1×10^{11} vp вернулись для оценки через год. Анализы HAI и микронеutralизации против A/California/07/2009 (H1N1) выполняли для всех восьми отобранных образцов. Все субъекты, которые участвовали в расширенном исследовании, продемонстрировали серологическую защиту в течение по меньшей мере 13 месяцев после введения моновалентной противогриппозной вакцины согласно настоящему изобретению. См. Таблица 3 и Фиг. 10.

Таблица 3

Серологическая защита через 13 - 14 месяцев после вакцинации

Субъект	Дата введения вакцины	Сбор крови на день 365	Дни	Серологически защитный титр HAI
1	11/28/2017	1/21/2019	419	226
2	12/12/2017	1/21/2019	405	56,6
3	12/13/2017	1/23/2019	406	320
4	12/13/2017	1/22/2019	405	160
5	12/14/2017	2/18/2019	431	320
6	12/14/2017	1/21/2019	403	320
7	12/13/2017	1/22/2019	405	226
8	12/12/2017	2/18/2019	433	80

[00145] Пример 6. Шеддинг NasoVAX и антитела против вектора NasoVAX

[00146] NasoVAX вводили субъектам-людям интраназально при однократной дозе 10^9 vp, 10^{10} vp или 10^{11} vp. Через четыре, восемь и 15 дней после введения дозы у каждого субъекта собирали образцы мазков из носоглотки и определяли концентрацию вектора Ad5 в каждой временной точке количественно с помощью анализа полимеразной

цепной реакции (ПЦР). Как показано на **Фиг. 11**, зависимый от дозы шеддинг введенной дозы вектора NasoVAX был обнаружен вплоть до 8 дня после введения дозы и не был обнаружен на день 15. Репликационно-компетентный вирус не обнаружен.

[00147] Анализ микронеutralизации аденовируса (MN) проводили для определения у субъектов антител против аденовируса. Разведения сывороток человека смешивали с постоянным количеством репликационно-дефектного вектора Ad5, который экспрессирует зеленый флуоресцентный белок (GFP) из промотора цитомегаловируса человека (CMV) (названный Ad5.CMV-GFP), и инкубировали для того, чтобы дать возможность произойти потенциальной нейтрализации. Эти смеси затем инокулировали на клетки VERO E6 в 96-луночной планшете и инкубировали в течение приблизительно трех дней. В ходе этой инкубации Ad5.CMV-GFP, который не был нейтрализован, инфицирует клетки и продуцирует GFP, который использовался в качестве средства получения данных анализа. Интенсивность флуоресценции GFP сравнивали между тестируемыми образцами и контролями, которые либо инокулировали только вирусом, либо без вируса, чтобы определить уровень произошедшей нейтрализации. Регистрируемое значение для этого анализа представляет собой значение MN50, соответствующее обратному значению разведения сыворотки, которое приводит к нейтрализации 50% введенного Ad5.CMV-GFP. **Фиг. 11** также иллюстрирует GMR антител против компонента аденовирусного вектора NasoVAX (Ad5) после интраназального введения однократной дозы 10^9 vp, 10^{10} vp или 10^{11} vp NasoVAX. Как показано на этом чертеже, введение наивысшей дозы (10^{11} vp) неожиданно привело только к около 2,3-кратной индукции антител против вектора Ad5 у субъектов по сравнению с контролем. Это важный вывод, поскольку он указывает на то, что интраназальный путь введения может использоваться для повторного введения NasoVAX или, возможно, других векторов на основе Ad5.

[00148] **Фиг. 12** показывает влияние ранее существовавшего иммунитета против Ad5 на серостатус по Ad5 после интраназального введения субъектам однократной дозы (10^{11} vp) NasoVAX. Как показано на этом чертеже, ранее существовавший иммунитет против Ad5 («сероположительный по Ad5» (медианный титр в 22 раза выше нижнего предела количественного определения (LLOQ))) оказывал незначительное влияние на гуморальный иммунитет (HAI), микронеutralизацию (MN), мукозальный иммунитет (IgA) или клеточный (ELISpot) иммунитет против Ad5 после интраназального введения дозы NasoVAX. Это еще

одно важное открытие, поскольку оно указывает на то, что NasoVAX можно вводить интраназально даже субъекту с ранее существовавшим иммунитетом к Ad5.

[00149] Пример 7. Стабильность NasoVAX при комнатной температуре

[00150] В этом примере описана долгосрочная стабильность NasoVAX в виде жидкого состава при комнатной температуре. Долгосрочная стабильность при комнатной температуре является желательной характеристикой вакцин, которые могут использоваться в ситуациях, когда охлаждение или другие средства для стабилизации состава могут быть недоступны. Это имеет важное значение в эпидемических или пандемических ситуациях, когда вакцины необходимо доставлять в отдаленные районы, где может не хватать оборудования для поддержания составов при температуре охлаждения. Как показано в **Таблицах 4 и 5** ниже, составы с низкой дозой (доза 2×10^9 vp/мл) и высокой дозой (доза 2×10^{11} vp/мл), соответственно, получали и хранили при 25 °C в стеклянных ампулах в течение одного, трех и шести месяцев. Жизнеспособность векторов NasoVAX определяли с использованием флуоресцентного анализа фокусообразующих единиц (FFU) аденовируса. Вкратце, анализ FFU проводили путем инфицирования клеточных монослоев подходящим разведением NasoVAX и инкубирования в течение 24-48 часов. Затем клетки промывали, проверяли, фиксировали (например, ледяной 90%-ный метанол в течение четырех минут) и снова промывали. Затем добавляли антитело против Ad5 при различных разведениях (антитело не входило в контрольные образцы), а затем добавляли агент обнаружения (например, NCL-Adeno (Novocastra, Newcastle, UK)) в соответствующих условиях (например, десять минут при комнатной температуре при встряхивании). Затем клетки промывали и определяли общее количество инфекционных частиц (например, с помощью цифрового светорассеяния (DLS)). Как показано в **Таблицах 4 и 5**, составы NasoVAX с низкой и высокой дозой были стабильны в течение по меньшей мере трех месяцев при комнатной температуре.

