



(51) МПК

A61K 39/145 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/145 (2018.05)

R U 2 6 6 1 4 0 8 C 2

(21)(22) Заявка: 2015129077, 17.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.12.2013Дата регистрации:  
16.07.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
17.12.2012 EP 12197522.1

(43) Дата публикации заявки: 23.01.2017 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 16.07.2018 Бюл. № 20

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 17.07.2015(86) Заявка РСТ:  
EP 2013/077007 (17.12.2013)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/095944 (26.06.2014)Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

АРВИДССОН Ханс (SE),  
МАЛЬТАИС Анна-Карин (SE)(73) Патентообладатель(и):  
ЮРОСАЙН ВЭКСИНЗ АБ (SE)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2012042003 A1, 05.04.2012. RU  
2323742 C1, 10.05.2008. HANA HAKIM et al.  
Immunogenicity and safety of inactivated  
monovalent 2009 H1N1 influenza A vaccine in  
immunocompromised children and young  
adults//VaccineVolume 30, Issue 5, 20 January  
2012, Pages 879-885 реферат он лайн найдено  
12.12.2017 найдено из Интернет: (см. прод.)(54) ВАКЦИННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИЯХ СУБЪЕКТОВ С  
ОСЛАБЛЕННЫМ ИММУНИТЕТОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к лечению инфекционных болезней, и может быть использовано для вакцинации субъектов с ослабленным иммунитетом против гриппа. Применение по изобретению включает интраназальное введение вакцины, представляющей собой композицию, содержащую один или более неживых антигенов вируса гриппа, выбранных из группы, состоящей из антигена цельного инактивированного вируса,

расщепленного вируса, субединичного антигена вируса гриппа и рекомбинантных антигенов, и адьювант, содержащий одну или более карбоновых кислот, водную среду и один или более моноглицеридов. Использование изобретения позволяет снизить вирусовыделение и распространение вируса за счет снижения титра вируса и индукции высокого иммунного ответа. 14 з.п. ф-лы, 5 табл., 5 ил., 4 пр.

R U 2 6 6 1 4 0 8 C 2

R U 2 6 6 1 4 0 8 C 2

(56) (продолжение):  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X11019013>. PETERSSON P. et al. The Eurocine& α χιρχ ; L3 adjuvants with subunit influenza antigens induce protective immunity in mice after intranasal vaccination//Vaccine Volume 28, Issue 39, 7 September 2010, Pages 6491-6497 реферат он лайн найдено 12.12.2017, найдено из  
Интернет:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X10009540>.

RUSSIAN FEDERATION



(19)

**RU**

(11)

**2 661 408**

<sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.

*A61K 39/145* (2006.01)

*A61P 31/16* (2006.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/145* (2018.05)

(21)(22) Application: 2015129077, 17.12.2013

(24) Effective date for property rights:  
17.12.2013

Registration date:  
16.07.2018

Priority:

(30) Convention priority:  
17.12.2012 EP 12197522.1

(43) Application published: 23.01.2017 Bull. № 3

(45) Date of publication: 16.07.2018 Bull. № 20

(85) Commencement of national phase: 17.07.2015

(86) PCT application:  
EP 2013/077007 (17.12.2013)

(87) PCT publication:  
WO 2014/095944 (26.06.2014)

Mail address:  
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ARVIDSSON Khans (SE),  
MALTAIS Anna-Karin (SE)

(73) Proprietor(s):

YUROSAJN VEKSINZ AB (SE)

R  
U  
2  
6  
6  
1  
4  
0  
8  
C  
2  
C  
0  
8  
4  
1  
4  
2  
6  
6  
1  
2  
R  
U

**R**  
**U**

**2**  
**6**  
**6**  
**1**  
**4**  
**0**  
**8**

**C**  
**2**

**(54) VACCINE COMPOSITION FOR USE IN IMMUNO-COMPROMISED POPULATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the treatment of infectious diseases, and can be used to vaccinate immuno-compromised subjects against influenza. Use of the invention includes the intranasal administration of a vaccine comprising a composition comprising one or more non-living influenza virus antigens selected from the group consisting of an antigen of a whole inactivated virus, a split virus, a subunit antigen of the

influenza virus and recombinant antigens, and an adjuvant comprising one or more carboxylic acids, an aqueous medium and one or more monoglycerides.

