

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046342**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.01

(51) Int. Cl. **C12N 7/00 (2006.01)**
C07K 14/18 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090967

(22) Дата подачи заявки
2018.10.10

(54) **СТАБИЛЬНЫЕ СОСТАВЫ ВАКЦИН, ВКЛЮЧАЮЩИХ, В ЧАСТНОСТИ, ЖИВОЙ АТТЕНУИРОВАННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФЛАВИВИРУС И ПРОЦЕСС ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ**

(31) **201721036696**

(56) **US-A1-20120141528**
WO-A1-2010036774
US-A1-20150030565
WO-A1-2017056101
WO-A1-2017041156
WO-A2-2008118691
WO-A2-2010146598
US-A1-20100015180

(32) **2017.10.16**

(33) **IN**

(43) **2020.08.12**

(86) **PCT/IN2018/050645**

(87) **WO 2019/077622 2019.04.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕРУМ ИНСТИТЬЮТ ОФ ИНДИЯ
ПРАЙВАТ ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
Мхаласакант Дхири Раджив,
Равиндра Йолекар Лина, Кумар
Винит, Сонар Рохит Бапурав,
Бараскар Сандип Динкар, Мехла
Раджив, Годекар Шашикант Янардан
(IN)

(74) Представитель:
Вахнин А.М. (RU)

(57) Предложены стабильные лиофилизированные иммуногенные составы, включающие в себя, помимо прочего, живые аттенуированные рекомбинантные флавивирусы, предпочтительнее живые аттенуированные рекомбинантные вирусы лихорадки денге, по крайней мере, один углевод, по крайней мере, одну аминокислоту, особенно подвержены быстрому сублимационному высушиванию, при котором состав сохраняет желаемые характеристики вируса, в том числе жизнеспособность, иммуногенность и стабильность. Указанный иммуногенный состав лишен консервантов, полимеров и ПАВ. Предложены методы изготовления.

B1

046342

046342

B1

Область изобретения

Настоящее раскрытие относится к области биотехнологии, в частности, к составу живой аттенуированной флавивирусной вакцины и способу ее приготовления. Настоящее раскрытие также относится к усовершенствованной методологии в области производства живых аттенуированных флавивирусных вакцин.

Исходные данные

Геном флавивируса состоит из односпиральной положительно полярной нити молекулы РНК 11 тпн, содержащей одну открытую рамку считывания. РНК трансформируется в полипротеин, который перерабатывается как минимум в 10 продуктов гена: 3 структурных белка - нуклеокапсид или ядро (С), премоembrанный белок (рМ), клеточной оболочки (Е) и 7 неструктурных (NS) белков - NS 1, 2А, 2В, 3, 4А, 4В и 5 (Lindenbach BD, et al., In: Fields Virology. Под редакцией Knipe DM, Howley PM, Griffin PE и др.: Wolters Kluwer, Lippencott Williams and Wilkins; 2007. стр 1101-1152). (Fernandez-Garcia MD, et al., Cell Host Microbe, 2009, 5:318-328). Некоторые из этих флавивирусов используют членистоногих (например, укусы клещей и/или комаров) в качестве средства передачи вируса получателям. Такие вирусы, переносимые членистоногими (т.е. арбовирусы), представляют собой одну из основных проблем здравоохранения во всем мире в силу их высокопатогенной природы в организме человека. (Fernandez-Garcia MD, et al., Cell Host Microbe, 2009, 5:318-328). В частности, к возбудителям арбовирусов человека относятся вирусы желтой лихорадки (YF), японского энцефалита (JE), денге (DEN), Западного Нила (WN) и клещевого энцефалита (TBE), которые существуют в природе в жизненных циклах, в которые вовлечены переносчики: комары или клещи, а также птицы и/или млекопитающие, являющиеся компетентными резервуарными носителями. (Gubler D, et al., In: Fields Virology. Edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin PE, и пр. 5-е издание. Филадельфия: Wolters Kluwer, Lippencott Williams and Wilkins; 2007. стр. 1153-1252).

Тем не менее, вирус денге (DENV) стал самым серьезным арбовирусом человека во всем мире: по оценкам, ежегодно происходит до 500 млн. заражений денге, в результате чего более 2 млн. человек страдают от серьезной болезни, известной как геморрагическая лихорадка денге/шоковый синдром денге, и 21 000 человек умирают от этой болезни. Существует четыре серотипа вируса денге DENV1, DENV2, DENV3 и DENV4).

Известны многочисленные методы получения живых аттенуированных рекомбинантных флавивирусных препаратов для вакцинации и других целей. Известны также составы и методы, полезные при замораживании, лиофилизации или другом хранении жизнеспособных вирусных препаратов для лабораторного или вакцинного применения с целью сохранения их активности.

Водные составы флавивирусов не обеспечивают хорошей вирусной стабильности в течение длительного времени и при температуре выше 5°C. К примеру, объемные водные составы химеры YF-DEN (желтая лихорадка денге) теряют более 4 логарифма, стабилизированных в жидкости после хранения в течение 1 дня при температуре 37°C. В настоящее время термостабильность представляет собой серьезную проблему в субтропических странах-эндемиках денге, где транспортировка с сохранением температуры затруднена.

Ллиофилизация - распространенный способ стабилизации вакцин. Однако лиофилизация приводит к потере вирусной эффективности. С течением времени вакцины теряют свою эффективность, а скорость ее потери зависит от температуры. Живые вирусы подвержены осмотическому, термическому и вакуумному шоку. Развитые вирусы имеют липидный бислой, который из-за своей высокой хрупкости считается менее стабильным компонентом вируса. Живые вирусы подвержены различным стрессам во время таких этапов лиофилизации, как замораживание, первичная сушка, вторичная сушка, которые могут повлиять на физико-химическую стабильность вирусов. В связи с особенностью их структуры, потеря потенциальной активности при сублимационной сушке может быть вызвана дестабилизацией белков (например, разворачиванием, разложением и агрегацией), деградацией нуклеиновых кислот, изменением липидного слоя (например, фазовым переходом, механическим повреждением) и напряжениями, связанными с изменениями во внутренней (образование льда) и внешней (изменение рН и осмолярности) вирусной среды. Сообщается, что в некоторых случаях лиофилизация приводит к потере до 40% вирусной эффективности.

Несмотря на наличие большого объема информации о механизмах стресса и стратегиях стабилизации фармацевтических пептидов, белков и ДНК при лиофилизации, в силу молекулярной сложности вирусов, различных путей дестабилизации и отсутствия аналитических методов, позволяющих измерять физико-химические изменения в структуре антигена во время и после лиофилизации, вирусы представляют собой особую проблему для лиофилизации. Механизмы дестабилизации, а также механизмы защиты живых, аттенуированных вирусных вакцин во время лиофилизации недостаточно хорошо известны.

Hansen и пр. 2015 (Freeze-drying of live virus vaccines: A review, Hansen et al., Vaccine 33 (2015) 5507-5519) раскрывает компиляцию нескольких рецептов вакцин, высушенных в замороженном состоянии (с), в которых в большинстве рецептов упоминается о преимущественном использовании сахарного спирта/белковой добавки (например, сукрозы + трегалозы, сорбита, гидролизованного желатина, гидролизатов лактальбумина) для получения лиофилизованной вирусной вакцины.

Ранее сообщалось о следующих формулировках флавивирусной вакцины: 1) сорбит, трегалоза, мочеви́на, 2) лактоза, сорбит, HSA, 3) лактоза, маннитол, HSA; 4) полоксамер, человеческий альбумин, трегалоза, PBS; 5) трегалоза, рекомбинантный HSA, F127 (блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена).

В случае HSA включение этих материалов может вызвать потенциальную озабоченность по поводу безопасности, если эти материалы получены из источников, представляющих опасность для человека или животных. Такие добавленные белки вызывают озабоченность по двум основным причинам. Первая из них связана с тем, что белок, полученный из животных и человека, может содержать один или более адвентицирующих агентов. Вторая причина связана с тем, что белок, полученный из животных или человека, может вызвать аллергическую реакцию у восприимчивых особей. Кроме того, в препаратах лиофилизированных вакцин, о которых сообщалось ранее, используются белки, которые, даже если они произведены с использованием процессов, поддерживающих высокие урожаи, имеют финансовые последствия для рецептур. "Для широкого внедрения вакцины в регионах с низкими доходами крайне важно поддерживать стоимость вакцины и ее компонентов, таких как стабилизаторы, на низком уровне. С точки зрения регулирования и безопасности также крайне важно, чтобы используемые вспомогательные вещества и стабилизаторы не содержали ни веществ животного происхождения, ни компонентов животного происхождения. Соединения животного происхождения представляют потенциальную опасность в связи с возможным загрязнением скарпи-прион-протеином (PrP^{Sc}) и новым вариантом болезни Крейтцфельдта-Якоба (vCJD).

В фармацевтических рецептурах используются такие неионные поверхностно-активные вещества, как Triton™ X-100, Pluronic® F-68, F-88 и F-127 (полоксамеры), Brij 35 (полиоксиэтилен-алкиловый эфир), полиоксилстеарат 40, Cremophor® EL и альфа-токоферол TPGS. Общим для каждого из этих ПАВ является то, что все они содержат полиоксиэтиленовые вещества и, таким образом, в той или иной степени, имеют схожую проблему, так как полиоксиэтиленовые вещества самоокисляются с образованием реактивных пероксидов, что приводит к повышению нежелательной иммуногенности белка. (См. Edward T. Maggio et al; Polysorbates, peroxides, protein aggregation, immunogenicity - a growing concern; Journal of Excipients and Food Chemicals 3(2):46-53; 2012).

Как сообщается, ПВП дестабилизирует живые аттенуированные вирусные составы. (См: JA White et al; Development of a stable liquid formulation of live attenuated influenza vaccine; Vaccine том 34, выпуск 32, 12 июля 2016 г., стр. 3676-3683; 2016).

Трегалоза дорогостоящая; для достижения стабильности ее необходимо комбинировать с другими сахарами и белковыми добавками (желатином). Кроме того, другие стабилизаторы лучше чем трегалоза повышают стабильность лиофилизированной вакцины при хранении.

Сорбит имеет низкую температуру стеклования (T_g)(-1,6 градусов C), поэтому не может использоваться в качестве основного компонента рецептуры. Короткое время генерации сорбита ограничивает его использование. Для достижения стабильности сорбит необходимо комбинировать с другими сахарами и белковыми добавками (желатином).

Как правило, рекомбинантные вирусы хранятся в виде замороженных гранул, содержащих гидролизаты казеина и/или коллагена в фосфатно-буферном физиологическом солевом растворе (PBS). Эти гранулы затем регидрируются в фармацевтически приемлемом растворе, например, 0,4-0,9% NaCl. Однако, существуют значительные недостатки, таких составов. Среди них - не полностью определенные компоненты, сложные процедуры приготовления, высокая стоимость и невозможность поддерживать определенные желаемые характеристики вируса.

Разработанные ранее рецептуры флавивирусной вакцины стабильны при 2-8°C в течение 6 месяцев, при 25°C в течение 7 дней и при 37°C в течение 1-2 дней. Остается потребность в разработке рецептур, состоящих из минимального количества наполнителей и придающих флавивирусным вакцинам долгосрочную термостабильность, в частности, живых аттенуированных рекомбинантных/химерических вирусах денге.

Такие составы/формулы и процессы приготовления описаны в данном документе.

SUMMARY.

Настоящее раскрытие позволяет получить иммуногенный состав, состоящий из живого аттенуированного флавивируса, углеводов и аминокислот, в которых состав поддается быстрой заморозке-сушке, а восстановленный состав сохраняет желаемые характеристики вируса, в том числе жизнеспособность, иммуногенность и стабильность.

Настоящее раскрытие больше касается лиофилизированного иммуногенного состава, состоящего из:

а) живого аттенуированного рекомбинантного/химерического вируса денге, в котором используются живые аттенуированные штаммы вируса денге rDEN1Δ30-1545; rDEN2/4Δ30(ME)-1495, 7163; rDEN3Δ30/31-7164 и rDEN4Δ30-7132, 7163, 8308, полученные от Национальных институтов здравоохранения (НИЗ) Соединенных Штатов.

б) Сахарозы около 3% м/о - около 6% м/о.

в) Глицина около 3% м/о до 6% м/о.

В настоящем раскрытии далее приводится метод изготовления такого состава/формулы вакцины.

Цели.

Некоторые из целей настоящего раскрытия выглядят следующим образом:

Целью настоящего раскрытия является устранение одной или нескольких проблем известного уровня техники или, по крайней мере, предоставление полезной альтернативы.

Другой целью настоящего раскрытия является предоставление стабилизирующих лиофилизированных составов/формул вакцины, состоящих из не менее чем одного флавивируса, по крайней мере, одного углевода, по крайней мере, одной аминокислоты и, не обязательно - основания. При котором состав будет сохранять желаемые характеристики вируса, в том числе жизнеспособность, иммуногенность и стабильность.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление стабилизирующих лиофилизированных составов/формул вакцины, включающих, в частности, живые аттенуированные рекомбинантные/химерические серотипы вируса денге (DEN 1, DEN 2, DEN 3, DEN 4), подходящие для лечения или предотвращения инфекции денге, или для предотвращения, улучшения или задержки начала или прогрессирования ее клинических проявлений.

Еще одной целью настоящего раскрытия является предоставление метода для производства такого состава/формулы вакцины.

Другие цели и преимущества настоящего раскрытия будут более очевидны из следующего описания, которое не предназначено для ограничения объема настоящего раскрытия.

Подробное описание

Хотя настоящее раскрытие может быть реализовано несколькими вариантами, некоторые из них показаны на изображениях после подробного описания, с учетом того, что настоящее раскрытие может рассматриваться как пример принципов раскрытия и не предназначено для того, чтобы ограничить объем раскрытия тем, что иллюстрируется и раскрывается в данном описании.

Согласно первому варианту настоящего раскрытия, иммуногенный состав, включающий один или несколько живых аттенуированных флавивирусов, один или несколько углеводов и одну или несколько аминокислот, в которых состав поддается быстрой заморозке-сушке, а восстановленный состав сохраняет желаемые характеристики вируса, в том числе жизнеспособность вируса, иммуногенность и стабильность.

Термин "живой" используется в его обычном значении, живой вирус - это вирус, который не был инактивирован, т.е. вирус, способный реплицироваться на перmissive клетках. Живой аттенуированный флавивирус - это вирус, который не вызывает заболевания, вызванного соответствующим вирусом дикого типа у животных или человека, и который способен вызвать специфический иммунный ответ.

Согласно второму варианту настоящего раскрытия, один или несколько живых аттенуированных флавивирусов являются рекомбинантными флавивирусами и/или химерными флавивирусами.

Согласно третьему варианту настоящего раскрытия, один или несколько живых аттенуированных флавивирусов выбираются из группы, состоящей из вируса денге (DEN), вируса желтой лихорадки (YF), вируса японского энцефалита (JE), вируса Кунжина, вируса Западного Нила (WN), вируса клещевого энцефалита (TBE), вируса энцефалита Сент-Луиса, вируса энцефалита Долины Мюррей, вируса Зика или любого связанного с ними флавивируса.

Однако в соответствии с предпочтительным аспектом третьего варианта, одним или несколькими живыми аттенуированными флавивирусами является вирус денге (DEN), который является множеством живых аттенуированных вирусов денге (DEN) различных серотипов, отобранных из группы DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4.

В соответствии с четвертым вариантом настоящего раскрытия, один или несколько живых аттенуированных флавивирусов выбираются из группы, состоящей из живых аттенуированных вирусов химерной/рекомбинантной желтой лихорадки (YF) и/или живых аттенуированных вирусов химерного/рекомбинантного японского энцефалита (JE) и/или живых аттенуированных вирусов химерной/рекомбинантной денге (DEN), и/или живых аттенуированных вирусов химерного/рекомбинантного вируса Западного Нила (ЗН) и/или живых аттенуированных вирусов химерного/рекомбинантного клещевого энцефалита (ТБЭ) и/или вируса химерного денге (желтая лихорадка-денге) и/или вируса химерного YF-WN (желтая лихорадка-Западный Нил) и/или вируса химерного YF-JE (желтая лихорадка-японский энцефалит) или любого связанного с ними флавивирусного вируса.

Однако, согласно предпочтительному аспекту четвертого варианта, одним или несколькими живыми аттенуированными флавивирусами являются живые аттенуированные химерные/рекомбинантные вирусы денге (DEN).