Таблица 4*Данные по стабильности для NasoVAX (доза 2×10^9 vp/мл)*

Анализ	Момент времени оценки стабильности			
	T=0M	T=1M	T=3M	T=6M
Внешний вид	жидкий, бесцветный, полупрозрачный, видимые частицы вещества не наблюдаются	жидкий, бесцветный, полупрозрачный, видимые частицы вещества не наблюдаются	жидкий, бесцветный, прозрачный, видимые частицы вещества не наблюдаются	жидкий, бесцветный, прозрачный, видимые частицы не наблюдаются
pH	7,5	7,5	7,7	7,5
vp согласно ВЭЖХ	$1,2 \times 10^9$ vp/мл	$1,1 \times 10^9$ vp/мл	$0,9 \times 10^9$ vp/мл	$1,2 \times 10^9$ vp/мл
Флуоресцентный анализ фокусообразующих единиц (FFU) аденовируса	$1,1 \times 10^8$ FFU/мл	$2,3 \times 10^8$ FFU/мл	$0,7 \times 10^8$ FFU/мл	$0,1 \times 10^8$ FFU/мл
% Инфекционных частиц	9%	21%	8%	0,4%
Агрегация согласно DLS	66,7 нм	139,7 нм (23% PD)	91,9 нм (14% PD)	107,5 нм (8% PD)

Таблица 5*Данные по стабильности NasoVAX (доза 2×10^{11} vp/мл)*

Анализ	Момент времени оценки стабильности			
	T=0M	T=1M	T=3M	T=6M
Внешний вид	жидкий, бесцветный, полупрозрач- ный, видимые частицы вещества не наблюдаются	жидкий, бесцветный, полупрозрач- ный, видимые частицы вещества не наблюдаются	жидкий, бесцветный, полупрозрач- ный, видимые частицы вещества не наблюдаются	жидкий, бесцветный, полупрозрач- ный, видимые частицы не наблюдаются
pH	7,6	7,5	7,5	7,6
vp согласно ВЭЖХ	$1,3 \times 10^{11}$ vp/мл	$1,0 \times 10^{11}$ vp/мл	$0,4 \times 10^{11}$ vp/мл	$1,2 \times 10^{11}$ vp/мл
Флуоресцентный анализ фокусиру- ющих единиц (FFU) аденовируса	$0,9 \times 10^{10}$ FFU/мл	$0,9 \times 10^{10}$ FFU/мл	$0,5 \times 10^{10}$ FFU/мл	$0,1 \times 10^{10}$ FFU/мл
% Инфекционных частиц	7%	9%	12%	0,5%
Агрегация согласно DLS	122 нм	118,2 нм (19% PD)	116,9 нм (13% PD)	115,5 нм (14% PD)

[00151] Хотя определенные варианты осуществления были описаны в контексте предпочтительных вариантов осуществления, понятно, что специалистами в данной области техники могут быть предложены вариации и модификации. Следовательно, предполагается, что приложенная формула изобретения охватывает все такие эквивалентные варианты, которые входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противогриппозный фармацевтический состав, подходящий для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащий:

эффективное количество по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа (HA), кодон-оптимизированный для субъекта-человека, причем эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, и

фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

2. Состав по п. 1, где мукозальный иммунный ответ определен посредством анализа ELISA антител IgA против гемагглютинина (HA), гуморальный иммунный ответ определен посредством титра анализа подавления гемагглютинации (HAI) и/или присутствия нейтрализующего антитела, как определено с применением анализа микронейтрализации, необязательно как измерено с применением одного или нескольких из среднего геометрического титра (GMT), соотношения геометрических средних (GMR), показателя сероконверсии (SCR), положительной серологической реакции (SPR), и/или Т-клеточный иммунный ответ определен посредством применения ELISpot γ -интерферона.

3. Состав по п. 1 или 2, где комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ является защитным.

4. Состав по п. 3, где состав составлен для обеспечения серологической защиты у субъекта-человека, как определено посредством присутствия у субъекта титра антител HAI ≥ 40 в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа.

5. Фармацевтический состав, подходящий для интраназального введения однократной дозы субъекту-человеку, содержащий:

эффективное количество по меньшей мере 10^9 вирусных частиц (vp) репликационно-дефектного аденовирусного вектора, который содержит и экспрессирует антиген гемагглютинин вируса гриппа (HA), кодон-оптимизированный для субъекта-человека, где эффективное количество индуцирует комбинированный мукозальный и гуморальный защитный иммунный ответ, сформированный с обеспечением серологической защиты у субъекта-человека, как определено посредством присутствия у субъекта титра антител HAI ≥ 40 в течение по меньшей мере 12 месяцев против вируса гриппа, и

фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

6. Состав по п. 5, где эффективное количество составляет по меньшей мере 10^{10} вирусных частиц (vp).

7. Состав по п. 5, где эффективное количество составляет по меньшей мере 10^{11} вирусных частиц (vp) и дополнительно индуцирует Т-клеточный ответ.

8. Состав по любому предшествующему пункту, где титр антител HAI составляет по меньшей мере 50.

9. Состав по любому предшествующему пункту, где состав не содержит адъювант.

10. Состав по любому предшествующему пункту, где антиген НА происходит из вируса гриппа А, подтипа H1N1 вируса гриппа А или подтипа H3N2 вируса гриппа А.