EFFECT: use of the invention makes it possible to reduce the release and the spread of the virus by decreasing the virus titer and inducing a high immune response.

15 cl, 5 tbl, 5 dwg, 4 ex

**Область техники, к которой относится изобретение**

Изобретение относится к вводимым интраназально вакцинным композициям, эффективным против инфекции в популяциях субъектов с ослабленным иммунитетом.

**Уровень техники**

5 Противогриппозные вакцины, широко используемые в настоящее время, основаны на живом вирусе или инактивированном вирусе, и инактивированные вирусные вакцины могут быть основаны на цельном вирусе, «расщепленном» вирусе, субъединичных белках или на очищенных поверхностных антигенах (включая гемагглютинин и нейраминидазу).

10 Все больше признается социально-экономическое влияние гриппа и его медицинская нагрузка у субъектов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, субъекты с ослабленным иммунитетом, например, пожилые люди в возрасте  $\geq 65$  лет имеют больший риск для госпитализации и летального исхода от сезонного гриппа по сравнению с другими возрастными группами. Кроме того, субъекты с ослабленным иммунитетом имеют 15 высокий уровень атак гриппа во время эпидемий. К сожалению, субъекты с ослабленным иммунитетом плохо отвечают на противогриппозную вакцинацию. Было установлено, что данные субъекты отвечают на вакцинацию продукцией антител в более низких титрах на гемагглютинин вируса гриппа по сравнению с более молодыми взрослыми субъектами.

20 В последние три десятилетия число субъектов с ослабленным иммунитетом постоянно растет в результате значительного повышения выживаемости при некоторых злокачественных заболеваниях за счет высокой эффективности и сложности химиотерапевтических схем, за счет количества субъектов, подвергающихся лечебной и спасающей жизнь трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и 25 трансплантации солидных органов с последующей иммуносупрессивной терапией, существенного снижения заболеваемости и смертности и улучшенного качества жизни у субъектов, зараженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

30 Признается, что индивидуумы с субоптимальной иммунной функцией в результате заболевания или терапии имеют повышенный риск проявления осложнений, связанных с гриппом. Проблемы с гриппом в популяциях субъектов с ослабленным иммунитетом включают слабый ответ на вакцинацию и более высокий риск развития осложненной инфекции с повышенной смертностью, более интенсивным и продолжительным вирусовыделением с вовлечением контроля распространения вируса и возможными побочными эффектами от вакцинации.

35 Субъекты с ослабленным иммунитетом включают в дополнении к субъектам в возрасте  $\geq 65$  лет, беременных женщин, пациентов, получающих химиотерапию, пациентов, находящихся на иммуносупрессивных препаратах, таких как пациенты после трансплантации органов, ВИЧ-инфицированных субъектов. Неограничивающий перечень субъектов, которых следует рассматривать в качестве субъектов с ослабленным 40 иммунитетом, представлен в таблице 1.

Таблица 1	
Субъекты с ослабленным иммунитетом включают следующих субъектов	
Субъекты в возрасте $\geq 65$ лет	
Беременные женщины	
Больные раком	
Субъекты, получающие химиотерапию	
Субъекты, подвергающиеся лучевой терапии	
Субъекты, подвергающиеся аллогенной гемопоэтических трансплантации стволовых клеток	
Субъекты, подвергающиеся аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	

Субъекты, подвергающиеся трансплантации солидных органов
Субъекты с синдромом трансплантат-против-хозяина
ВИЧ-инфицированные субъекты

Субъекты, получающие иммуносупрессивные препараты, например, глюкокортикоидную терапию
Субъекты с хроническими заболеваниями, например, заболеванием почек в терминальной стадии, диабетом, циррозом

Результаты исследований показали, что обычные вакцины для парентерального введения обладали пониженной способностью индуцировать удовлетворительный защитный иммунитет у субъектов с ослабленным иммунитетом по сравнению с популяцией субъектов с нормальной иммунной функцией. Следовательно, даже «умеренные» пандемии гриппа, такие как пандемия гриппа A(H1N1), приводят к высокой смертности среди пожилых субъектов и субъектов с ослабленным иммунитетом.