Согласно пятому варианту данного раскрытия, живые аттенуированные рекомбинантные/химерические вирусы денге, используемые в иммуногенном составе, описаны ниже:

А) Краткое описание рекомбинантных штаммов от Национального Института Здоровья/их конструкция:

Все мероприятия, связанные с генерацией аттенуированных штаммов вакцин всех четырех серотипов вируса денге (DEN 1, DEN 2, DEN 3 и DEN 4), объясненные ниже, были проведены в Национальном

Институте Здоровья, США. Содержание WO2002095075 и WO2008022196 включено в настоящий документ полностью.

Происхождение гена.

1. Каждый из аттенуированных штаммов серотипа 1-4 вируса денге (rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30(ME), rDEN3Δ30/31 и rDEN4Δ30) был разработан путем удаления около 30 нуклеотидов (Δ30) (дополнительный 31 нуклеотид (Δ31) в случае DEN-3) из нетрансляционных 3' концов штаммов дикого типа. Мутация Δ31 может также генерироваться отдельно для того, чтобы определить вклад либо Δ30, либо Δ31 в комбинированную делеционную мутацию Δ30/31.

2. Структурно все четыре штамма обволакивают положительные РНК-вирусы размером 35-50 нанометров.

3. Используемый здесь штамм rDEN1Δ30-1545 кодирует одну мутацию Lys→Arg на остаток аминокислот под номером 484 (мутация A1545G) в вирусном полипротеине.

4.4. Используемый штамм rDEN2/4Δ30(ME)-1495, 7163, кодирует мутацию Ser→Phe на остаточном количестве аминокислот 186 (мутация C1495T) и мутацию Leu→Phe на остаточном количестве аминокислот 112 (мутация A7163C) в вирусном полипротеине.

5.5. rDEN3Δ30/31 включает первоначальное удаление Δ30 и несмежное удаление 31 нуклеотида, который удаляет как первоначальные структуры TL-2, так и TL-3. Полученный штамм rDEN3Δ30/31-7164, используемый в данном случае, кодирует мутацию Val→Ala при остаточном количестве аминокислот 115 (мутация T7164C) в вирусном полипротеине.

6.6. Используемый штамм rDEN4Δ30-7132, 7163, 8308 кодирует мутацию Thr→Ile при остаточном количестве аминокислот 102 (мутация C7132T), мутацию Leu→Phe при остаточном количестве аминокислот 112 (мутация A7163C) и мутацию Lys→Arg при остаточном количестве аминокислот 249 (мутация A8308G) в вирусном полипротеине.

Цифры, изображающие последовательность РНК и вирусную структуру штаммов вакцины DEN:

Изображения 1, 2 и 3.

Штаммы дикого типа, используемые для генерации штаммов вакцин, приведены в табл. ниже:

Таблица 1

Номенклатура штаммов дикого типа и вакцин

Серотип	Штамм дикого типа	Штамм вакцины
DEN 1	Западно-тихоокеанский штамм	rDEN1Δ30-1545
DEN 2	Штамм Новой Гвинеи	rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163
DEN 3	Слеман/78	rDEN3Δ30/31-7164
DEN 4	Доминика	rDEN4Δ30-7132,7163,8308

А) Процедура трансформации:

Для создания штаммов вакцины против вируса денге, в основном, были предприняты следующие шаги:

1. Плазмида, содержащая полноразмерную копию кДНК вируса дикого типа DEN, была создана путем генерации коротких сегментов ДНК с использованием обратной транскриптазы и ПЦР. Полученные таким образом фрагменты были соответствующим образом лигированы для генерации неповрежденной двухцепочечной ДНК, состоящей из полноразмерной геномной цепочки кДНК дикого типа DEN, клонированной в плазмиде.

2. Мутация Δ30 была введена путем мутации подфрагмента 3'UTR и замены 3'UTR дикого типа DEN на подфрагмент, содержащий область Δ30. Конкретные мутации вводились методом мутагенеза ПЦР, специфичного для конкретного участка.

3. Для генерации вакцинного штамма DEN 2 структурные гены М и Е, из DEN 2 клонировались в плазмиде и использовались для замещения структурных генов в DEN 4 клонированной плазмиде, содержащей мутацию Δ30. Для генерации штамма вакцины DEN 3 в клон дикого типа были введены две делеции 30 и 31 нуклеотидов.

4. Копированные транскрипты РНК синтезировались из линеаризованных плазмид с помощью набора AmpliCap SP6 Message Maker Kit (EpiCentre Technologies, Мэдисон) и РНК, очищенной с помощью набора RNeasy Mini (Qiagen, Валенсия, Калифорния). Верозлементы (С6/36 для денге 3) были трансфицированы очищенными транскриптами РНК с использованием липосомальных трансфекционных реагентов DOTAP (Roche, Indianapolis, IN) для восстановления желаемого вируса. Спасенные вирусы подвергались амплификации, клонированию при терминальном разбавлении и окончательной амплификации для генерации семенного вируса в клетках Веро. Подробная информация о количестве циклов амплификации и терминального разведения, предпринятых для каждого штамма, приведена в табл. 2.

Таблица 2

Цикл амплификации и терминального разведения для подготовки семенного вируса

Штамм вируса	DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4
Генерация в	Веро	Веро	С6/36*	Веро
Амплификация	Nil	Nil	6X	3X
Клонирование методом лимитирующего разведения	2X	2X	3X	3X
Амплификация	2X	2X	2X	2X

* Вся дальнейшая работа по амплификации и клонированию методом лимитирующего разведения была проведена в клетках Веро.

Согласно первому аспекту пятого варианта, химерные вирусы имеют особенность демонстрировать характеристики живых аттенуированных вирусов, как определено выше. Поэтому в контексте раскрытия можно использовать любой химерный вирус, выражающий белок оболочки или один или несколько эпитопов одного или нескольких белков оболочки одного или нескольких флавивирусов и вызывающий специфический иммунный ответ, состоящий из антител, нейтрализующих штамм, или, по крайней мере, один из штаммов, из которых получают белок оболочки или указанный эпитоп.

Согласно второму аспекту пятого варианта, живая аттенуированная рекомбинантная нуклеиновая кислота вируса денге дополнительно включает мутацию, генерирующую мутацию с фенотипом, выбранным из группы, состоящей из температурной чувствительности в клетках Веро или линии клеток печени человека HuH-7, ограничения клетки-хозяина в клетках комаров или линии клеток печени человека HuH-7, адаптации клетки-хозяина для улучшенной репликации в клетках Веро, или аттенуации в мышах или обезьянах, в состав которой входит член, выбранный из группы, состоящей из:

- (1) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (2) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (3) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (4) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (5) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (6) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (7) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (8) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (9) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (10) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (11) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (12) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (13) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (14) rDEN1Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,

046342

- (15) rDEMΔ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (16) rDENIΔ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (17) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (18) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (19) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (20) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (21) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4Δ30,
- (22) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4/IΔ30,
- (23) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4/2Δ30,
- (24) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4/3Δ30,
- (25) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (26) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (27) rDEMΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (28) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (29) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (30) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (31) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (32) rDENIΔ30, rDEN2/IΔ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (33) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (34) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (35) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (36) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,

- (37) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (38) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (39) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (40) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (41) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (42) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (43) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (44) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (45) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (46) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (47) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (48) rDENIΔ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (49) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (50) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (51) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (52) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (53) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (54) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (55) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (56) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (57) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (58) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,

046342

- (59) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (60) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (61) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (62) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (63) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (64) rDENIΔ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (65) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (66) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (67) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (68) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (69) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4Δ30,
- (70) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4/IΔ30,
- (71) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4/2Δ30,
- (72) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/IΔ30, rDEN4/3Δ30,
- (73) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (74) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (75) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (76) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (77) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (78) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/IΔ30,
- (79) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30, i
- (80) rDENI/2Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,

046342

- (81) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (82) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (83) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (84) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (85) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (86) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (87) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (88) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (89) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30, I
- (90) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (91) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (92) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (93) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (94) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (95) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (96) rDENI/2Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (97) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (98) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (99) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30, I
- (100) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (101) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (102) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,

046342

- (103) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (104) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (105) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (106) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (107) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (108) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (109) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (110) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (111) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (112) rDENI/2Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (113) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (114) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (115) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (116) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (117) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (118) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (119) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (120) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (121) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (122) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (123) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (124) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,

- (125) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (126) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (127) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (128) rDENI/2Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (129) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (130) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (131) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (132) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (133) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (134) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (135) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (136) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (137) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (138) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (139) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (140) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (141) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (142) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (143) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (144) rDENI/3Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (145) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (146) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,

046342

- (147) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (148) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (149) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (150) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (151) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (152) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (153) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (154) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (155) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (156) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (157) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (158) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (159) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (160) rDENI/3Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (161) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (162) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (163) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (164) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (165) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (166) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (167) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (168) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,

046342

- (169) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (170) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (171) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (172) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (173) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (174) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (175) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (176) rDENI/3Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (177) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (178) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (179) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (180) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (181) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (182) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (183) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (184) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (185) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (186) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (187) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (188) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (189) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (190) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,

046342

- (191) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (192) rDENI/3Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (193) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (194) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (195) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (196) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (197) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (198) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (199) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (200) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (201) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (202) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (203) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (204) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (205) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (206) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (207) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (208) rDENI/4Δ30, rDEN2Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (209) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (210) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (211) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (212) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,

046342

- (213) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (214) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (215) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (216) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (217) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (218) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (219) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (220) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (221) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
- (222) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (223) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (224) rDENI/4Δ30, rDEN2/1Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (225) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
- (226) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (227) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (228) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (229) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
- (230) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
- (231) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
- (232) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
- (233) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
- (234) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,

- (235) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (236) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (237) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (238) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (239) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (240) rDENI/4Δ30, rDEN2/3Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (241) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4Δ30,
 (242) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (243) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (244) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (245) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4Δ30,
 (246) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (247) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (248) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/1Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (249) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4Δ30,
 (250) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (251) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/2Δ30,
 (252) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/2Δ30, rDEN4/3Δ30,
 (253) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4Δ30,
 (254) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/1Δ30,
 (255) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/2Δ30,

и

- (256) rDENI/4Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30, rDEN4/3Δ30.

Согласно шестому варианту настоящего раскрытия, к одному или нескольким углеводам относятся, в том числе, природные углеводы, синтетические углеводы, полиолы, агенты, способствующие переходу в стеклообразное состояние, моносахариды, дисахариды, трисахариды, олигосахариды и соответствующие им сахарные спирты, полигидроксильные соединения, такие как производные углеводов и химически модифицированные углеводы, гидроксиэтиловый крахмал и сополимеры сахара. Для использования подходят как натуральные, так и синтетические углеводы. К синтетическим углеводам относятся, в частности, те, у которых гликозидная связь замещена тиоловой или углеродной связью. Могут использоваться как D-, так и L-формы углеводов. Углевод может быть восстанавливающим и невосстанавливающим. При использовании восстанавливающего углевода предпочтительно добавлять ингибиторы реакции Майяра. Восстанавливающие углеводы, подходящие для использования в составе, уже известны и включают, но не ограничиваются глюкозой, сахарозой, мальтозой, лактозой, фруктозой, галактозой, маннозой, мальтулозой и лактулозой. Невосстанавливающие углеводы включают, в частности, невосстанавливающие гликозиды полигидроксильных соединений, отобранных из сахарных спиртов и других полиалкогольных спиртов с прямыми цепочками. Другие полезные углеводы включают раффинозу, стахиоз, мелезитозу, декстран, целлибиоз, маннобиоз и сахарные спирты. Гликозиды сахарного спирта - это предпочтительно моногликозиды, в частности, соединения, получаемые путем восстановления таких дисахаридов, как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза. Стеклообразующее вещество выбирается из группы, состоящей из сахарозы, маннитола, трегалозы, маннозы, раффинозы, лактитола, лактобионовой кислоты, глюкозы, мальтулозы, изо-мальтулозы, мальтозы, лактозного сорбита, декстрозы, фукозы или их комбинации.

Однако, в соответствии с предпочтительным аспектом шестого варианта, иммуногенный состав состоит из сахарозы как подходящего углеводного стабилизатора в диапазоне от 1% до 20% по весу/объему, предпочтительно в диапазоне 1-10%, более предпочтительно в диапазоне 3-6%, наиболее предпочтительно в диапазоне менее или равном 5% (м/о).

Согласно седьмому варианту настоящего раскрытия, одна или более аминокислот включают, но не ограничиваются лейцином, изолейцином, гистидином, глицином, глутамином, аргинином, лизином, аланином или комбинацией аминокислот, пептидом, гидролизованым протеином или протеином, таким как сывороточный альбумин.

Тем не менее, в соответствии с предпочтительным аспектом седьмого варианта, иммуногенный состав состоит из глицина как подходящего аминокислотного стабилизатора в диапазоне от 1% до 20% по весу/объему, предпочтительно в диапазоне 1-10%, более предпочтительно в диапазоне 3-6%, наиболее предпочтительно менее или равном 5% (м/о).

Согласно восьмому варианту настоящего раскрытия, иммуногенный состав может дополнительно состоять из буферного агента, выбранного из группы, состоящей из карбонатных, фосфатных, цитратных, лактатных, глюконатных и тартратных буферных агентов, а также более сложных органических буферных агентов, включая фосфатный буферный агент, содержащий фосфат натрия и/или фосфат калия в соотношении, выбранном для достижения желаемого pH. В другом примере буферный агент содержит трис (гидроксиметил) аминокетан, или "трис", сформулированный для достижения желаемого pH. В другом примере буферный агент может быть минимально необходимой средой с солями Хэнкса.

Согласно девятому варианту настоящего раскрытия, иммуногенный состав может дополнительно состоять из консерванта, отобранного из группы, состоящей из 2-феноксизанола, бензетония хлорида (фамерола), фенола, м-крезола, тиомерсала, формальдегида, метила и пропилпарабенов, бензалкония хлорида, бензилового спирта, хлорбутанола, p-хлор-крезола, или бензилового спирта или их комбинации.

Согласно десятому варианту данного раскрытия, иммуногенная композиция может дополнительно состоять из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, отобранных из группы, состоящей из поверхностно-активных веществ, полимеров и солей. Примерами ПАВ могут служить неионные ПАВ, такие как полисорбат 20, полисорбат 80 и др. Примеры полимеров могут включать декстран, карбоксиметилцеллюлозу, гиалуроновую кислоту, циклодекстрин и др. Примерами солей могут быть NaCl, MgCl₂, KCl, CaCl₂ и др.

Согласно одиннадцатому варианту данного раскрытия, иммуногенный состав может дополнительно состоять из адьюванта, отобранного из группы, состоящей из соли алюминия, гидроксида алюминия, фосфата алюминия, гидроксифосфата алюминия и сульфата алюминия калия.

Согласно двенадцатому варианту настоящего раскрытия, иммуногенный состав может дополнительно состоять из иммуностимулирующего компонента, отобранного из группы, в которую он входит: масляно-водяной эмульсии, MF-59, липосомы, липополисахарида, сапонины, липида А, производных липида А, монофосфориллипида А, 3-деацелированного монофосфориллипида А, AS01, AS03, олигонуклеотида, олигонуклеотида, состоящего, по крайней мере, из одного неметиллированного CpG и/или липосомы, адьюванта Фрейнда, полного адьюванта Фрейнда, неполного адьюванта Фрейнда, полимеров, сополимеров, таких как сополимеры полиоксизтилена и полиоксипропилена, в том числе блоксополимеры, полимер p 1005, адьювант CRL-8300, мурамилдипептид, агонисты TLR-4, жгутины, жгутины, полученные из грамтрицательных бактерий, агонисты TLR-5, фрагменты жгутинов, способные связываться с рецепторами TLR-5, QS-21, ISCOMS, сапониновая комбинация со стеролами и липидами.

Согласно тринадцатому варианту данного раскрытия, указанный иммуногенный состав лиофилизирован (высушен в замороженном состоянии).

Согласно четырнадцатому варианту настоящего раскрытия лиофилизированный иммуногенный состав стабилен при 2-8°C в течение 12-36 месяцев; при 25°C в течение 2-6 месяцев; при 37°C в течение 1 недели-4 недель; при 42°C в течение 2-7 дней; при 55°C в течение 2-7 дней.

Согласно пятнадцатому варианту настоящего раскрытия, метод восстановления лиофилизированного иммуногенного состава, включающий этап восстановления лиофилизированного иммуногенного состава водным раствором по выбору физраствора или воды для инъекций (WFI).