11. Состав по любому предшествующему пункту, содержащий Tris HCl (pH 7,4), гистидин, сахарозу, хлорид натрия, хлорид магния, полисорбат 80, этилендиаминтетрауксусную кислоту и этанол.

12. Состав по любому предшествующему пункту, содержащий однократную дозу около 1×10^9 vp, около 1×10^{10} vp или около 1×10^{11} vp.

13. Состав по любому предшествующему пункту, где состав заморожен.

14. Состав по любому предшествующему пункту, где состав является стабильным при температуре окружающей среды в течение до около трех месяцев.

15. Состав по п. 14, где температура окружающей среды составляет от около 15 до 30°C или от около 20 до 25°C.

16. Состав по любому предшествующему пункту, где состав составлен как сезонная противогриппозная вакцина, содержащая антигены НА сезонного вируса гриппа.

17. Состав по любому предшествующему пункту, где состав составлен как пандемическая противогриппозная вакцина, содержащая антигены НА пандемического вируса гриппа.

18. Состав по любому предшествующему пункту, где репликационно-дефектный аденовирусный вектор представляет собой человеческий аденовирус серотипа 5 (Ad5).

19. Состав по любому предшествующему пункту, где состав находится внутри контейнера.

20. Состав по п. 19, где контейнер выбран из группы, состоящей из стеклянной ампулы, разбрызгивателя для носа, дозатора капель, генератора аэрозоля и опрыскивателя.

21. Контейнер, содержащий состав по любому предшествующему пункту, где контейнер содержал состав в течение до около трех месяцев при температуре окружающей среды.

22. Контейнер по п. 21, где температура окружающей среды составляет от около 15 до 30°C или от около 20 до 25°C.

23. Контейнер по п. 21 или 22, где состав выполнен с возможностью сохранить по меньшей мере около 0,5 log инфекционных вирусных частиц через около три месяца при температуре окружающей среды внутри контейнера.

24. Контейнер по п. 21 или 22, где состав содержит по меньшей мере около 0,5 log присутствующих инфекционных вирусных частиц по сравнению с сопоставимым составом, который находился в контейнере того же типа при температуре окружающей среды в течение менее одного месяца.

25. Контейнер по любому из пп. 21-24, где контейнер выбран из группы, состоящей из стеклянной ампулы, разбрызгивателя для носа, дозатора капель, генератора аэрозоля и опрыскивателя.

26. Контейнер по любому из пп. 21-25, где контейнер представляет собой одноразовый контейнер или содержит множество доз и/или выполнен для интраназального введения состава.

27. Применение состава по любому из пп. 1-20 для получения лекарственного средства для введения субъекту-человеку для профилактики и/или лечения заражения вирусом гриппа у субъекта.

28. Применение контейнера по любому из пп. 21-26 для получения лекарственного средства для введения субъекту-человеку для профилактики и/или лечения заражения вирусом гриппа у субъекта.

29. Набор для получения препарата лекарственного средства для введения субъекту-человеку для профилактики и/или лечения заражения вирусом гриппа у субъекта, причем указанный набор содержит по меньшей мере один контейнер по любому из пп. 21-26.

30. Способ индукции комбинированного мукозального, гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у субъекта-человека против вируса гриппа, предусматривающий:

интраназальное введение субъекту-человеку однократной дозы противогриппозного фармацевтического состава по любому из пп. 1 - 20,

где введение индуцирует комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ против вируса гриппа.

31. Способ по п. 30, в котором мукозальный иммунный ответ определяют посредством анализа ELISA антител IgA против гемагглютинина (HA), гуморальный иммунный ответ определяют посредством титра анализа подавления гемагглютинации (HAI) и/или присутствия нейтрализующего антитела, как определено с применением анализа микронеutralизации, необязательно как измерено с применением одного или нескольких из среднего геометрического титра (GMT), соотношения геометрических средних (GMR), показателя сероконверсии (SCR), положительной серологической реакции (SPR), и/или Т-клеточный иммунный ответ определяют посредством применения ELISpo γ -интерферона.

32. Способ по п. 30 или 31, где комбинированный мукозальный, гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ является защитным против вируса гриппа.

33. Способ по п. 32, где субъект-человек является серологически защищенным от заражения вирусом гриппа в течение по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев или по меньшей мере 14 месяцев после указанного введения.

34. Способ по любому из пп. 30-33, где вирусом гриппа является вирус гриппа А и/или вирус гриппа В.

35. Способ по п. 34, где вирусом гриппа А является подтип H1N1 или H3N2.

36. Способ по любому из пп. 30-35, где вирус гриппа представляет собой сезонный вирус гриппа.

37. Способ по любому из пп. 30-36, где комбинированный иммунный ответ обеспечивает защиту против подтипов вируса гриппа А и вируса гриппа В.

38. Способ по п. 37, где введение индуцирует титр антител HAI по меньшей мере 50 в течение по меньшей мере 12 месяцев после введения.

39. Способ по любому из пп. 30-38, где субъект показывает иммунитет против аденовирусного вектора до интраназального введения, причем указанный иммунитет определяют посредством анализа подавления гемагглютинации, анализа микронеutralизации, анализа ELISA IgA и/или ELISpot.

40. Способ по п. 40, где указанный репликационно-дефектный аденовирусный вектор представляет собой человеческий аденовирус серотипа 5 (Ad5).

41. Способ по п. 40 или 41, где введение состава не усиливает иммунитет субъекта против аденовирусного вектора более чем шестикратно по сравнению с имеющимся у

субъекта до введения, причем указанный иммунитет определяют путем анализа подавления гемагглютинации, анализа микронеutralизации, анализа IgA ELISA и/или ELIspot.