Согласно шестнадцатому варианту настоящего раскрытия, конечный pH иммуногенного состава после восстановления должен находиться в диапазоне pH 6,0-pH 8,0; предпочтительнее в диапазоне pH 7,0-pH 8,0; более предпочтительнее в диапазоне pH 7,2-pH 7,9; и наиболее предпочтительнее в диапазоне pH 7,5-pH 7,9.

Согласно семнадцатому варианту настоящего раскрытия, процесс приготовления живой аттенуированной химерной/рекомбинантной тетравалентной вакцины денге (DEN) включает в себя любое подмножество или все следующие этапы:

- a) Вероэлементы были возрождены и адаптированы для роста в Минимальной питательной среде (МПС) с соевым раствором Хэнка и 10% Эмбриональной бычьей сывороткой.
- b) Вероклетки изначально амплифицировались в колбах тканевой культуры (TCF с площадью поверхности 175 см², доступной для роста клеток), создавая мастер-банки и рабочие банки вероклеток.
- c) Криоконсервированные клетки из банка рабочих клеток восстанавливались, усиливались и далее

перемещались в роликовых бутылках (площадь поверхности 850 см², доступной для роста клеток) и инкубировались при 37±1°C для получения монослоев.

d) Вероноклеточные монослои в роликовых бутылках были заражены рабочим семенем серотипов вируса денге 1, 2, 3 и 4.

e) Все роликовые флаконы инкубировали при температуре 34±1°C в течение 20 мин, а объем пополнился до 120 мл на бутылку с использованием минимальной питательной среды (МПС) с солевым раствором Хэнкса и 2% эмбриональной бычьей сывороткой. Далее все роликовые флаконы инкубировали при 34±1°C в течение 2 суток и скорости прокатки 0,7 об/мин.

f) Во 2-й день монослои в роликовых бутылках промывали свежей вирусной средой, лишенной эмбриональной бычьей сыворотки и выдерживали при температуре 34±1°C в течение 3 суток при скорости прокатки 0,7 об/мин.

g) На 5-й день после заражения был собран клеточный супернатант из всех зараженных роликовых бутылок и в бутылки снова была добавлена свежая вирусная среда, лишенная эмбриональной бычьей сыворотки.

h) Несколько урожаев были взяты и обработаны отдельно для получения осветленных моновалентных вирусных пулов (CMVPs).

i) Фильтрация вирусного урожая с помощью фильтрации прямого потока (DFF), как минимум через один осветляющий фильтр,

j) I) Обработка урожая вируса неспецифической эндонуклеазой для разложения клеточной ДНК.

k) Обработанный вирусный урожай был подвергнут тангенциальной поточной фильтрации.

l) Стабилизация урожая вируса стабилизирующим средством, состоящим из минимум одной аминокислоты и минимум одного углеводорода формирует стабилизированный урожай вируса.

m) Стерилизация стабилизированного урожая вирусов с помощью фильтрации прямого потока через по крайней мере один фильтр стерилизационный фильтр.

n) Осветленные моновалентные вирусные пулы (CMVP) каждого серотипа вируса денге хранились в поликарбонатных бутылках при температуре - 60°C или ниже.

o) Осветленные моновалентные вирусные пулы (CMVP) всех четырех серотипов вирусов были смешаны вместе для получения конечной массы, которая заполняется во флаконах и лиофилизуется для получения лекарственного препарата, т.е. рекомбинантной тетравалентной вакцины денге (живой аттенуированной).

Согласно первому аспекту семнадцатого варианта, линия клеток Веро использовалась в ATCC CCL-81 (цГМФ Веро, клетки почек, полученные от африканской зеленой обезьяны (*Cercopithecus aethiops*; доступно из ATCC, Манассас, Виргиния, США).

В соответствии со вторым аспектом семнадцатого варианта, многократные уборки урожая проводились с соответствующим временным интервалом примерно 4-5 раз - предпочтительнее 4 раза на 5-й, 7-й, 9-й и 11-й день перед отбраковкой исходного материала и обрабатывались отдельно для получения осветленных моновалентных вирусных пулов (CMVP). В случае многократного сбора урожая одно и то же количество исходного материала способствует более высокой урожайности по сравнению с традиционным методом однократного сбора. Это также экономит время и общие производственные затраты на переработку, т.е. на амплификацию клеток для заражения.

Согласно третьему аспекту семнадцатого варианта, в состав вирусной среды входит минимальная питательная среда (МПС) с солевым раствором Хэнкса, дополнительно содержащим декстрозу, L-глутамин и бикарбонат натрия.

Согласно четвертому аспекту семнадцатого варианта, среда, содержащая вирус, осветляется, как правило, через фильтры уменьшающихся размеров пор (например, 6 м, 0.8 м, 0.45 м, 0.2 м). Подходящие коммерческие фильтры и фильтрующие устройства хорошо известны и могут быть выбраны квалифицированными специалистами. К образцовым фильтрационным устройствам относятся, например, фильтрующие устройства Millipak (Millipore), Kleenpak (Pall) и Sartobran™ P.

Согласно пятому аспекту семнадцатого варианта, отфильтрованный урожай обрабатывали неспецифической эндонуклеазой, предпочтительно бензоназой с концентрацией в диапазоне 1-10 единиц/мл, при температуре в диапазоне 4-37°C и с интервалами от 2 часов до 12 часов.

В соответствии с шестым аспектом семнадцатого варианта, урожай, обработанный бензоназой, подвергался тангенциальной поточной фильтрации (TFF), обычно через фильтры с молекулярной массой отсека (MWCO) 500KD, более предпочтительно 300KD и наиболее предпочтительно 100KD.

Согласно седьмому аспекту семнадцатого варианта, вирусный урожай подвергался тангенциальной поточной фильтрации (TFF), что приводило к концентрации вирусного урожая не менее 10 раз и в дальнейшем приводило к удалению остаточных примесей.

Однако предпочтительнее использовать остаточные примеси, состоящие из остаточной ДНК, остаточного бычьего сывороточного альбумина (BSA) и остаточного белка клетки-хозяина.

Согласно восьмому аспекту семнадцатого варианта, в результате описанного выше процесса получается очищенный и концентрированный флавиовирусный препарат, более предпочтительный для приго-

товления вируса денге, в состав которого входят концентрированные живые аттенуированные частицы вируса денге, следы остаточной клеточной ДНК (<10 г/дозы), остаточный БСА (<50 г/дозы) и остаточные клеточные белки. Кроме того, согласно описанному выше процессу, общее восстановление очищенных вирусов составляет не менее 50%.

Согласно девятому аспекту семнадцатого варианта, стабилизаторы, состоящие из раствора одной или нескольких аминокислот и одного или нескольких углеводов, смешивались с концентрированным вирусом (концентратом TFF) в пропорции 60:40 или 50:50 или 40:60 вируса к стабилизатору для получения окончательной рецептуры.

Однако предпочтительные стабилизаторы, состоящие из раствора сахарозы в концентрации 7,5-15% (м/о) и глицина в концентрации 7,5-15% (м/о), смешивались с концентрированным вирусом (концентратом TFF) в пропорции 60:40 или 50:50 или 40:60 вируса к стабилизатору для получения окончательной рецептуры, состоящей из сахарозы в концентрации от 3 до 6% (м/о) и глицина в концентрации от 3 до 6% (м/о).

Однако предпочтительные стабилизаторы, состоящие из раствора сахарозы в концентрации 12,5% (м/о) и глицина в концентрации 12,5% (м/о), смешивали с концентрированным вирусным запасом (концентратом TFF) в пропорции 60:40 вируса к стабилизатору для получения конечной рецептуры, состоящей из сахарозы в концентрации 5% (м/о) и глицина в концентрации 5% (м/о).

Однако предпочтительные стабилизаторы, состоящие из раствора сахарозы в концентрации 11,25% (м/о) и глицина в концентрации 12,5% (м/о), смешивали с концентрированным вирусным запасом (концентратом TFF) в пропорции 60:40 вируса к стабилизатору для получения конечной рецептуры, состоящей из сахарозы в концентрации 4,5% (м/о) и глицина в концентрации 5% (м/о).

Однако предпочтительные стабилизаторы, состоящие из раствора сахарозы в концентрации 15% (м/о) и глицина в концентрации 15% (м/о), смешивали с концентрированным вирусом (концентратом TFF) в пропорции 60:40 вируса к стабилизатору для получения конечной рецептуры, состоящей из сахарозы в концентрации 6% (м/о) и глицина в концентрации 6% (м/о).

Согласно десятому аспекту семнадцатого варианта, множественность инфекции (МИ) флавивируса, более предпочтительно вируса денге для получения маточного и рабочего семян, находится в диапазоне от 0,01 до 0,1 для каждого серотипа денге.

Тем не менее, желательно, чтобы множественность инфекции (МИ) вируса денге для получения основного семени и рабочего семени составляло 0,01.

Согласно одиннадцатому аспекту семнадцатого варианта, иммуногенный состав включает в себя флавивирус денге, предпочтительнее всего вирус денге в дозе не менее 2,5 лог₁₀ БОЕ/0,5 мл каждого из серотипов 1, 2, 3 и 4 вируса денге.

Согласно двенадцатому аспекту семнадцатого варианта, иммуногенный состав включает в себя вирус денге в дозе от 103 до 105 БОЕ/0,5 мл, предпочтительнее от 103 до 104 ПФУ/0,5 мл, предпочтительнее всего от 103 ПФУ/0,5 мл каждого из серотипов 1, 2, 3 и 4 вируса денге.

Согласно восемнадцатому варианту данного раскрытия, метод лиофилизации (сублимационной сушки) иммуногенного состава включает этапы замораживания, первичную сушку и вторичную сушку.

Однако предпочтительно, чтобы метод лиофилизации (сублимационной сушки) живой аттенуированной химерной/рекомбинантной тетравалентной денге (DEN) вакцинной композиции включал в себя любое подмножество или все следующие этапы:

- а) Загрузка продукта при температуре от 20 до 5°C.
- б) Пошаговое замораживание с выдержкой при каждой температуре, при этом этап замораживания должен включать в себя замораживание при температуре от -30°C до -45°C со скоростью замерзания от 0,5 до 1°C./мин примерно от 60 минут до 930 минут.
- в) Отжиг при температуре -20°C в течение 5 часов с последующим замораживанием при температуре -45°C.
- г) Первичная сушка со ступенчатым повышением температуры примерно на 0,5°C в минуту до 1,0°C в минуту для достижения температуры от -25°C до -32°C, выдерживая около 600 минут до 1980 минут под давлением около 55 мбар;
- д) Вторичная сушка включает в себя нагрев продукта со скоростью от 0,5 до 1,0°C/мин для достижения температуры от 25°C до 30°C, выдерживание в течение примерно 360-600 минут под давлением 55 мбар.

Общая продолжительность цикла лиофилизации составляет от 48 часов до 56 часов. Предусмотрены изменения температуры и продолжительности цикла в соответствии со спецификацией флакона и конструкцией лиофилизатора. Продукт подвергается лиофилизации на основе заранее заданного цикла для достижения целевого содержания влаги от 2,0% до 3,5% весового соотношения.

В данном случае термины "сушка замораживанием", "лиофильная сушка" или "лиофилизация" подразумевают лиофилизацию и относятся к процессу, при котором суспензия замораживается, после чего вода удаляется путем сублимации при низком давлении. В данном случае термин "сублимация" означает изменение физических свойств композиции, при котором композиция изменяется непосредственно из

твердого состояния в газообразное, не превращаясь в жидкость.

В соответствии с девятнадцатым вариантом настоящего раскрытия, иммуногенный состав сформулирован для использования в методе снижения наступления или предотвращения состояния здоровья, связанного с введением в организм человека эффективного количества иммуногенного состава внутримышечно, внутривенно, подкожно, транскутанно или внутрикожно.

Согласно двадцатому варианту настоящего раскрытия, состояние здоровья выбирается из группы, состоящей из вирусной инфекции денге, вирусной инфекции Зика, вирусной инфекции Западного Нила, японской инфекции энцефалита, вирусной инфекции Куньдзин, клещевого энцефалита, вирусной инфекции Сент-Луиса, вирусной инфекции энцефалита долины Мюррей, вирусной инфекции желтой лихорадки.

Согласно двадцать первому варианту данного раскрытия, иммуногенный состав может вводиться подкожно, внутривожно или внутримышечно в дозе, эффективной для выработки нейтрализующих антител и защиты. Вакцины вводятся способом, совместимым с рецептурой дозировки, и в таком количестве, которое будет профилактически и/или терапевтически эффективным. Иммуногенный состав раскрываемой в настоящей время вакцины может вводиться в качестве первичных профилактических агентов у взрослых или детей, подверженных риску инфицирования, или может использоваться в качестве вторичных агентов для лечения инфицированных пациентов. Например, раскрытый в настоящем документе состав тетравалентной вакцины против живой аттенуированной денге (DEN) может использоваться взрослыми или детьми, подверженными риску заражения вирусом денге, или может использоваться в качестве вторичных агентов для лечения инфицированных пациентов, страдающих от DEN.

Согласно двадцать второму варианту настоящего раскрытия, иммуногенный состав может быть представлен в одноразовых ампулах, ампулах с несколькими дозами или как предварительно заполненные шприцы, где указанный иммуногенный состав может быть приведен в одноразовом графике доз, или предпочтительно в графике многократных доз, в котором первичный курс вакцинации может быть с 1-2 отдельными дозами, с последующими дозами, приведенными в последующие промежутки времени, необходимые для поддержания и или усиления иммунного ответа, например, в течение 1-4 месяцев для второй дозы, и, при необходимости, для последующей(их) дозы (доз) через несколько месяцев или лет. Схема дозировки будет также, по крайней мере частично, определяться в зависимости от потребности в дополнительной дозе, необходимой для обеспечения защитного иммунитета.

Другие варианты, раскрытые в настоящем документе, также включают набор вакцин, состоящий из первого контейнера, содержащего лиофилизированный (сублимированный) иммуногенный состав, и второго контейнера, содержащего водный раствор, по выбору солевого раствора или WFI (вода для инъекций) для восстановления лиофилизированного (сублимированного) иммуногенного состава.

В данном документе термин "включать" или такие его вариации, как "включает" или "включают", будут пониматься как подразумевающие включение заявленного элемента, полностью или частично, или группы элементов, полностью или частично, но не исключая любого другого элемента, полностью или частично, или группы элементов, полностью или частично, и могут означать "включает", "в том числе" и т.п.; термин "состоящий из" или "состоящий" также имеет значение согласно Патентному праву США и данный термин является не ограничивающим и допускает наличие не только того, что процитировано, в той мере в которой основные или новые характеристики того, что процитировано, не изменяются наличием более чем того, что процитировано.

Термин "иммуногенный состав" охватывает любой состав, который вызывает иммунный ответ против антигена или иммуногена, выраженного переносчиками инфекции; например, после введения в организм человека, вызывает иммунный ответ против целевого иммуногена или антигена, представляющего интерес. Термины "состав вакцины" и "вакцина" охватывают любой состав, который вызывает защитный иммунный ответ в отношении интересующего антигена или который эффективно защищает от антигена; например, после введения или инъекции в организм обследуемого вызывает защитный иммунный ответ в отношении интересующего антигена или иммуногена или обеспечивает эффективную защиту от антигена или иммуногена, выраженных переносчиками инфекции.

Использование выражения "по крайней мере" или "по крайней мере один" предполагает использование одного или нескольких элементов или ингредиентов или количеств. Несмотря на то, что некоторые варианты реализации изобретения были описаны, эти варианты были представлены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения или модификации в формулировке этого изобретения, в пределах объема изобретения, могут произойти для специалиста в данной области при рассмотрении раскрытия в данном документе. Такие изменения или модификации вполне соответствуют принципу данного изобретения.

Числовые значения, приведенные для различных физических параметров, размеров и количеств, являются лишь приблизительными, и предполагается, что значения, превышающие числовое значение, присвоенное физическим параметрам, размерам и количествам, подпадают под сферу применения изобретения, если в спецификации не содержится заявления об обратном.

Аналогичным образом, компоненты, используемые при очистке, например, фильтры, колонки, не являются исключительными и могут быть заменены другими компонентами для достижения той же цели по усмотрению практикующего специалиста.

Несмотря на то, что в данном документе сделан значительный акцент на специфические особенности предпочтительного варианта, к нему также можно добавить много дополнительных характеристик и внести много изменений в предпочтительный вариант, не отходя от принципов раскрытия. Эти и другие изменения в предпочтительном варианте осуществления раскрытия будут очевидны для специалиста в данной области техники, при этом следует четко понимать, что вышеописанное должно интерпретироваться просто как иллюстрация раскрытия, а не как ограничение.

Преимущества.

В приведенном выше раскрытии описано изобретение, которое обладает рядом технических усовершенствований и преимуществ, включая, без ограничений, получение стабильного лиофилизированного иммуногенного состава, состоящего из живых аттенуированных рекомбинантных вирусов денге, по крайней мере, одного углевода, по крайней мере, одной аминокислоты и способ изготовления такого состава. По сравнению с другими лиофилизированными иммуногенными составами, данное изобретение обладает следующими преимуществами:

1. Минимальное количество компонентов в составе вакцины.
2. Восстановленная вакцина сохраняет желаемые характеристики вируса, в том числе жизнеспособность, иммуногенность и стабильность.
3. Повышенная стабильность при 2-8°C, 25°C, 37°C, 42°C и 55°C в течение длительного периода времени.
4. Не содержит консервантов, полимеров и поверхностно-активных веществ.
5. Улучшенный способ изготовления описанного стабильного состава/рецептуры, в результате чего обеспечивается повышенная урожайность.

Примеры

Примеры ниже приведены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалисты в данной области должны понимать, что составы и методы, раскрытые в приведенных ниже примерах, представляют собой обнаруженные изобретателем методы, показавшие эффективность в определенных условиях, описанных здесь, и поэтому именно эти условия считаются предпочтительными при осуществлении изобретения на практике. Тем не менее, специалисты в данной области должны понимать, что допускается внесение множества изменений в конкретные варианты осуществления изобретения, несмотря на которые будут получены идентичные или схожие результаты, соответствующие общему духу и содержанию изобретения.

Пример 1.

Многочисленный сбор в сравнении с однократным сбором урожая.

Были проведены определенные эксперименты с целью первоначального определения способа изготовления иммуногенного состава, пригодного для доклинических и клинических испытаний, а также использования флавивирусных иммуногенных составов или вакцин. В некоторых описанных методах в качестве флавивирусов в различных составах для доклинических и клинических испытаний применялись живые, аттенуированные рекомбинантные/химерические вирусы денге. Штаммы вируса денге для создания экспериментальной вакцины были получены от Национального института здравоохранения США (англ. NIH).

Процесс производства живой аттенуированной химерной/рекомбинантной тетравалентной вакцины против вируса денге (DEN) включает в себя любую комбинацию приведенных этапов или все следующие этапы:

1. Клетки Веро были оживлены и адаптированы для культивирования в минимальной питательной среде (MEM) с солевым раствором Хэнкса и 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS);
2. Клетки Веро были первоначально амплифицированы в колбах для тканевых культур (TCF с площадью культивирования 175 см²), в результате чего были получены главные банки и рабочие банки клеток Веро.
3. Криоконсервированные клетки из рабочего клеточного банка оживлялись, амплифицировались и далее перемещались в роллерные бутылки (РБ) (с площадью культивирования 850 см²) и инкубировались при температуре 37±1°C со скоростью вращения 0,7 об/мин для получения монослоев.
4. Монослои клеток Веро в роллерных бутылках заражались рабочим семенем вируса денге серотипов 1, 2, 3 и 4 при множественности заражения (МОИ) 0,01.
5. Все роллерные бутылки инкубировали при температуре 34±1°C в течение 20 мин; с пополнением объема до 120 мл на одну РБ с использованием минимальной питательной среды (MEM) с солевым раствором Хэнкса и 2% эмбриональной бычьей сывороткой. Далее все роллерные бутылки инкубировали при температуре 34±1°C в течение 2 суток со скоростью вращения 0,7 об/мин.
6. На 2-й день монослои в роллерных бутылках промывали свежей вирусной средой, очищенной от эмбриональной бычьей сыворотки, для удаления следов эмбриональной бычьей сыворотки, и инкубировали при температуре 34±1°C со скоростью вращения 0,7 об/мин в течение 3 суток.
7. На 5-е сутки после инфицирования был собран клеточный супернатант из всех инфицированных роллерных бутылок и в бутылки была помещена свежая вирусная среда, включающая минимальную пита-

тельную среду с солевым раствором Хэнке, и дополнительно содержащая декстрозу, L-глутамин и бикарбонат натрия, без эмбриональной бычьей сыворотки.

Таблица 3

Состав минимальной питательной среды с солевым раствором Хэнкса

Компонент	МГ/Л
Хлорид кальция (безводный)	140
Сульфат магния (безводный)	98
Хлорид калия	400
Фосфат калия однозамещенный (безводный)	60
Хлорид натрия	8000
Фосфат натрия двузамещенный (безводный)	48
L-аргинина гидрохлорид	126
L-цистина гидрохлорид	31
L-глутамин	292
L-гистидина гидрохлорид моногидрат	42
L-изолейцин	52
L-лейцин	52
L-лизина гидрохлорид	73
L-метионин	15
L-фенилаланин	32
L-треонин	48
L-триптофан	10
L-тирозина динатрия дигидрат	52
L-валин	46
Холин хлорид	1
Фолиевая кислота	1
I-инозитол	2
Ниацинамид	1
Д-пантотеновая кислота (гемикальций)	1
Пиридоксала гидрохлорид	1
Рибофлавин	0.1
Тиамин гидрохлорид	1
Глюкоза	1000
Фенолсульфоталеин	10

Были применены различные подходы к сбору клеток с вирусом денге, включая однократный и многократный сбор клеток в разное время (со дня 4 до дня 12 после инфицирования) - ежедневно, в нечетные дни, в четные дни, и т.д. Проведено сравнение титров вируса по урожайности при однократном сборе в сравнении с многократным сбором.

Таблица 4

Время сбора клеток

№ набора	Кол-во РБ	Подробные сведения о сборе клеток/ образцов
1	3	Ежедневный сбор клеток в дни 4, 5, 6, 7, 8, 9
2	3	Сбор клеток по четным дням в дни 4, 6, 8
3	3	Сбор клеток по нечетным дням в дни 5, 7, 9, 11
4	3	Ежедневный сбор образцов в дни 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11
5	3	Однократный сбор клеток в день 6
6	3	Однократный сбор клеток в день 7

Начиная со дня 4, сбор клеток из инфицированных РБ проводился по наборам (наборы с 1 по 4) в соответствующие дни. После сбора клеток в РБ была помещена свежая вирусная среда - ВС, и проводилось инкубирование при температуре 34°C до следующего сбора материала. Также был произведен однократный сбор клеточного супернатанта в день 6 (набор 5) и в день 7 (набор 6) соответственно.

Собранные образцы были исследованы для определения титров вируса (CCID₅₀) методом Спирмена-Кербера.

Таблица 5

Титры вируса DEN 1 (CCID ₅₀)					
Дни сбора материала	Титры вируса DEN 1 (CCID ₅₀ /мл)				
	Нечетный день	Четный день	Ежедневно	Однократный сбор	Кривая роста
День 4		5.5	5.5		6
День 5	6.125		6.375		6.3
День 6		6.625	6.375	6.975	7
День 7	7.375		7	7.1	7.25
День 8		7.125	6.625		7.625
День 9	7.25		6.5		7
День 10		6.5	6.125		6.875
День 11	6.25		6.5		7
День 12					6.25

Кривая роста, полученная по вирусу денге серотипа 1 (DEN 1), показала, что многократный сбор материала на 5, 7, 9 и 11 день дал хорошие титры вируса и, следовательно, будет использоваться для дальнейших партий (см. фиг. 4).

Еще одно испытание эффективности многократного сбора в сравнении с однократным сбором было проведено с использованием 18 РБ для Den 2, 3 и 4.

Таблица 6

Титры вируса DEN 2, 3, 4 (CCID ₅₀)				
	Дни сбора материала	Титры вируса (CCID ₅₀ /мл)		
		DEN 2	DEN 3	DEN 4
Многократный сбор	День 5	6.621	5.825	7.432
	День 7	6.73	6.021	7.588
	День 9	6.485	5.76	7.67
	День 11	6.202	5.64	7.321
Однократный сбор	День 6	6.691	5.882	7.575

На фиг. 5 приведены итоговые титры вируса DEN 2, 3, 4 с использованием 90 роллерных бутылей (при многократном сборе и однократном сборе материала).

Суммарная урожайность при многократном сборе клеток из одной партии была значительно выше (около 0,4-0,6 log), чем урожайность, полученная при однократном сборе. Так как 0,3 log эквивалентно удвоенному абсолютному значению; эта разница более существенна. Таким образом, подход многократного сбора клеток является более выгодным и предпочтительным по сравнению с однократным сбором.

Пример 2:

Вирус денге выращивается на клетках Веро. В связи с этим требуется удаление примесей из урожая. Такие примеси, как ДНК клетки-хозяина, обрабатываются бензоназой.

Влияние концентрации бензоназы и температуры на содержание клеточной ДНК и титр вируса.

1. Многократные урожаи были собраны и обработаны отдельно для получения очищенных моновалентных вирусных пулов (CMVP).

2. Урожаи, полученные в результате многократных сборов, очищаются с помощью фильтра 6 μ+0,45 μ и обрабатываются бензоназой для разложения клеточной ДНК.

3. Были проведены различные эксперименты по определению идеальной концентрации бензоназы и температуры для обработки урожая.

В этом эксперименте бензоназа добавлялась в четырех различных концентрациях 500 ед/л, 1250 ед/л, 2500 ед/л и 5000 Еед/л при температуре 34±1°C в течение 2 часов. Было обнаружено, что оптимальный распад ДНК достигался при концентрации бензоназы 1250, 2500 и 5000 ед/л. На основании полученных результатов в качестве рабочей концентрации была выбрана концентрация 1250 ед/л.

Таблица 7

Влияние концентрации бензоназы на содержание ДНК (нг/мл)					
	Контроль	500 ед/л	1250 ед/л	2500 ед/л	5000 ед/л
День 5	127	54	5	6	4
День 7	310	36	7	9	3
День 9	169	19	2	1	5

Смотрите фиг. 6: Влияние концентрации бензоназы на содержание ДНК.

Смотрите фиг. 7: Влияние температуры на содержание клеточной ДНК и титр вируса.

Вирус денге чувствителен к длительному воздействию температуры, поэтому в эксперименте использовался короткий период воздействия, т.е. 2 часа при разной температуре. Было замечено, что при температуре 37°C происходит потеря титра, хотя достигается низкое содержание ДНК. При температуре 34°C потерь титра вируса не наблюдалось, при этом содержание ДНК было низким. При температуре 25°C и 2-8°C потерь титра вируса не наблюдалось, но распад ДНК также был низким. Таким образом, для процесса была выбрана температура 34°C.

Пример 3: Фильтрация и концентрация.

1. Вирус денге выращивается на клетках Веро. В связи с этим требуется удаление примесей из урожая.

2. Примесями считаются ДНК клетки-хозяина, белок клетки-хозяина, остаточный BSA и остаточная бензоназа.

3. Для удаления примесей применялась фильтрация в тангенциальном потоке (ФТП).

4. Урожай, обработанный бензоназой, проходил фильтрацию в тангенциальном потоке для удаления примесей.

В первоначальных экспериментах фильтрация в тангенциальном потоке проводилась с помощью ситовой кассеты Millipore V серии 300 KD и Pall T серии 300 KD. Наблюдалась потеря вируса в фильтрате $\geq 3,5 \log$. Таким образом, планировалось изменить размер кассеты на 100 KD. В ходе экспериментов было обнаружено, что при использовании кассеты Millipore в фильтрате вирус отсутствовал.

В результате проведения различных вариантов фильтрации в тангенциальном потоке, желаемый продукт был получен с использованием ситовых кассет Merck Millipore 100KD V с концентрацией 10X. Концентрация вируса проводится с целью снижения необходимой площади для хранения нефасованной вакцины и удаления примесей. Из приведенной ниже таблицы видно, что после обработки бензоназой и фильтрации в тангенциальном потоке не наблюдалось значительных потерь титра вируса при существенном удалении ДНК клетки-хозяина.

Таблица 8

Концентрация ДНК в клетке-хозяина в нг/мл

Промежуточная стадия изготовления	День сбора урожая		
	5	7	9
DEN 1			
CVP	1754.5	2255.9	1631.2
BCVP	186.42	98.813	88.201
CMVP	2.238	3.583	4.134
DEN 2			
CVP	2430.3	2160.1	2419.2
BCVP	215.809	176.026	95.958
CMVP	15.285	8.236	6.409
DEN 3			
CVP	1578.6	1340.3	522.7
BCVP	93.877	22.9	10.37
CMVP	4.564	4.07	3.43
DEN 4			
CVP	1283.1	350.8	110.1
BCVP	30.19	53.14	26.81
CMVP	7.22	5.93	8.13

CVP:

Очищенный вирусный пул (после фильтрации урожая) BCVP: Очищенный вирусный пул после обработки бензоназой.

CMVP: Очищенный моновалентный вирусный пул (после фильтрации в тангенциальном потоке, добавления стабилизатора и после фильтрации 0.2м).

Таблица 9

ДНК клетки-хозяина в итоговом продукте

Порядковый номер	Номер партии	ДНК (нг/ доза)
1	Партия 1	0.345
2	Партия 2	0.043
3	Партия 3	0.580

Таблица 10

Среднее выделение вируса в 3 последовательных партиях (%)

Серотип	Партия 1	Партия 2	Партия 3	Среднее выделение
DEN 1	88.6	92.4	87.1	89.4
DEN 2	99.1	96.8	94.7	96.9
DEN 3	88.4	94.6	89.2	90.7
DEN 4	98.9	101.4	90.2	96.8

Пример 4:

Исследование различных стабилизаторов и оптимизация рецептуры стабилизатора.

Стабильность живых, аттенуированных флавивирусных иммуногенных составов проверялась как функция потери активности с использованием различных стабилизирующих рецептур (например, потеря титра или $\text{Log}_{10}\text{PFU/доза}$).

Рецептура моновалентной вакцины денге была составлена с использованием различных комбинаций стабилизаторов, которые приведены в табл. 11 и 12. Основными компонентами этих стабилизаторов были желатин, сорбит, сахароза, глицин, фосфаты (KH_2PO_4 , K_2HPO_4), глутамат, гидролизат лактальбумина (ЛАН) и аминокислоты в виде L-гистидина, L-аргинина гидрохлорида, L-аланина, трицина и др.

Таблица 11

Разные комбинации стабилизаторов

Номер	Состав стабилизатора
A	Желатин 2% + сахароза 20% + аминокислоты (2X)
B	Желатин 2% + сахароза 10% + аминокислоты (2X)
C	Желатин 2% + ЛАН 0,70% + сахароза 20% + аминокислоты (2X)
D	Сахароза-фосфат-глутамат (2X) + ЛАН 4% + глицин 10% + аминокислоты (2X)
E	Желатин 12,5% - сорбит 25% + стабилизатор-II - Пропорция смешивания 80:20:10
F	Желатин 12,5% - сорбит 25% + стабилизатор-II - Пропорция смешивания 1:1
G	Сахароза 12,5% м/о + глицин 12,5% м/о (60:40)

Стабилизатор-II содержит L-гистидин (2,1%), L-аланин (1%), трицин (3%), L-аргинина гидрохлорид (16%), гидролизат лактальбумина (3,5%). Полученный объем концентрата вируса после фильтрации в тангенциальном потоке (конц. ФТП) был стабилизирован с использованием различных комбинаций стабилизаторов, описанных ниже:

Таблица 12

Итоговая рецептура

Номер	Рецептура
A	50 мл конц. ФТП + 50мл стабилизатора A (2X) = 100 мл
B	50 мл конц. ФТП + 50мл стабилизатора B (2X) = 100 мл
C	50 мл конц. ФТП + 50мл стабилизатора C (2X) = 100 мл
D	50 мл конц. ФТП + 50мл стабилизатора D (2X) = 100 мл
E	320 мл конц. ФТП + 120мл стабилизатора E = 440 мл
F	50 мл конц. ФТП + 50мл стабилизатора F (2X) = 100 мл
Lyо 1	320 мл конц. ФТП + 120мл стабилизатора E = 440 мл
Lyо 2	50 мл конц. ФТП + 33мл стабилизатора G = 83 мл

Все эти рецептуры подвергались исследованию на термическую стабильность при 37°C в течение 7 дней. Образцы были протестированы на титры инфекционности CCID_{50} с перерывом 0, 1, 3, 5 и 7 дней.