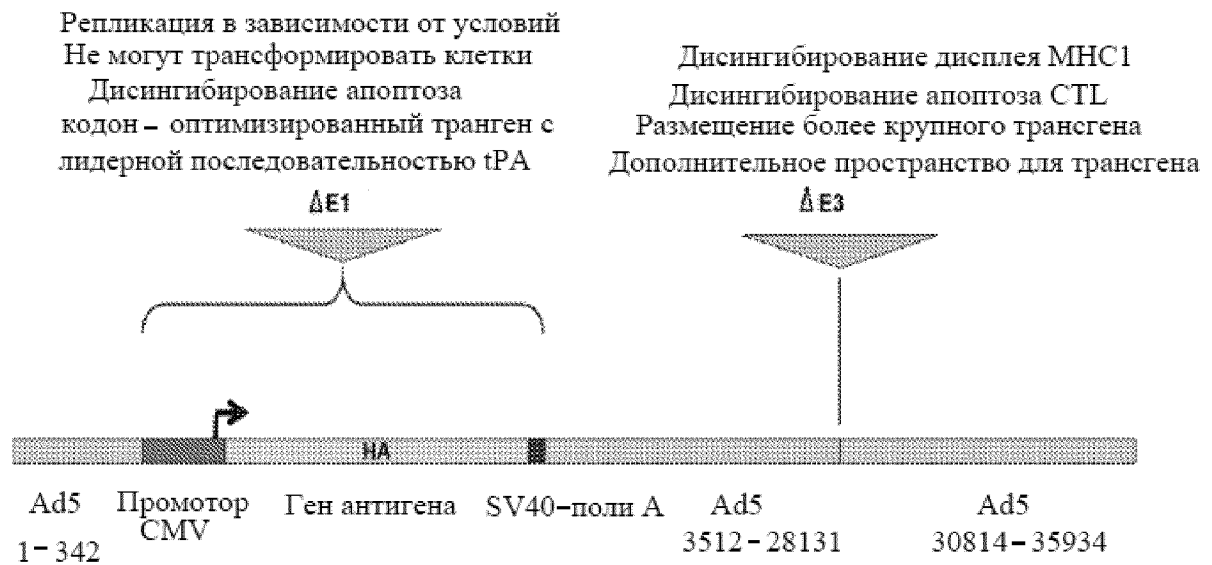
42. Способ по любому из пп. 30-41, где субъект является сероположительным по человеческому аденовирусу до введения.

43. Способ по любому из пп. 30-42, дополнительно предусматривающий введение однократной дозы второго противогриппозного фармацевтического состава через около 11-14 месяцев после введения по меньшей мере одной дозы ранее введенного противогриппозного фармацевтического состава.

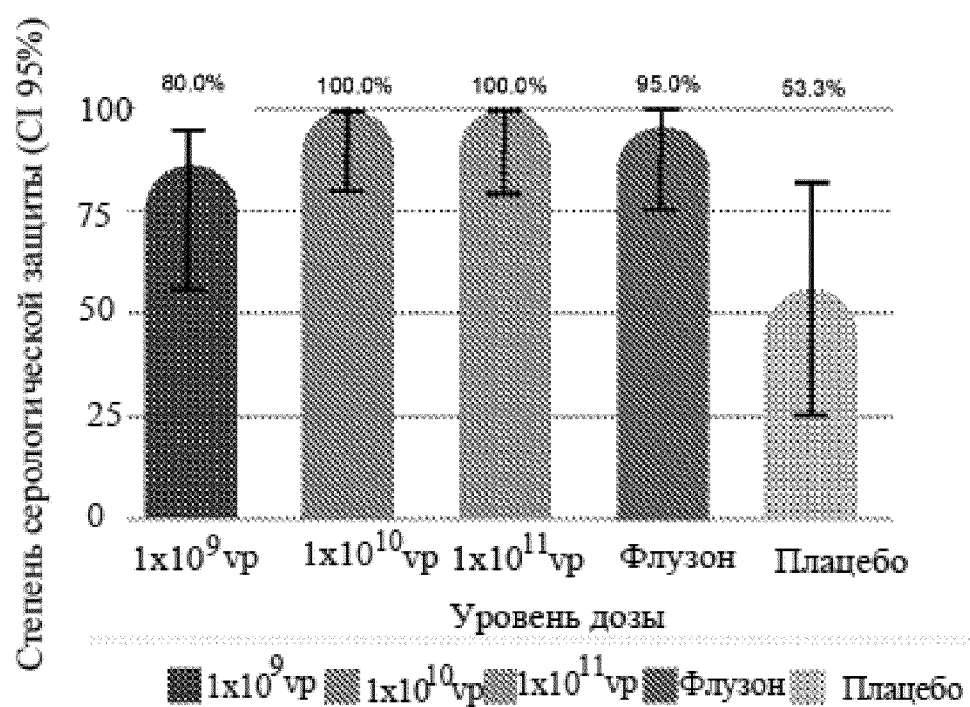
44. Способ по п. 44, где второй противогриппозный фармацевтический состав содержит антигены сезонного вируса гриппа, которые являются такими же или отличными от содержащихся в ранее введенном противогриппозном фармацевтическом составе.

45. Способ по любому из пп. 30-44, где субъект-человек является взрослым человеком.

Фиг. 1



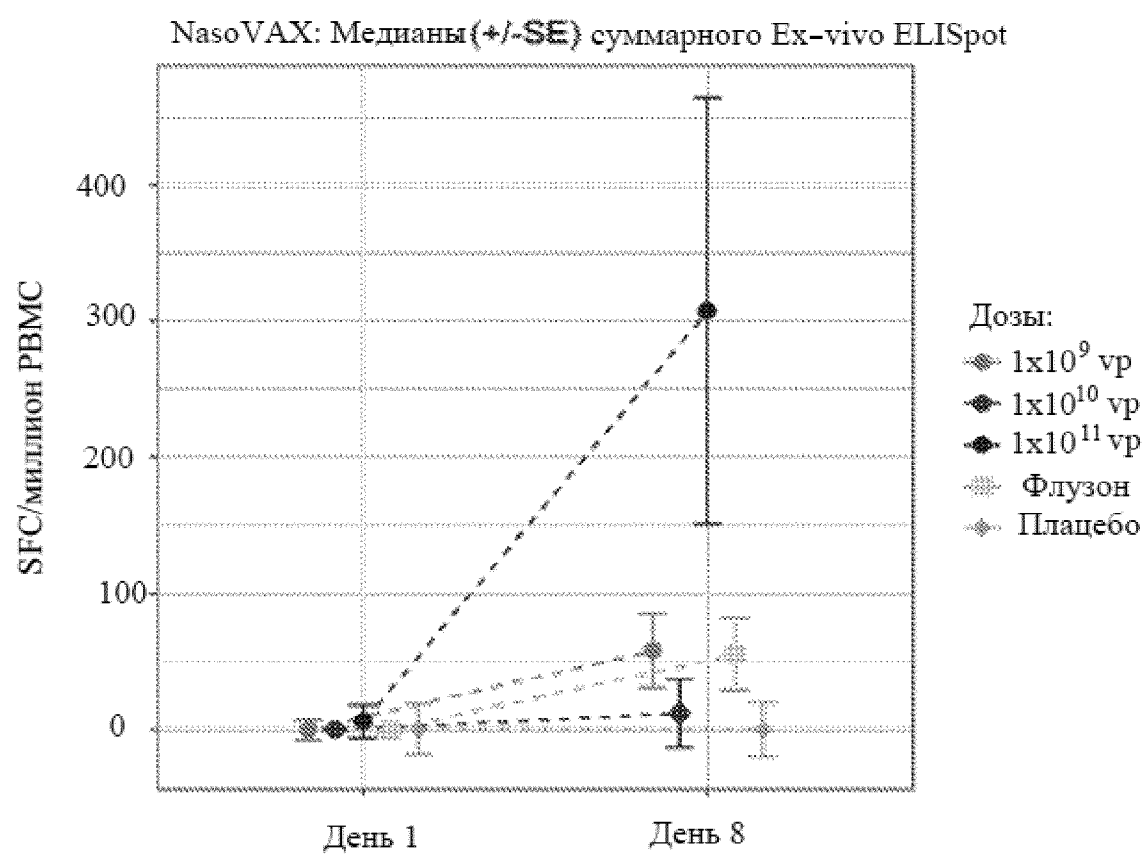
Фиг.2



Фиг.3

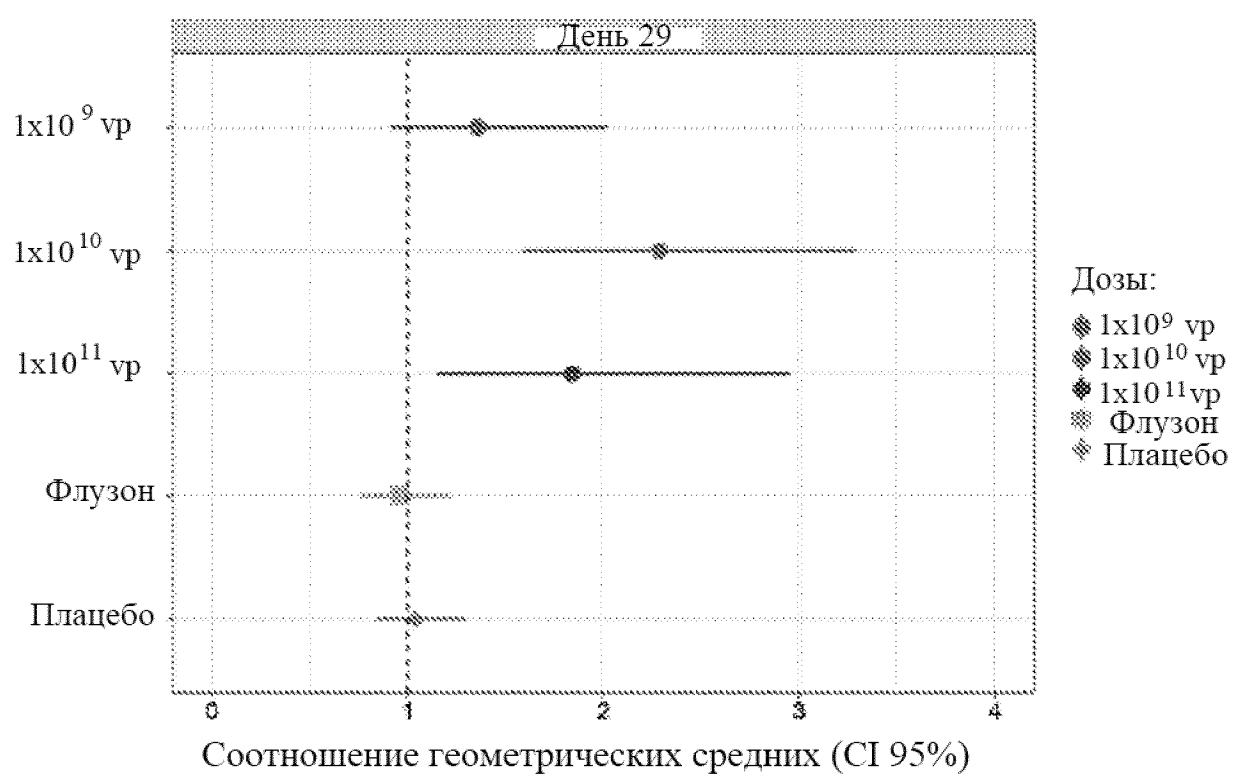
	Плацебо n=15	10 ⁹ vp n=15	10 ¹⁰ vp n=15	10 ¹¹ vp n=15	Флузон n=20
NAI					
Серологическая защита (NAI _≥ 40)	53.3% (26.6 – 78.7)	80% (51.9 – 95.7)	100% (78.2 – 100)	100% (78.2 – 100)	95% (75.1 – 99.9)
Сероконверсия (четырёхкратный рост)	0% (0 – 21.8)	13.3% (1.7 - 40.5)	26.7% (7.8 - 55.1)	33.3% (11.8 - 61.6)	50% (27.2 – 72.8)
GMT NAI	27.6 (13.5 – 56.8)	83.8 (42.1 – 166.7)	160.0 (94.8 – 270.0)	152.8 (93.5 – 249.7)	293.4 (188.7 – 461.3)
Нейтрализующее Ab					
Двухкратное увеличение MN ответа	0% (0 – 21.8)	40% (16.3 – 67.7)	46.7% (21.3 – 73.4)	73.3% (44.9 – 92.2)	70% (45.7 – 88.1)
Четырёхкратное увеличение MN ответа	0% (0 – 21.8)	13.3% (1.7 – 40.5)	26.7% (7.8 – 55.1)	53.3% (26.6 – 78.7)	50.0% (27.2 – 72.8)
GMT MN	17.8 (9.1 – 35.0)	44.9 (21.8 – 92.3)	113.1 (58.0 – 220.8)	142.5 (93.6 – 217.1)	162.8 (95.8 – 276.6)