Результаты исследования титров инфекционности различных жидких рецептур показали значительное снижение с последующей полной потерей (через 1-5 дней) соответствующих титров вируса денге.

Выявленная неспособность жидкой рецептуры сохранять стабильность обусловила проведение испытаний лиофилизированных составов. Моновалентная вакцина денге, содержащая желатин + сорбит + стабилизатор II (стабилизатор E), была подвергнута лиофилизации и проверена на термическую стабильность при температуре 37°C в течение 7 дней. Образцы были протестированы на титры инфекционности CCID_{50} , с перерывом 0, 1, 3, 5 и 7 дней. Результаты исследования титров инфекционности показали более высокий профиль стабильности по сравнению с жидкими рецептурами при значительном сохранении вирусных титров. Таким образом, подход, предусматривающий лиофилизацию моновалентной смеси денге, помог успешно решить проблему низкой стабильности и значительно снизить потери вирусных титров. Также был опробован еще один стабилизатор G, имеющий в своем составе сахарозу + глицин, который в лиофилизированной форме отлично проявил себя для всех четырех видов вируса денге. Образцы были протестированы на титры инфекционности CCID_{50} , с перерывом 0, 1, 3, 5 и 7 дней. Результаты исследования титров инфекционности показали более высокий профиль стабильности по сравнению с другими стабилизаторами, например, состава желатин + сорбит + стабилизатор II. Кроме того, он прост в приготовлении и использовании, так как имеет неживотное происхождение.

Таблица 13

Титры вируса DEN 1 CCID₅₀/мл (Жидкая форма в сравнении с лиофилизированной)

Время хранения	A	B	C	D	E	F	LYO 1	LYO 2
0	7.21	7.35	7.07	7.07	7.21	7.21	5.78	5.62
1	5.21	4.07	4.07	4.78	2.78	2.78	5.78	5.59
3	2.92	2.78	0	2.64	2.64	2.64	5.35	5.46
5	0	0	0	0	0	0	4.78	5.31
7	-	-	-	-	-	-	4.64	5.18

См. фиг. 8: Титры вируса DEN 1 CCID₅₀/мл (Жидкая форма в сравнении с лиофилизированной).

Таблица 14

Титры вируса DEN 2 CCID₅₀/мл (Жидкая форма в сравнении с лиофилизированной)

Время хранения	A	B	C	D	LYO 1	LYO 2
0	5.625	5.75	4.88	5	4.64	4.7
1	0	0	0	0	4.21	4.52
3	-	-	-	-	4.07	4.43
5	-	-	-	-	3.75	4.26
7	-	-	-	-	3.5	4.15

См. фиг. 9: Титры вируса DEN 2 CCID₅₀/мл (Жидкая форма в сравнении с лиофилизированной).

Таблица 15

Титры вируса DEN 3 CCID₅₀/мл (Жидкая форма в сравнении с лиофилизированной)

Время хранения	A	B	C	D	F	LYO 1	LYO 2
0	6.92	7.07	6.35	6.92	6.78	6.83	6.76
1	4.21	4.92	3.6	4.07	0	6.69	6.65
3	0	0	0	0	НТ	6.58	6.56
5	НТ	НТ	НТ	НТ	НТ	6.43	6.44
7	НТ	НТ	НТ	НТ	НТ	6.35	6.33

НТ - Не тестировалось.

Смотрите фиг. 10: Титры вируса DEN 3 CCID₅₀/мл (Жидкий состав в сравнении с лиофилизированным).

Таблица 16

Титры вируса DEN 4 CCID ₅₀ /мл (Жидкая форма в сравнении с лиофилизированной) В время хранения	LYO 1	LYO 2
0	4.64	4.78
1	4.64	4.75
3	4.64	4.74
5	4.25	4.57
7	3.87	4.32

Смотрите фиг. 11: Титры вируса DEN 4 CCID₅₀/мл (Ллиофилизированная форма).

С учетом всех вышеперечисленных результатов исследования стабильности, лучший профиль стабильности был получен с LYO 2 (сахароза и глицин). Таким образом, стабилизатор состава сахароза и глицин был оптимизирован для получения более стабильной рецептуры.

Пример 5:

Условия лиофилизации.

Для разработки вакцины против денге сначала мы испытывали различные составы стабилизатора для жидкой вакцины, но было обнаружено, что вирус теряет стабильность в жидком препарате, и в течение 5 дней при температуре 37°C наблюдалась значительная потеря титра в жидком препарате. Жидкая рецептура не подходит для вакцины против денге. Поэтому в дальнейшем мы решили провести испытания вакцины против денге с использованием лиофилизации.

Планировались и проводились различные испытания с применением лиофилизации на моновалентной вакцине денге, а также на тетравалентной вакцине для изучения пригодности стабилизатора для приготовления вакцины и стабильности всех четырех серотипов вируса в тетравалентной вакцине, хранящейся при низкой температуре.

Наши исследования показали, что вирус сохраняет более высокую стабильность в лиофилизированной форме по сравнению с жидкой, и после лиофилизации не наблюдалось потери титра вируса, что проиллюстрировано в примере 4.

Мы выбрали лиофилизированную форму вакцины против денге для обеспечения лучшей стабильности продукта. Испытания по лиофилизации проводились с использованием в качестве стабилизаторов для вакцины денге CMVP составов желатин-сорбитол или сахароза-глицин, как показано в примере 4. Поскольку желатин имеет свиное происхождение, в настоящее время существуют некоторые этические вопросы его использования в составе вакцины. Также высока сложность его приготовления, так как требуется проведение гидролиза желатина при высокой температуре. При использовании желатино-сорбитового стабилизатора не наблюдается постоянство в титрах инфекционности всех четырех серотипов и наблюдается значительная потеря вируса от стадии оттаивания до стадии лиофилизации.

После ряда испытаний вакцины против вируса денге с применением лиофилизации и с использованием состава желатин + сорбит + стабилизатор II мы перешли на состав сахароза + глицин, как показано в примере 4, а испытания с применением лиофилизации показали более высокую стабильность вируса при использовании рецептуры LYO 2 по сравнению с рецептурой LYO 1.

Таблица 17

Оптимизация цикла лиофилизации

Испытание №	Цикл лиофилизации в часах	Потеря титра (БОЕ/мл)	Содержание влаги (м/о %)
1	43 ч.	0.056	2.761
2	42 ч.	0.089	3.280
3	27 ч.	+0.017	3.343
4	35 ч.	0.292	3.098
5	39 ч.	0.154	2.575
6	45 ч.	0.282	2.814
7	56 ч.	0	2.495

В испытаниях № 1-7 изменялась продолжительность цикла лиофилизации от стандартной продолжительности цикла 56 часов. Сокращение часов цикла лиофилизации повлияло на потерю титра и содержание влаги. Существенных потерь вирусного титра не было, однако, содержание влаги увеличилось с 2,50% до 3,34% в процентном отношении масс по мере сокращения времени цикла. Таким образом, была задана продолжительность цикла лиофилизации порядка 56 часов.

Таблица 18

Параметры процесса лиофилизации

Действие	Параметры
Заморозка	-45°C в теч. 13.5± 2 ч.
Охлаждение в конденсаторе	≤ 1 ч.
Извлечение из камеры	≤ 1 ч.
Первичная сушка	-45°C до 25°C в теч. 33± 3 ч.
Вторичная сушка	-25°C в теч. 8± 0.5 ч.

Смотрите фиг. 12: Цикл лиофилизации.

Пример 6: Данные о стабильности после лиофилизации моновалентной массы вируса денге при 37±1°C в течение 14 суток.

Моновалентные массы вируса денге (DEN 1,2,3,4) были сформированы с различными концентрациями сахарозы и глицина для получения окончательной рецептуры, включающей концентрацию сахарозы и глицина, как указано в табл. 19 (SG1, SG2, SG3, SG4, SG5, SG6). Стабилизированные моновалентные препараты были лиофилизированы с использованием стандартного протокола лиофилизации. Все лиофилизированные моновалентные и тетравалентные препараты вируса денге, приведенные в табл. ниже, в течение 14 дней подвергались исследованию на термическую стабильность при 37±1°C. Образцы были отобраны в соответствующие моменты времени и протестированы на титры инфекционности.

Таблица 19

Составы, включающие сахарозу + глицин

Код состава	Сахароза	Глицин
SG1	5% м/о	3% м/о
SG2	3% м/о	5% м/о
SG3	5% м/о	5% м/о
SG4	10% м/о	7% м/о
SG5	4.5% м/о	5% м/о
SG6	6% м/о	6% м/о

Таблица 20А

Моновалентная вакцина денге состав SG1

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	3% м/о

Таблица 20В

Моновалентная вакцина денге состав SG2

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	3% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 20С

Моновалентная вакцина денге состав SG3

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 20D

Моновалентная вакцина денге состав SG4

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	10% м/о
Глицин	7% м/о

Таблица 20Е

Моновалентная вакцина денге состав SG5

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	4.5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 20F

Моновалентная вакцина денге состав SG6

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	6% м/о
Глицин	6% м/о

Таблица 21А

Моновалентная вакцина денге состав SG1

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	3% м/о

Таблица 21В

Моновалентная вакцина денге состав SG2

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Сахароза	3% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 21С

Моновалентная вакцина денге состав SG3

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 21D

Моновалентная вакцина денге состав SG4

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Сахароза	10% м/о
Глицин	7% м/о

Таблица 21E

Моновалентная вакцина денге состав SG5

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Сахароза	4.5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 21F

Моновалентная вакцина денге состав SG6

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Сахароза	6% м/о
Глицин	6% м/о

Таблица 22А

Моновалентная вакцина денге состав SG1

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	3% м/о

Таблица 22В

Моновалентная вакцина денге состав SG2

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	3% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 22С

Моновалентная вакцина денге состав SG3

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 22D

Моновалентная вакцина денге состав SG4

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	10% м/о
Глицин	7% м/о

Таблица 22E

Моновалентная вакцина денге состав SG5

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	4.5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 22F

Моновалентная вакцина денге состав SG6

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	6% м/о
Глицин	6% м/о

Таблица 23А

Моновалентная вакцина денге состав SG1

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	3% м/о

Таблица 23В

Моновалентная вакцина денге состав SG2

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	3% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 23С

Моновалентная вакцина денге состав SG3

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 23D

Моновалентная вакцина денге состав SG4

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	10% м/о
Глицин	7% м/о

Таблица 23E

Моновалентная вакцина денге состав SG5

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	4.5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 23F

Моновалентная вакцина денге состав SG6

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	6% м/о
Глицин	6% м/о

Таблица 24

Тетравалентная вакцина денге состав SG1

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	3% м/о

Таблица 25

Тетравалентная вакцина денге состав SG2

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	3% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 26

Тетравалентная вакцина денге состав SG3

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 27

Тетравалентная вакцина денге состав SG4

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	10% м/о
Глицин	7% м/о

Таблица 28

Тетравалентная вакцина денге состав SG5

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	4.5% м/о
Глицин	5% м/о

Таблица 29

Тетравалентная вакцина денге состав SG6

Компонент	Кол-во на дозу в 0,5 мл
Вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30)	NLT log ₁₀ 3.0 БОЕ
Вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30)	NLT log ₁₀ 2.5 БОЕ
Сахароза	6% м/о
Глицин	6% м/о

Таблица 30

DEN 1 Титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации

Время хранения	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6
0	7.105	7.024	7.217	7.185	7.060	6.994
1	7.020	7.051	7.300	7.242	7.021	6.950
3	6.898	6.917	7.152	7.082	6.935	6.886
5	6.925	6.720	6.954	6.981	6.724	6.817
7	6.700	6.510	6.872	6.732	6.600	6.746
14	6.346	6.180	6.585	6.500	6.312	6.395

См. фиг. 13: DEN-1 титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации.

Таблица 31

DEN 2 Титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации

Время хранения	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6
0	6.775	6.821	6.824	6.780	6.900	6.772
1	6.650	6.760	6.797	6.802	6.855	6.780
3	6.684	6.617	6.712	6.689	6.723	6.665
5	6.521	6.588	6.610	6.584	6.692	6.610
7	6.246	6.405	6.482	6.410	6.536	6.538
14	6.060	6.144	6.227	6.197	6.272	6.294

См. фиг. 14: DEN-2 титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации.

Таблица 32

DEN 3 Титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации

Время хранения	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6
0	5.929	5.864	5.882	5.877	5.765	5.800
1	5.788	5.712	5.800	5.762	5.692	5.728
3	5.621	5.644	5.725	5.688	5.566	5.610
5	5.546	5.571	5.622	5.621	5.487	5.543
7	5.440	5.473	5.496	5.492	5.351	5.414
14	5.132	5.082	5.184	5.131	5.139	5.220

См. фиг. 15: DEN-3 титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации.

Таблица 33

DEN 4 Титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации

Время хранения	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6
0	7.429	7.441	7.512	7.464	7.500	7.471
1	7.366	7.400	7.504	7.471	7.432	7.388
3	7.302	7.343	7.438	7.402	7.386	7.295
5	7.210	7.219	7.393	7.330	7.277	7.197
7	7.157	7.134	7.268	7.225	7.150	7.065
14	6.809	6.792	7.021	6.96	6.880	6.782

См. фиг. 16: DEN-4 титер \log_{10} БОЕ/мл после лиофилизации.

Указанные выше результаты термической стабильности лиофилизированных моновалентных препаратов, содержащих различные концентрации стабилизаторов сахарозы и глицина свидетельствуют о том, что концентрация как сахарозы, так и глицина играет важную роль в поддержании титра вирусной инфекционности.

Сравнительно большие различия в титрах вирусов наблюдались в рецептурах SG1 и SG2. Существенной разницы с рецептурами SG3, SG4, SG 5, SG 6 во всех четырех серотипах не наблюдалось. Тем не менее, SG3, т.е. 5%-ная сахароза и 5%-ная глициновая рецептура, были выбраны в качестве стабилизатора для последующих партий.

Пример 7:

Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге, живая аттенуированная вакцина (рекомбинантная, лиофилизированная).

Тетравалентная вакцина денге (DTV) (живая, аттенуированная, рекомбинантная), имеющая комбинацию серотипов (DEN-1, DEN 2, DEN-3, DEN-4), стабилизированная с использованием состава сахаро-

зы-глицина (SG), как показано в примере 6, и далее лиофилизированная согласно примеру 5 в 3 мл стеклянных флаконах типа 1 USP. Система закрытия контейнеров состоит из бромбутиловых резиновых пробок и откидных алюминиевых и пластмассовых колпачков. Стабильность и качество SG-стабилизированной вакцины были оценены в контейнерах с вышеупомянутой системой закрытия для последующих исследований в соответствии с требованием МКГ для поддержки срока годности ЛП.

Параметры стабильности, указывающие на долгосрочную стабильность/в реальном времени, были следующими:

1. Титры вируса в каждом серотипе.
2. pH.
3. Содержание влаги.

1. Данные по стабильности тетравалентной вакцины денге при температуре 2-8°C до 12 месяцев после лиофилизации:

Таблица 34А

DEN-1 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-8°C до 12 месяцев

№.	0	1	2	3	6	9	12
Партия 4	4.62	4.43	4.29	4.44	4.61	4.4	4.65
Партия 5	5.17	4.8	4.69	4.85	4.83	4.67	4.59
Партия 6	4.88	4.57	4.57	4.7	4.55	4.62	4.59

См. фиг. 17А: DEN-1 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-80°C до 12 месяцев.

Таблица 34В

DEN-2 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-8°C до 12 месяцев

№.	0	1	2	3	6	9	12
Партия 4	5.22	5.06	4.93	4.92	5.14	4.85	4.88
Партия 5	5.03	4.79	4.82	4.81	4.80	4.78	4.38
Партия 6	5.01	4.93	4.85	4.86	4.88	4.63	4.24

См. фиг. 17В: DEN-2 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-80°C до 12 месяцев.

Таблица 34С

DEN-3 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-80°C до 12 месяцев

№.	0	1	2	3	6	9	12
Партия 4	4.62	4.31	4.25	4.38	4.56	4.33	4.52
Партия 5	5.30	4.85	4.51	5.05	4.96	4.69	4.45
Партия 6	5.00	4.57	4.52	4.69	4.59	4.54	4.05

См. фиг. 17С: DEN-3 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-80°C до 12 месяцев.

Таблица 34D

DEN-4 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-80°C до 12 месяцев

№.	0	1	2	3	6	9	12
Партия 4	5.28	5.09	4.89	4.92	5.06	4.91	4.90
Партия 5	5.27	5.02	4.93	4.9	5.04	4.84	4.38
Партия 6	4.78	4.34	4.53	4.49	4.66	4.36	3.97

См. фиг. 17D: DEN-4 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-80°C до 12 месяцев.

pH и влагосодержание оценивалось в пределах 2-80°C до 12 месяцев. pH оставался в пределах от 7,6 до 7,8 (фиг. 18). Остаточная влажность оставалась ниже 3,0% м/д вплоть до 12 месяцев хранения (фиг. 19).

2. Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при 25°C±2°C и относительной влажности 60%±5% до 6 месяцев после лиофилизации:

Таблица 35А

DEN-1 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C до 6 месяцев

№.	0	1	2	3	6
Партия 4	4.32	4.19	4.44	4.47	4.39
Партия 5	4.87	4.82	4.87	4.81	4.74
Партия 6	4.57	4.70	4.77	4.62	4.61

См. фиг. 20А: DEN-1 титер Log₁₀ БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C±2°C до 6 месяцев.

Таблица 35B

DEN-2 титер Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C до 6 месяцев

№.	0	1	2	3	6
Партия 4	4.92	4.95	5.11	5.10	4.87
Партия 5	4.73	4.69	4.89	4.91	4.74
Партия 6	4.71	4.72	4.85	4.81	4.67

См. фиг. 20B: DEN-2 титер Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C±2°C до 6 месяцев.

Таблица 35C

DEN-3 титер Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C до 6 месяцев

№.	0	1	2	3	6
Партия 4	4.32	4.36	4.35	4.37	4.40
Партия 5	4.99	4.86	4.91	5.03	4.85
Партия 6	4.69	4.66	4.76	4.84	4.65

См. фиг. 20C: DEN-3 титер Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C±2°C до 6 месяцев.

Таблица 35D

DEN-4 титер Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C до 6 месяцев

№.	0	1	2	3	6
Партия 4	4.98	4.95	5.11	5.08	4.91
Партия 5	4.97	4.86	5.08	5.03	4.89
Партия 6	4.48	4.43	4.57	4.39	4.36

См. фиг. 20D: DEN-4 титер Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 25°C±2°C до 6 месяцев.

pH и влажность оценивались на начальной и конечной временной точке при 25°C±2°C до 6 месяцев (6 месяцев после воздействия). При хранении в условиях ускорения в течение 6 мес не происходило изменения pH по сравнению с исходными значениями ($p < 0,001$); среднее ±3SD изменилось с 7,60-7,79 до 7,54-7,71 (фиг. 21). Содержание остаточной влаги оставалось в пределах верхнего предела 3% м/д, среднее ±3SD - 1,845-2,774% м/д через 6 мес после хранения (фиг. 22).

3. Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при 37°C±1°C до 7 дней после лиофилизации:

Партии подвергались температуре 37°C±1°C в течение 7 дней. Вирусные серотипы (DEN1-4) были титрованы, и была рассчитана потеря в титрах. Потеря в титрах была постоянной во всех партиях. Среднее значение потери Log_{10} в вирусных титрах и стандартное отклонение серотипов денге 1 - денге 4 в лиофилизированных DTV составили 0,604±0,117, 0,607±0,066, 0,548±0,130, 0,684±0,109 соответственно (фиг. 23).

Таблица 36

Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при 37°C±1°C до 7 дней после лиофилизации

П.№.	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4
Партия 1	0.60	0.68	0.60	0.68
Партия 2	0.68	0.61	0.69	0.62
Партия 3	0.50	0.54	0.41	0.61
Партия 4	0.67	0.67	0.52	0.76
Партия 5	0.69	0.50	0.65	0.69
Партия 6	0.71	0.65	0.63	0.87

См. фиг. 23: Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при 37°C±1°C до 7 дней после лиофилизации.

4. Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при 42°C±1°C до 7 дней после лиофилизации.

Стабильность тетравалентной вакцины денге (DTV) (живой, аттенуированной) была оценена на представительной партии. Лيوфилизированные ампулы с готовой продукцией подвергались термическому стрессу при 42°C в течение 7 дней. Каждый серотип вируса (DEN1-4) был титрован в конце периода воздействия, по сравнению с исходным титром и была рассчитана потеря в титрах.

(См. фиг. 24).

Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ до 7 дней после лиофилизации

Дней после воздействия	Log ₁₀ построя титров вируса DTV (БОЕ/0.5 мл)			
	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4
0 дней	4.41	4.43	4.26	4.06
7 дней	3.91	3.81	3.83	3.42
Потеря в титрах	0.50	0.62	0.43	0.64

5. Данные о стабильности тетравалентной вакцины денге при $55^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ до 2 дней после лиофилизации.

Стабильность тетравалентной вакцины денге (DTV) (живой, аттенуированной) была оценена на представительной партии. Лиофилизированные ампулы с готовой продукцией подвергались термическому стрессу при 55°C в течение 2 дней. Каждый серотип вируса (DEN1-4) был титрован в конце периода воздействия, по сравнению с исходным титром и была рассчитана потеря в титрах.

Хотя настоящее изобретение было описано в отношении некоторых предпочтительных вариантов реализации, специалистам в данной области будет ясно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от объема изобретения, как он определен в следующих пунктах формулы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуногенный состав, включающий в себя:

а) один или более живых аттенуированных вирусов денге (DEN), включающих в себя множество живых аттенуированных вирусов денге (DEN) различных серотипов, отобранных из группы DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4, в котором вирус денге присутствует в дозе $2,5-3,0 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл;

б) сахарозу в количестве 3-6% (в/о); и

с) глицин в количестве 3-6% (в/о);

в котором состав лиофилизирован, а восстановленный состав сохраняет желаемые характеристики вируса, включая его жизнеспособность, иммуногенность и стабильность.

2. Иммуногенный состав, заявленный в п.1, в котором живые аттенуированные вирусы денге (DEN) являются тетравалентными, включающими серотипы вируса денге DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4.

3. Иммуногенный состав, заявленный в п.2, в котором живые аттенуированные вирусы денге (DEN) являются рекомбинантными вирусами денге и/или химерными вирусами денге, содержащими первую нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один структурный белок от первого вируса денге, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую неструктурные белки от второго вируса денге.

4. Иммуногенный состав, заявленный в любом из пунктов формулы 1-3, в котором указанные живые аттенуированные серотипы вируса денге DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4 несут 30 нуклеотидных делеций, обозначаемых мутацией $\Delta 30$, и/или 31 нуклеотидную делецию, обозначаемую мутацией $\Delta 31$, в 3' нетранслируемой области генома вируса денге.

5. Иммуногенный состав, заявленный в любом из пунктов формулы 1-4, в котором указанные живые аттенуированные серотипы вируса денге DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4 имеют фенотип, которым является температурная чувствительность в клетках Веро или линии клеток печени человека HuH-7.

6. Иммуногенный состав, заявленный в п.1, в котором лиофилизированный состав восстанавливается водным раствором, выбранным из физраствора и WFI (воды для инъекций), и где конечный pH иммуногенного состава составляет 7-8.

7. Иммуногенный состав по п.1, включающий в себя:

- а) вирус денге серотипа 1 (rDEN 1 Δ 30),
- б) вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4 Δ 30),
- с) вирус денге серотипа 3 (rDEN 3 Δ 30/31),
- д) вирус денге серотипа 4 (rDEN 4 Δ 30),
- е) сахарозу в количестве 3-6% (м/о),
- ф) глицин в количестве 3-6% (м/о).

8. Иммуногенный состав по п.7, включающий в себя:

- а) вирус денге серотипа 1 (rDEN 1 Δ 30),
- б) вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4 Δ 30),
- с) вирус денге серотипа 3 (rDEN 3 Δ 30/31),
- д) вирус денге серотипа 4 (rDEN 4 Δ 30),
- е) сахарозу в количестве 4-5% (м/о) и
- ф) глицин в количестве 4-5% (м/о).

9. Иммуногенный состав по п.7, включающий в себя:

- a) вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- b) вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- c) вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- d) вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- e) сахарозу 5% (м/о) и
- f) глицин 5% (м/о).

10. Иммуногенный состав по п.7, включающий в себя:

- a) вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- b) вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- c) вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- d) вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- e) сахарозу в количестве 4,5% (м/о) и
- f) глицин в количестве 5% (м/о).

11. Иммуногенный состав по п.7, включающий в себя:

- a) вирус денге серотипа 1 (rDEN 1Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- b) вирус денге серотипа 2 (rDEN 2/4Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- c) вирус денге серотипа 3 (rDEN 3Δ30/31), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- d) вирус денге серотипа 4 (rDEN 4Δ30), не менее, чем $2.5 \log_{10}$ БОЕ/0,5 мл,
- e) сахарозу в количестве 6% (м/о) и
- f) глицин в количестве 6% (м/о).

12. Способ производства иммуногенного состава по любому из п.1-11, включающий в себя следующие шаги, такие как:

a) Многократный сбор супернатанта, содержащего хотя бы один серотип вируса денге в минимальной питательной среде с солевым раствором Хэнкса, дополнительно содержащим декстрозу, L-глутамин и бикарбонат натрия, причем множественный сбор осуществляется в одной партии;

b) Фильтрация полученного вирусного урожая с помощью прямой фильтрации потока (DFF) по крайней мере через один осветляющий фильтр с размером пор от 6 до 0,45 мкм.

c) Обработка полученного вирусного урожая неспецифической эндонуклеазой при $34 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение минимум 2 ч, причем неспецифическая эндонуклеаза представляет собой бенсоназу, имеющую концентрацию в диапазоне от 0,5 до 5 единиц/мл;

d) Концентрация полученного вирусного урожая путем тангенциальной фильтрации потока (TFF) с использованием мембраны с молекулярно-массовым отсечением (MWCO) 100 кДа;

e) Стабилизация полученного вирусного урожая с помощью стабилизирующего средства, состоящего из сахарозы в концентрации 3-6% м/о и глицина в концентрации 3-6% м/о, для формирования стабилизированного вирусного урожая, и

f) Стерилизация стабилизированного урожая вирусов с помощью прямой фильтрации потока через минимум один осветляющий фильтр с размером пор от 0,8 до 0,2 мкм для формирования стерилизованного урожая очищенного вируса, где общее восстановление очищенных вирусов составляет не менее 50%, и

g) лиофильная сушка стерилизованного урожая вируса, включающая стадии замораживания, первичной сушки и вторичной сушки, где

i. стадия замораживания включает замораживание при -45°C в течение от 690 до 930 мин;

ii. стадия первичной сушки включает нагрев при температуре от $+0,5$ до $1,0^\circ\text{C}/\text{мин}$ для достижения температуры -25°C при выдержке от 1800 до 1980 мин; и

iii. стадия вторичной сушки включает нагрев при температуре от $+0,5$ до $1,0^\circ\text{C}/\text{мин}$ для достижения температуры $+25^\circ\text{C}$ при выдержке от 420 до 540 мин.

13. Способ, заявленный в п.12, при котором вирусный урожай обрабатывается бенсоназой с концентрацией 1,25 ед/мл.

14. Способ, заявленный в п.12, при котором вирусный урожай подвергается тангенциальной фильтрации потока (TFF), в результате которой концентрация вирусного урожая увеличивается минимум в 10 раз.

15. Способ, заявленный в п.12, в котором стабилизирующий агент состоит из сахарозы в концентрации 4-5% (м/о) и глицина в концентрации 4-5% (м/о).

16. Способ, заявленный в п.12, в котором стабилизирующий агент состоит из сахарозы в концентрации 5% (м/о) и глицина в концентрации 5% (м/о).

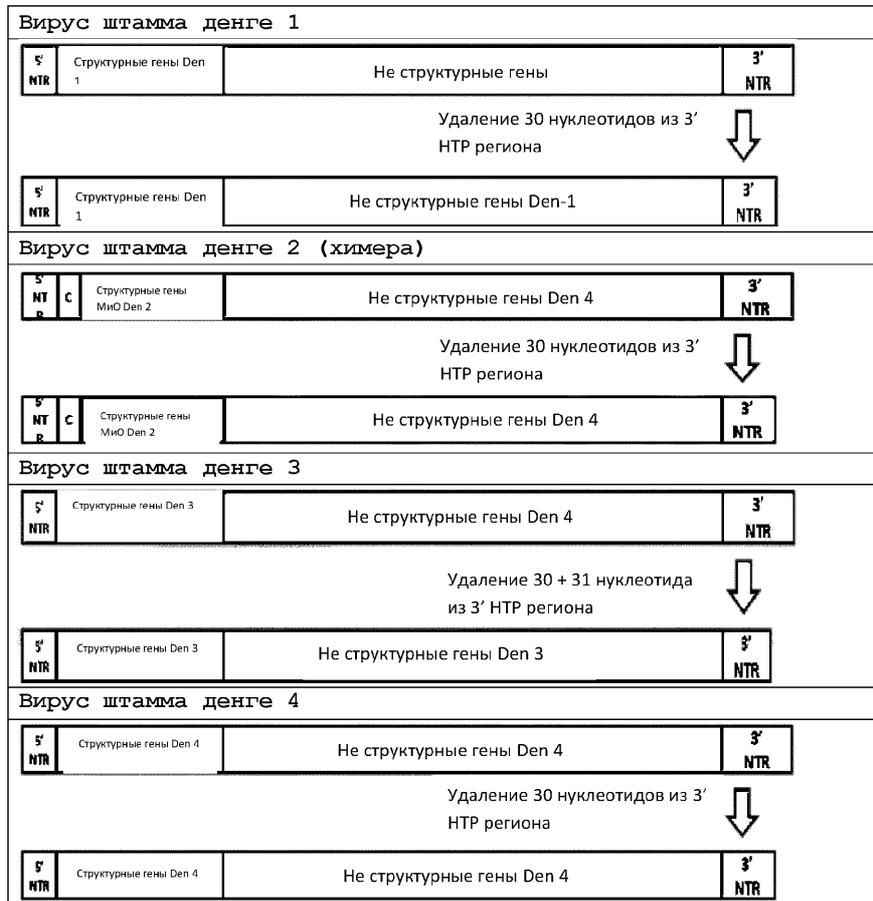
17. Способ, заявленный в п.12, в котором стабилизирующий агент состоит из сахарозы в концентрации 4,5% (м/о) и глицина в концентрации 5% (м/о).

18. Способ, заявленный в п.12, в котором стабилизирующий агент состоит из сахарозы в концентрации 6% (м/о) и глицина в концентрации 6% (м/о).

19. Набор для восстановления лиофилизованного (сублимированного) иммуногенного состава, про-

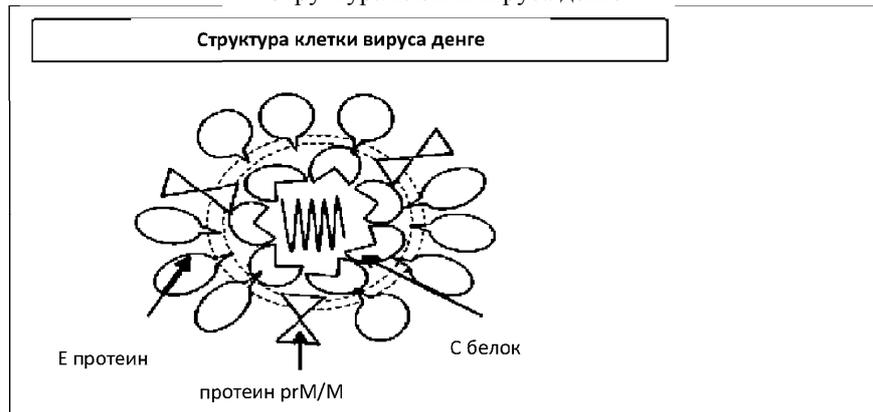
изведенного согласно пп.12-18, включающий в себя первый контейнер, содержащий иммуногенный состав по любому из предыдущих пунктов, второй контейнер, содержащий водный раствор, выбранный из физиологического раствора или воды для инъекций (WFI).