Фиг.4

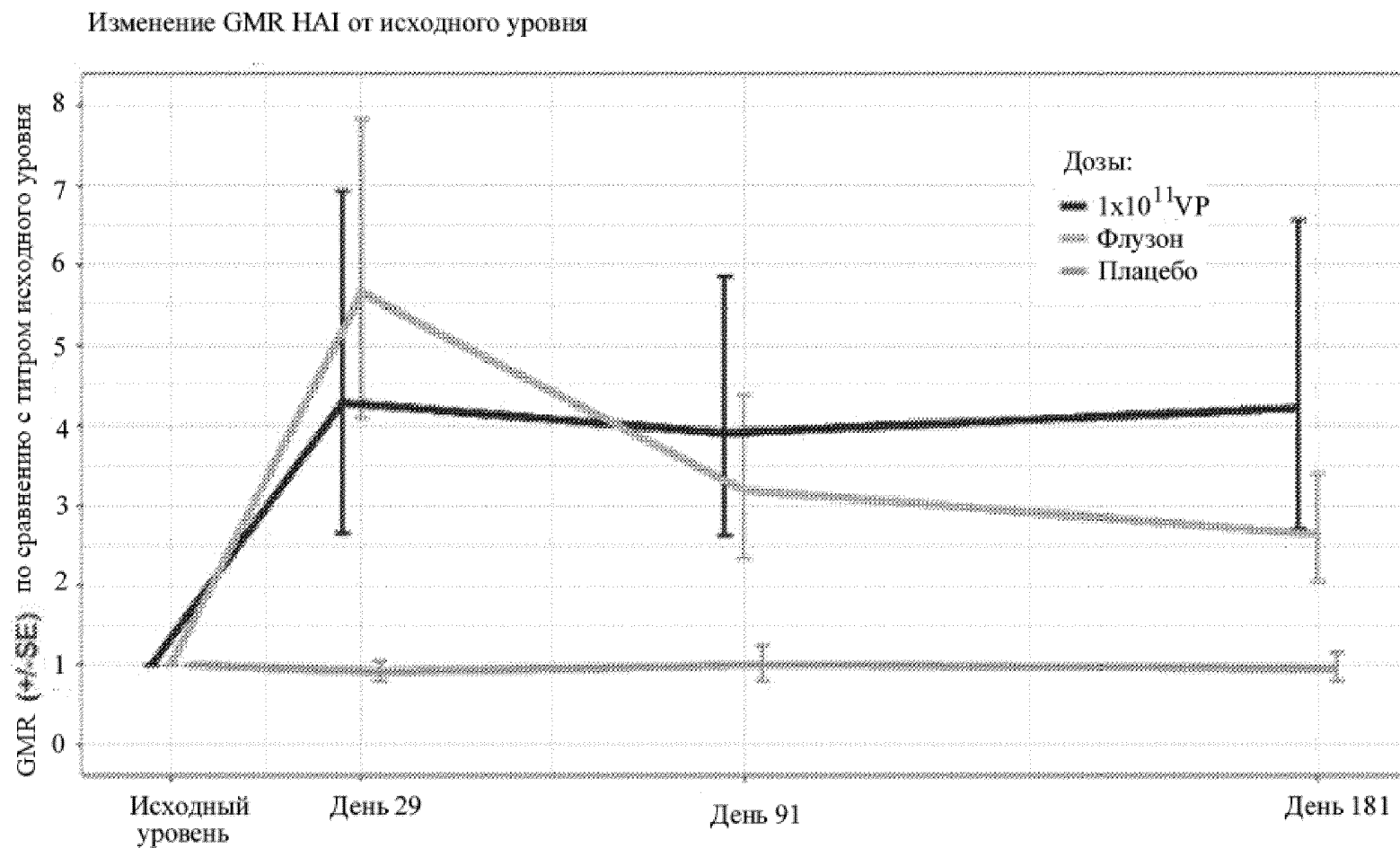


Фиг.5

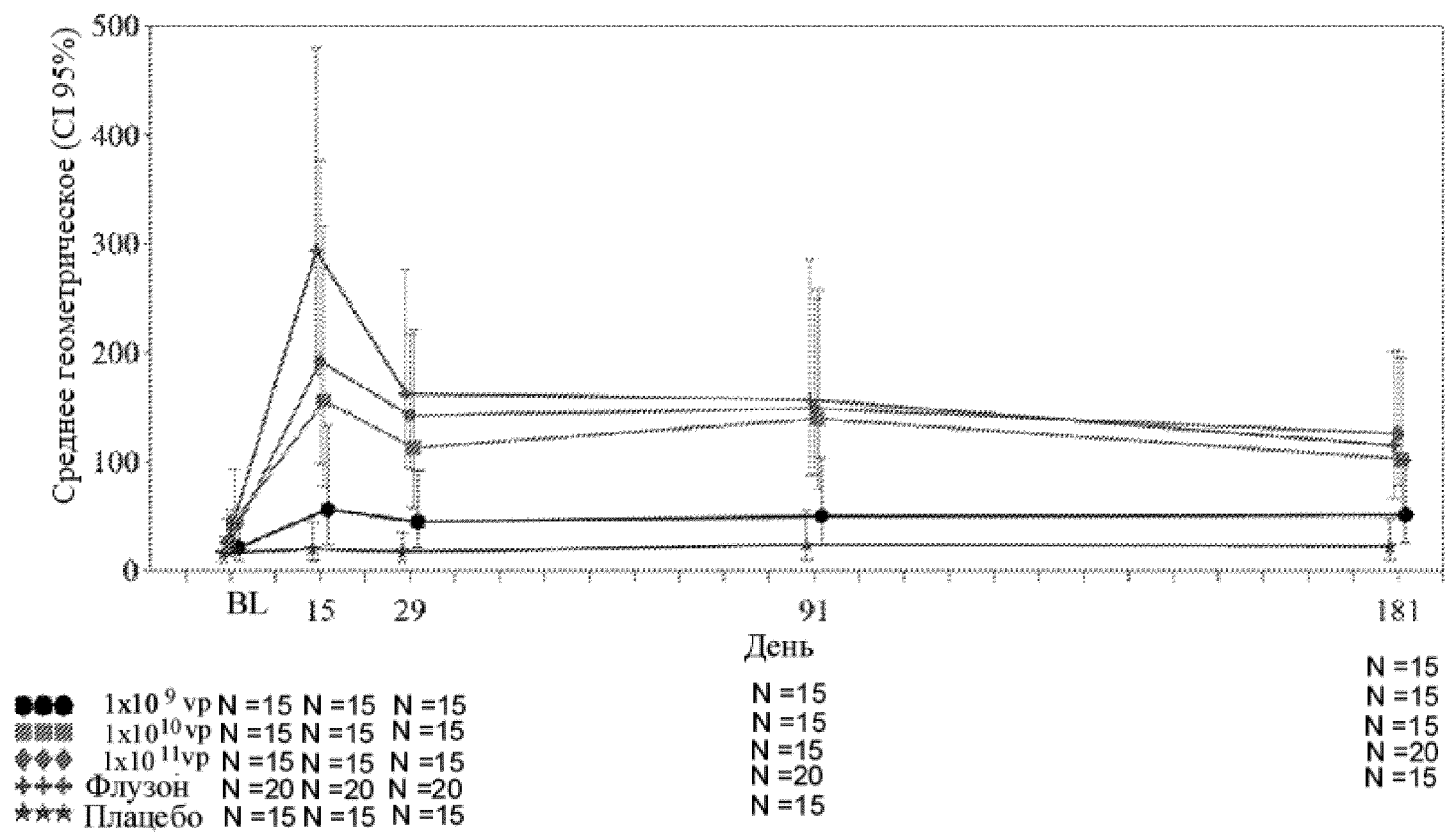
Уровень антител IgA в мазках носоглотки, измеренный посредством ELISA