Последовательность РНК штаммов вируса денге



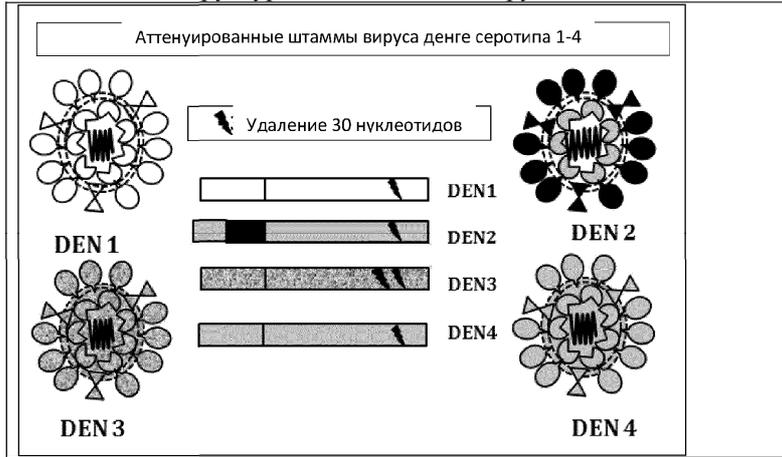
Фиг. 1

Структура клетки вируса денге



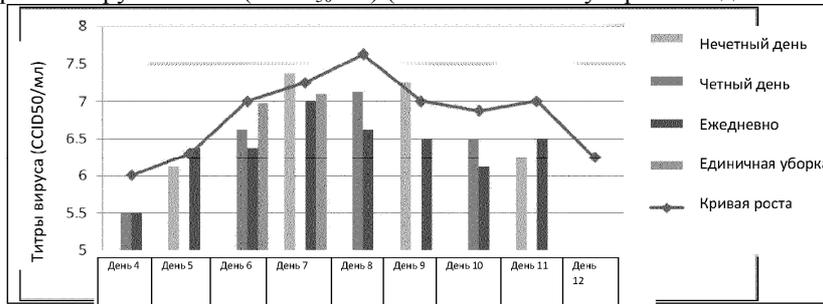
Фиг. 2

Структура штамма клетки вируса денге



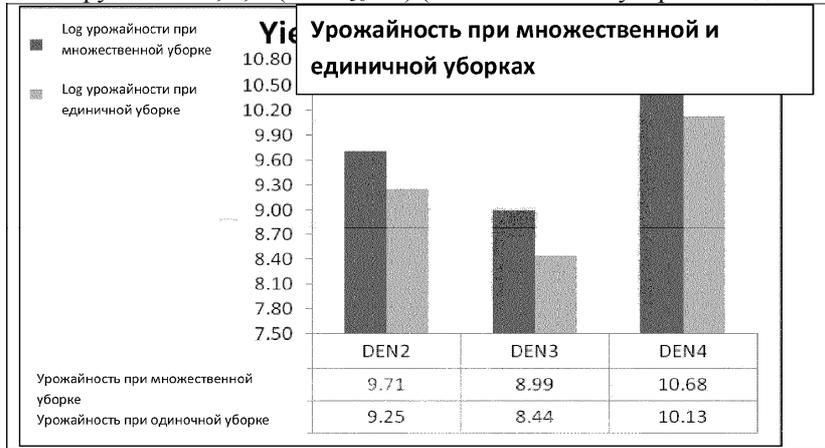
Фиг. 3

Титры урожая вируса DEN 1 (CCID₅₀/мл) (множественные уборки vs. единичная уборка)



Фиг. 4

Титры урожая вируса DEN 2, 3, 4 (CCID₅₀/мл) (множественные уборки vs. единичная уборка)



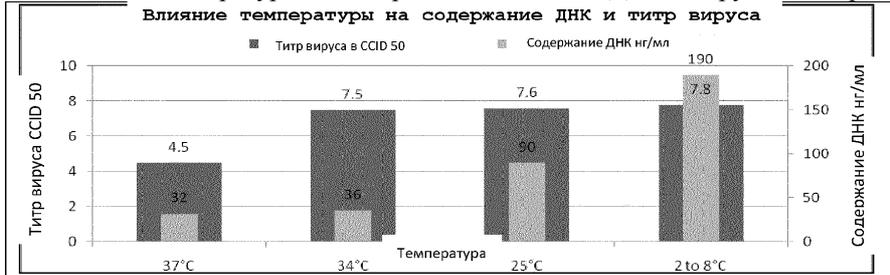
Фиг. 5

Влияние концентрации бензоназы на содержание ДНК



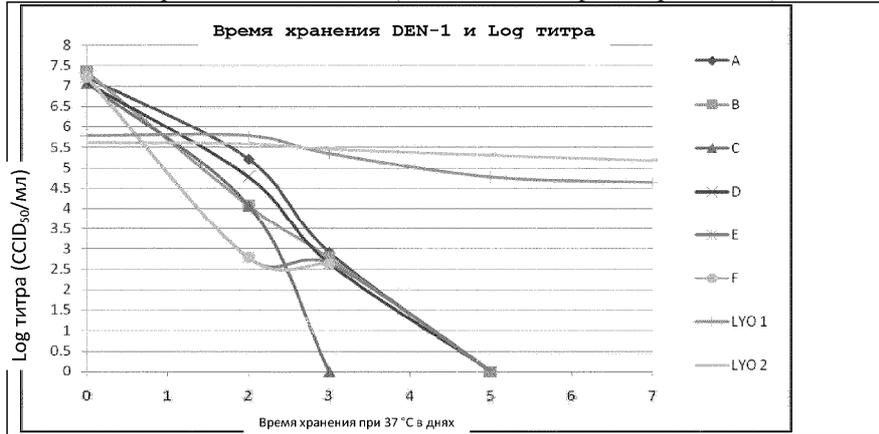
Фиг. 6

Влияние температуры на содержание клеточной ДНК и вирусный титр



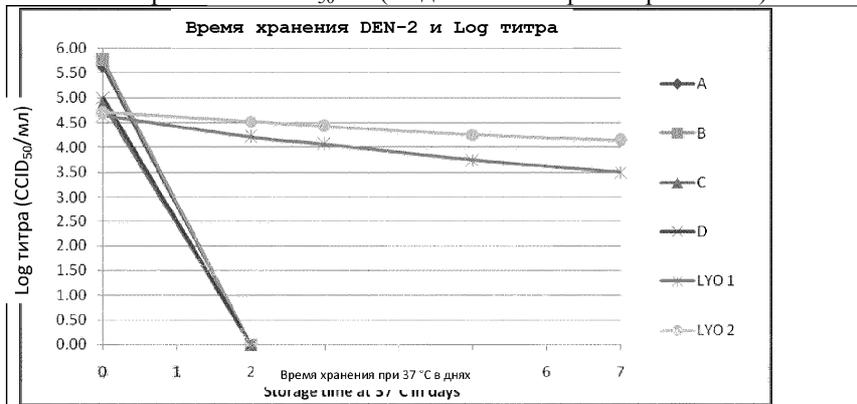
Фиг. 7

Титр DEN-1 CCID₅₀/мл (жидкий vs. лиофилизированный)



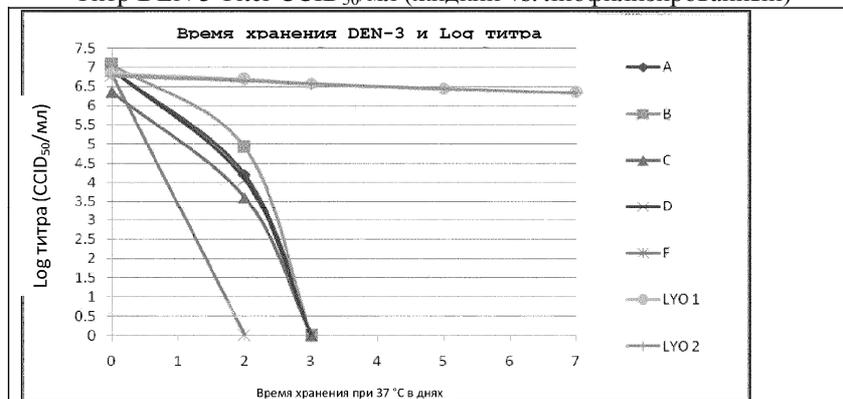
Фиг. 8

Титр DEN 2 CCID₅₀/мл (жидкий vs. лиофилизированный)



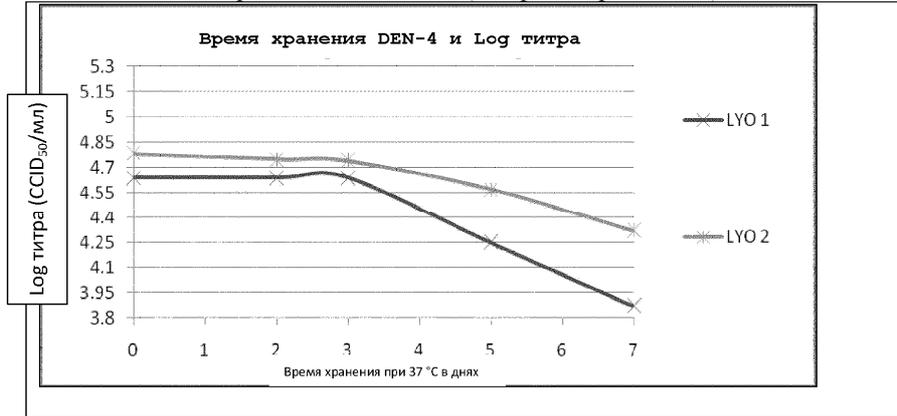
Фиг. 9

Титр DEN 3 Titer CCID₅₀/мл (жидкий vs. лиофилизированный)



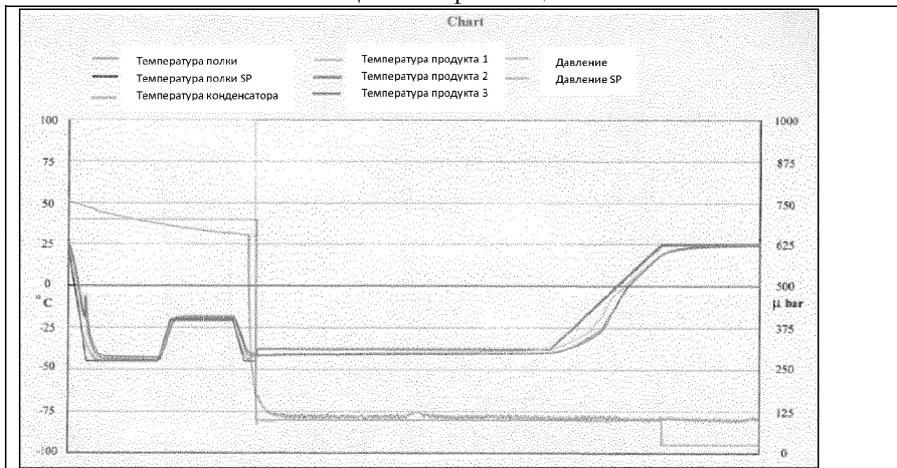
Фиг. 10

Титр DEN 4 CCID₅₀/мл (лиофилизированный)



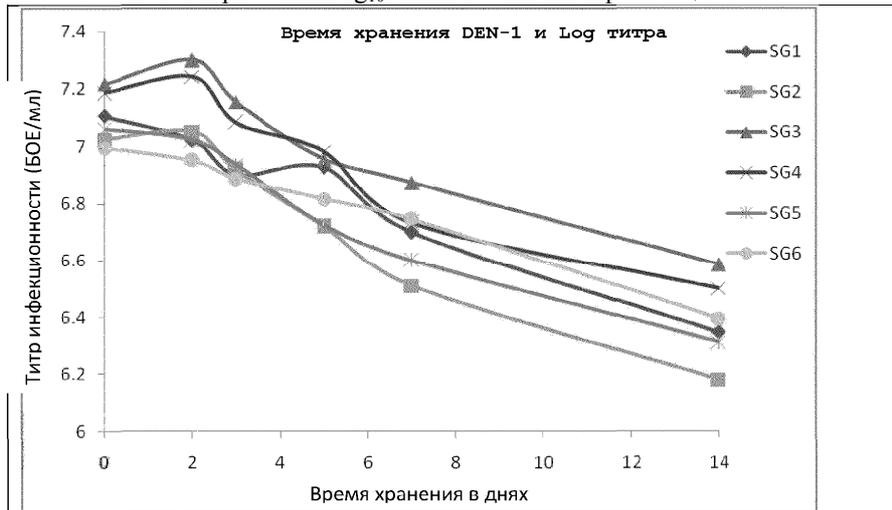
Фиг. 11

Цикл лиофилизации

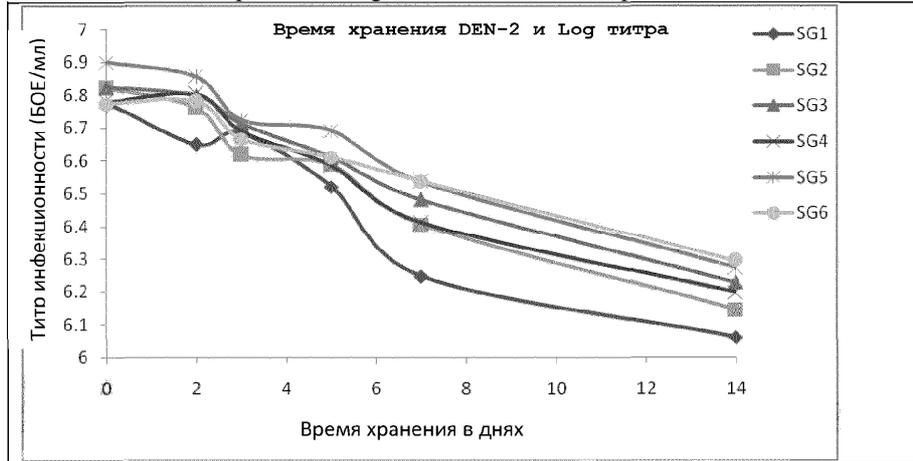


Фиг. 12

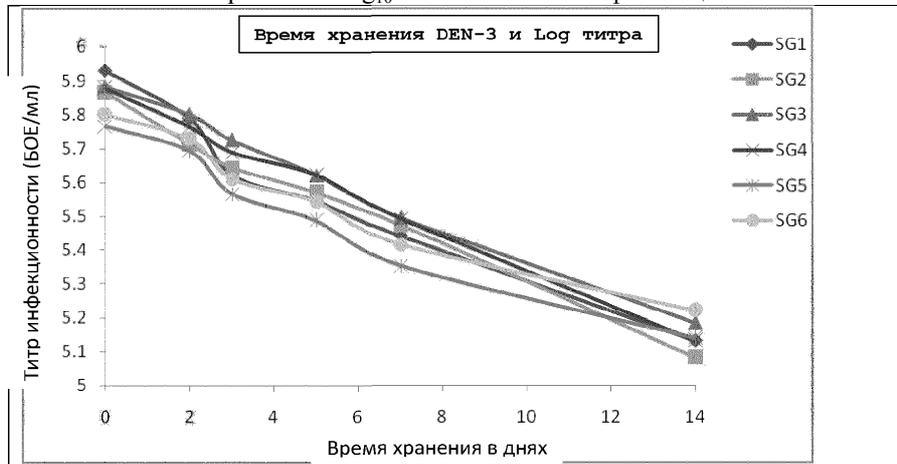
Титр DEN 1 Log₁₀ БОЕ/мл после лиофилизации