Фиг. 6



Фиг. 7



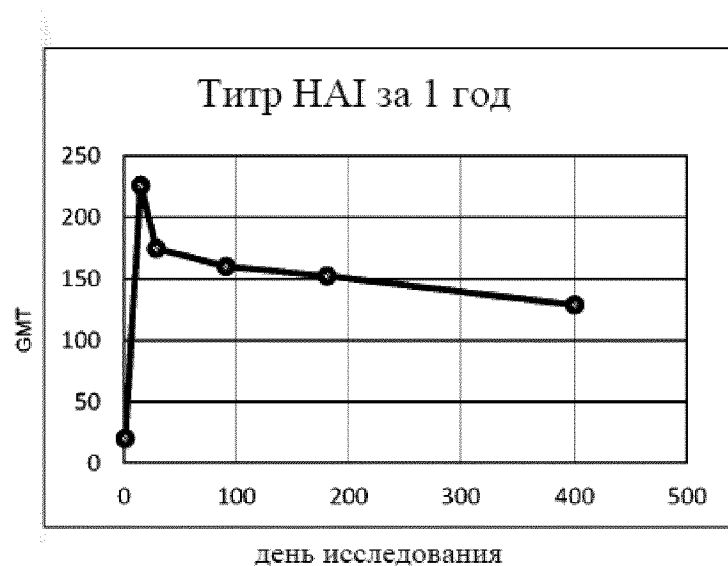
Фиг. 8

Статистические данные	NasoVAX				Плацебо N =15	Флузон N =20
	1x10 ⁹ vp N=15	1x10 ¹⁰ vp N=15	1x10 ¹¹ vp N=15	Общая N=45		
день 1						
n	15	14	14	43	15	20
GM SFU/10 ⁶ клеток (CI 95%)	3.6 (1.2, 11.0)	1.8 (0.7, 7.4)	6.9 (2.0, 24.0)	3.5 (1.9, 6.5)	7.2 (1.8, 28.4)	2.9 (1.3, 6.3)
Day 8						
n	15	15	14	44	15	20
LS GM SFU/10 ⁶ клеток (CI 95%) ^a	28.6 (8.9, 92.5)	14.6 (4.3, 50.0)	108.8 (32.0, 369.9)	35.7 (17.8, 71.4)	5.8 (1.8, 18.8)	41.1 (14.8, 113.7)
Соотношение LS GM SFU по сравнению с Плацебо (CI 95%) ^a	5.0 (0.9, 26.4)	2.5 (0.5, 14.3)	18.9 (3.5, 102.2)	6.2 (1.6, 24.5)		
Соотношение LS GM SFU по сравнению с Флузоном (CI 95%) ^a	0.7 (0.1, 3.3)	0.4 (0.1, 1.7)	2.6 (0.2, 13.1)	0.9 (0.3, 3.0)		
Изменение от исходного уровня (SFU/10 ⁶ клеток), медиана (CI 95%) ^b	35 (-15.56, 85.56)	6 (-40.69, 52.69)	289.5 (12.89, 566.11)	52 (-18.04, 122.04)	0 (-12.27, 12.27)	43.5 (-7.59, 94.59)
Частота ответа на лечение ^c (CI 95%)	46.7% (21.3%, 73.4%)	35.7% (12.9%, 35.7%)	78.6% (49.2%, 95.3%)	53.5% (37.7%, 68.8%)	20.0% (4.3%, 48.1%)	55.0% (31.5%, 76.9%)
P значение по сравнению с Плацебо ^d	0.2451	0.4270	0.0028	0.0351		
P значение по сравнению с Флузоном ^d	0.7360	0.3151	0.2748	1.000		

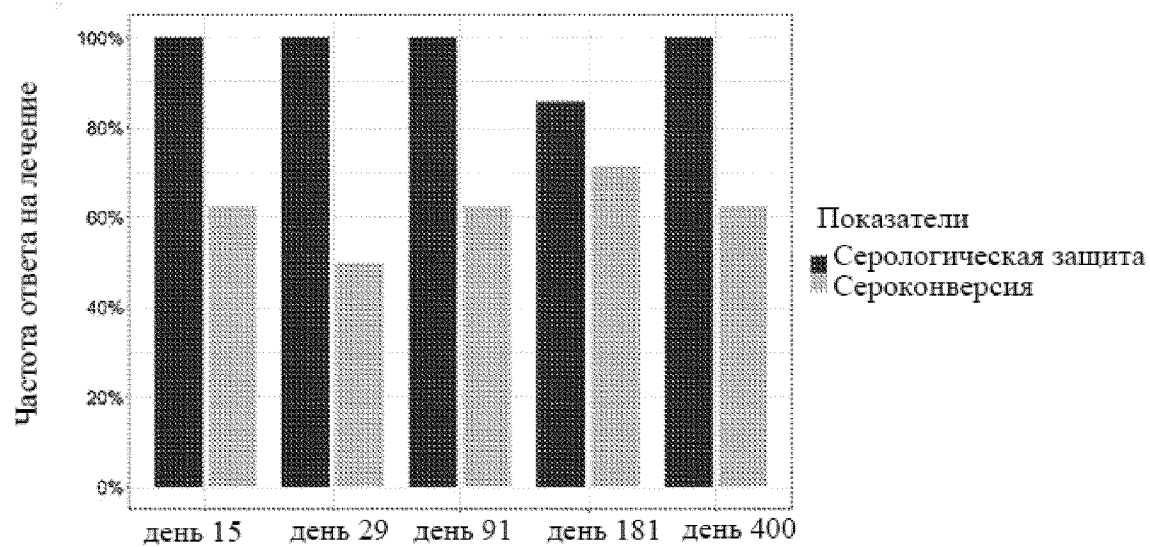
Фиг. 9

Статистические данные	день 29		день 91		день 181	
	NasoVAX 1x10 ¹¹ vp N =15	Флузон N =20	NasoVAX 1x10 ¹¹ vp N =15	Флузон N =20	NasoVAX 1x10 ¹¹ vp N =15	Флузон N =20
Анализ HAI						
GMR (CI 95%)	4.3 (1.5, 12.0)	5.7 (2.9, 11.2)	3.9 (1.6, 9.3)	3.2 (1.6, 6.2)	4.2 (2.5, 11.1)	2.6 (1.6, 4.5)
SCR ^a (CI 95%)	33.3% (11.8%, 61.6%)	50.0% (27.2%, 72.8%)	40.0% (16.3%, 67.7%)	35.00% (5.4%, 59.2%)	46.2% (1.2%, 74.9%)	35.0% (15.4%, 59.2%)
SPR ^b (CI 95%)	100.0% (78.2%, 100.0%)	95.0% (75.1%, 99.9%)	100.0% (78.2%, 100.0%)	90.0% (68.3%, 98.3%)	84.6% (54.6%, 08.1%)	46.7% (21.3%, 73.4%)

Фиг.10А



Фиг.10В



Фиг.11

Положительные по Ad5 согласно ПЦР (%)			
	10 ⁹ vp n=15	10 ¹⁰ vp n=15	10 ¹¹ vp n=15
день 4	47%	60%	80%
день 8	7%	13%	20%
день 15	0%	0%	0%

GMR антител против Ad5 на день 29 по сравнению с исходным уровнем (CI 95%)			
	10 ⁹ vp n=15	10 ¹⁰ vp n=15	10 ¹¹ vp n=15
	1.67 (0.96 – 2.93)	1.58 (1.06 – 2.35)	2.34 (1.37 – 4.13)

Фиг.12