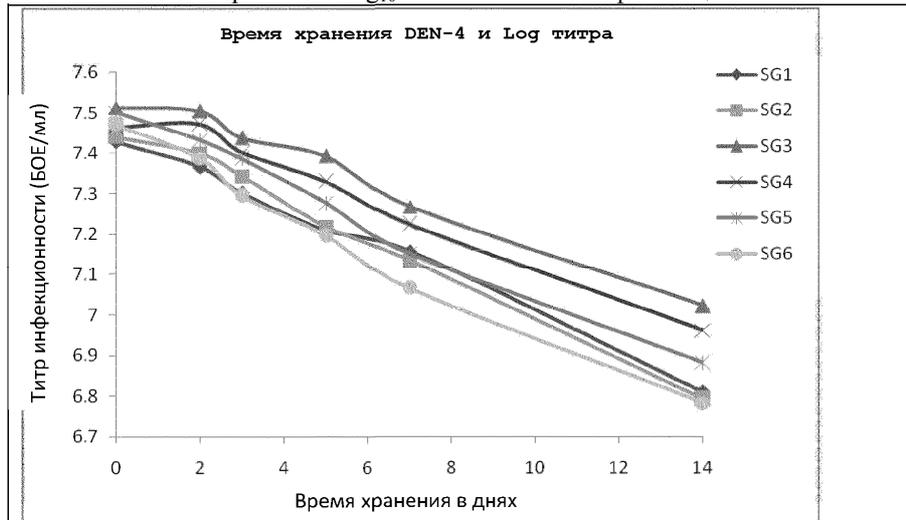
Фиг. 13

Титр DEN-2 Log₁₀ БОЕ/мл после лиофилизации

Фиг. 14

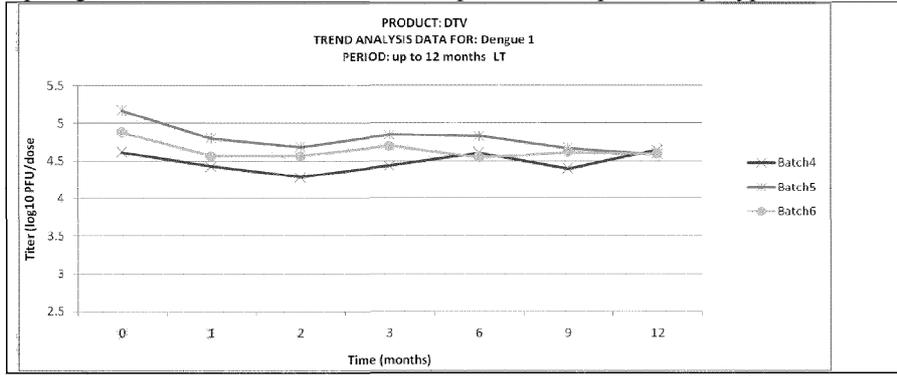
Титр DEN-3 Log₁₀ БОЕ/мл после лиофилизации

Фиг. 15

Титр DEN-4 Log₁₀ БОЕ/мл после лиофилизации

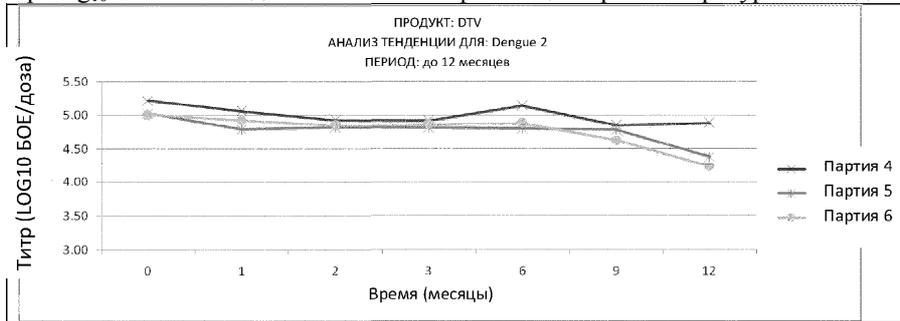
Фиг. 16

DEN-1 титр Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-8°C до 12 месяцев



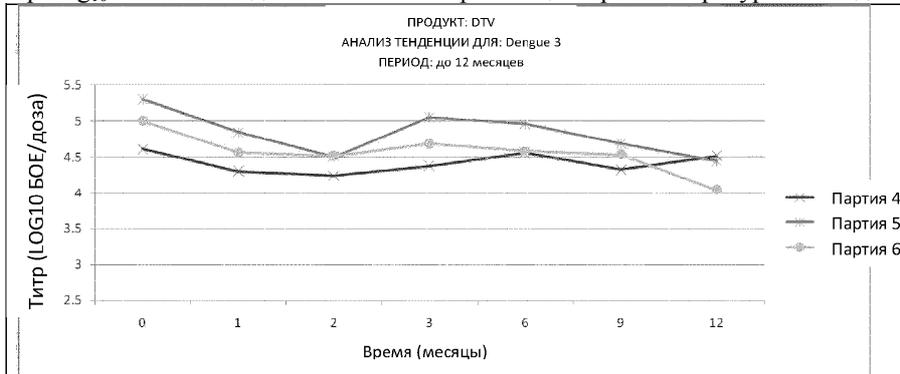
Фиг. 17А

DEN-2 титр Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-8°C до 12 месяцев



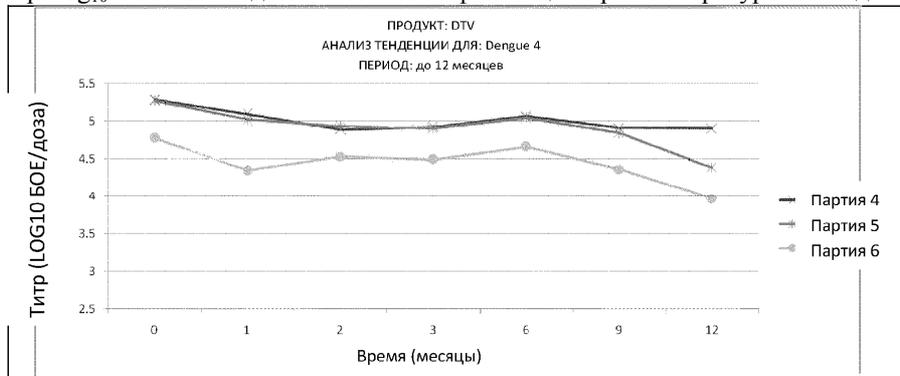
Фиг. 17В

DEN-3 титр Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-8°C до 12 месяцев



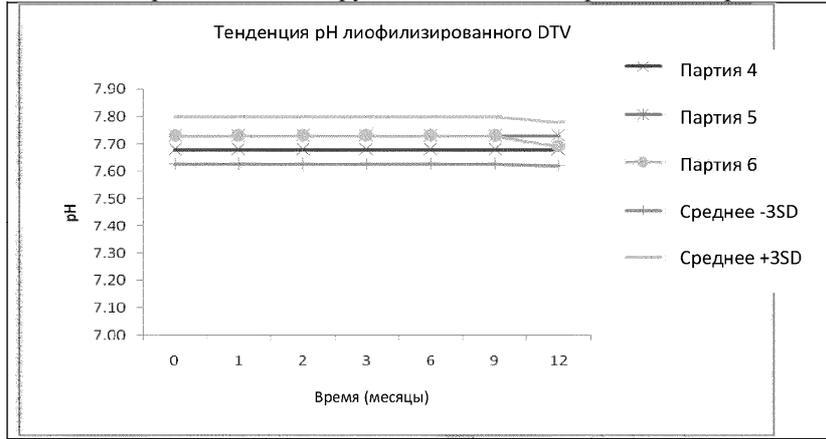
Фиг. 17С

DEN-4 титр Log_{10} БОЕ/0.5 мл данные после лиофилизации при температуре 2-8°C до 12 месяцев



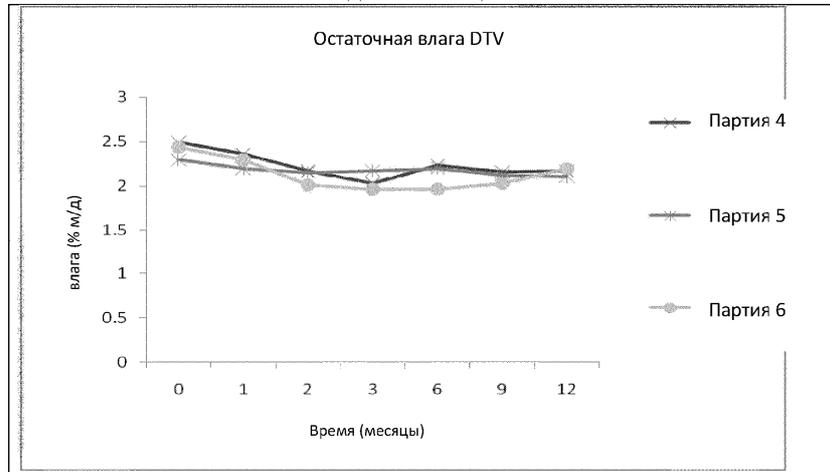
Фиг. 17D

Данные о pH вакцины тетравалентного вируса денге после лиофилизации при 2-8°C до 12 месяцев



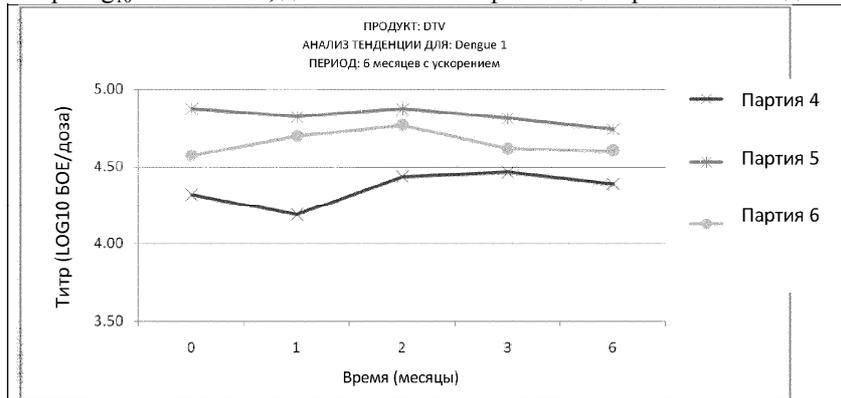
Фиг. 18

Данные об остаточной влажности вакцины тетравалентного вируса денге после лиофилизации при 2-8°C до 12 месяцев



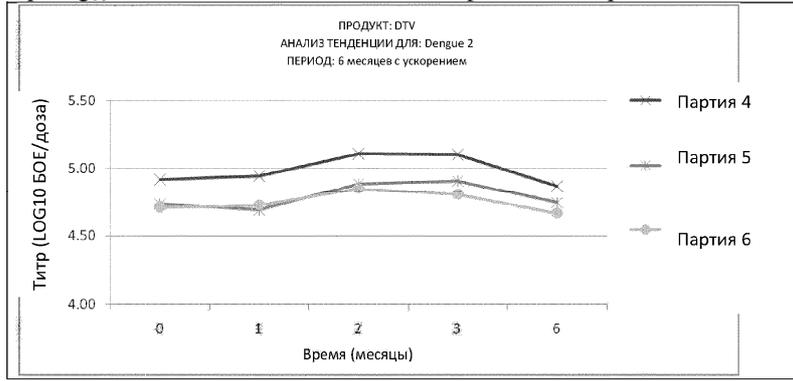
Фиг. 19

DEN-1 титр Log₁₀ БОЕ/0.5 мл, данные после лиофилизации при 25°C±2°C до 6 месяцев



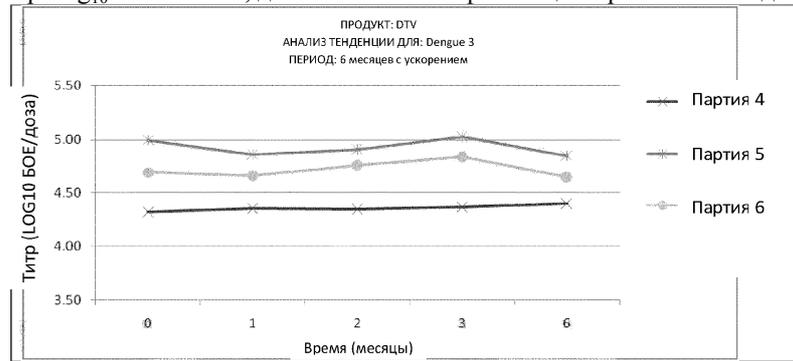
Фиг. 20А

DEN-2 титр Log₁₀ БОЕ/0.5 мл, данные после лиофилизации при 25°C±2°C до 6 месяцев



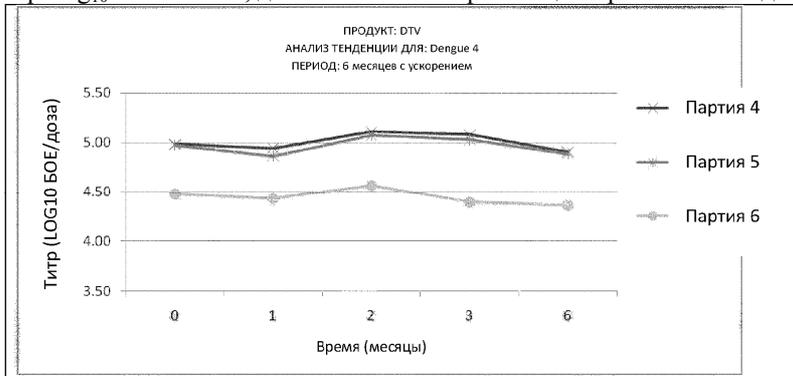
Фиг. 20В

DEN-3 титр Log₁₀ БОЕ/0.5 мл, данные после лиофилизации при 25°C±2°C до 6 месяцев



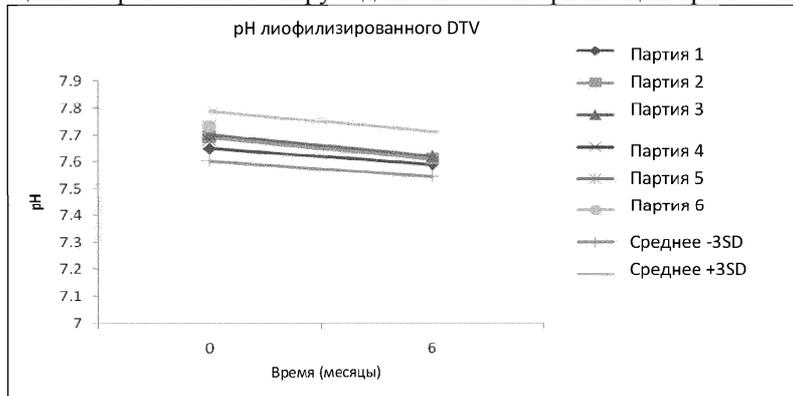
Фиг. 20С

DEN-4 титр Log₁₀ БОЕ/0.5 мл, данные после лиофилизации при 25°C±2°C до 6 месяцев



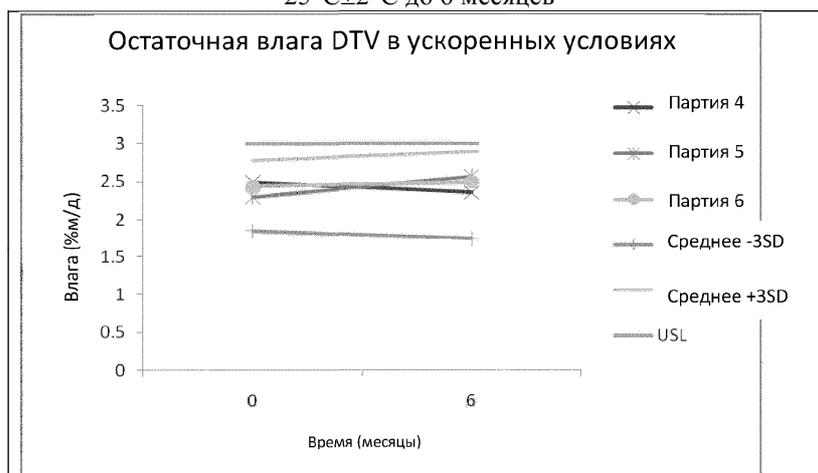
Фиг. 20D

Данные о pH вакцины тетравалентного вируса денге после лиофилизации при 25°C±2°C до 6 месяцев



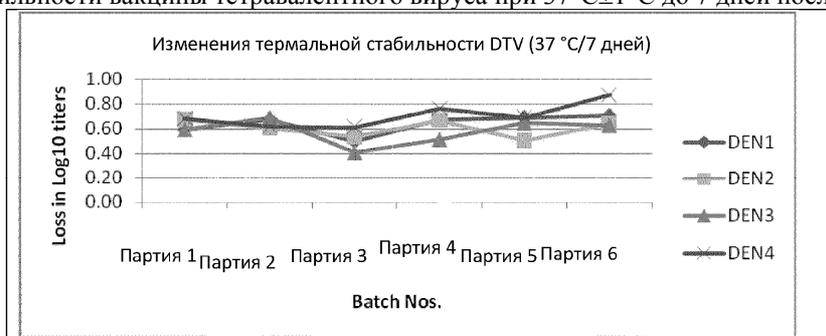
Фиг. 21

Данные об остаточной влажности вакцины тетравалентного вируса денге после лиофилизации при $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ до 6 месяцев



Фиг. 22

Данные о стабильности вакцины тетравалентного вируса при $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ до 7 дней после лиофилизации



Фиг. 23

Данные о стабильности вакцины тетравалентного вируса при $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ до 7 дней после лиофилизации



Фиг. 24