Беременность является состоянием, характеризующимся ослабленным иммунитетом; иммунная система не функционирует с полноценной активностью. По этой причине для иммунной системы организма при беременности требуется большее время для того, чтобы справиться с вирусом гриппа, и, следовательно, грипп имеет тенденцию протекать тяжелее. Фактически в прошлом веке беременные женщины были непропорционально поражены заболеванием в тяжелой форме при всех пандемиях гриппа. Например, во время пандемии гриппа в 1918 г. у половины всех беременных женщин, заболевших гриппом, была пневмония. Из них у половины пневмония закончилась летальным исходом, что привело к очень высокой и трагической смертности на уровне 25% среди беременных женщин, которые заболели гриппом. Во время пандемии в 1957 г. среди женщин репродуктивного возраста половина всех зарегистрированных летальных случаев имела место именно у беременных женщин.

Во время межпандемических периодов вирусы гриппа, которые циркулируют, связаны с вирусами, оставшимися после предшествующих эпидемий. Вирусы распространяются среди людей, имеющих различный уровень иммунитета, который развился в результате инфекций, имевших место в жизни ранее. Такая циркуляция, явление, известное как антигенный дрейф, в течение периода времени, составляющего обычно 2-3 года, способствует селекции новых штаммов, которые изменяются в достаточной степени, чтобы вновь вызвать эпидемию среди всего населения. Варианты дрейфа могут оказывать различное воздействие в различных сообществах, регионах, странах или континентах в одном и том же году, хотя в течение нескольких лет их общее воздействие часто является одинаковым. Обычные эпидемии гриппа вызывают повышение случаев пневмонии и заболеваний нижних дыхательных путей, о чем свидетельствуют повышенные уровни госпитализации и смертности. Субъекты с ослабленным иммунитетом, особенно пожилые люди или субъекты, страдающие основными хроническими заболеваниями, наиболее подвержены таким осложнениям, но и у младенцев грипп также может протекать в тяжелой форме. В этом смысле маленьких детей также можно рассматривать в качестве субъектов с ослабленным иммунитетом, поскольку их иммунная система не развилась полностью и не отвечает также хорошо, как иммунная система взрослых людей. Младенцы в первые три месяца жизни являются чувствительными к инфекциям, которые не являются обычными для более взрослых субъектов (таким как *Streptococcus agalactiae*), и в первые несколько месяцев жизни младенцы защищены только материнскими антителами. Младенцы не отвечают на некоторые вакцины аналогично тому, как реагируют на них взрослые субъекты, и не способны продуцировать эффективные антитела на полисахаридные антигены примерно до 5-летнего возраста. С возрастом у ребенка иммунная система созревает и развивается, но полностью не напоминает таковую у взрослого человека до полового созревания,

когда половые гормоны могут быть ответственны за полное созревание иммунной системы ребенка.

В результате процесса, известного как «антигенный дрейф», с непредсказуемыми интервалами появляются новые вирусы гриппа и они способны вызывать пандемии.

- 5 Антигенный дрейф представляет процесс, с помощью которого два или более различных штаммов вируса комбинируются с формированием нового субтипа, имеющего смесь поверхностных антигенов двух или более исходных штаммов. Антигенный сдвиг представляет конкретный случай реассортимента или вирусного сдвига, который приводит к фенотипическому изменению. Таким образом, пандемия гриппа происходит,
- 10 когда появляется новый вирус гриппа, против которого в человеческой популяции отсутствует ранее возникший иммунитет.

Антигенный сдвиг отличается от антигенного дрейфа, который представляет природную мутацию в течение времени известных штаммов гриппа, которая может привести к потере иммунитета или несогласованию с вакциной. Антигенный дрейф

- 15 имеет место при всех типах гриппа, включая вирус гриппа А, вирус гриппа В и вирус гриппа С. Однако антигенный сдвиг характерен только для вируса гриппа А, поскольку он заражает не только людей.

Во время пандемий противовирусные препараты не будут достаточными или эффективными в достаточной степени, чтобы покрыть потребности и обеспечить

- 20 количество субъектов, имеющих риск развития гриппа с угрожающим жизни течением. Разработка подходящих вакцин является важной для достижения защитного уровня антител у иммунологически незащищенных субъектов.

Данные проблемы можно решить адьювантированием и/или оптимальной доставкой вакцин, целью которых является повышение иммуногенности вакцины для того, чтобы

- 25 можно было снизить содержание антигена и таким образом увеличить количество доступных доз вакцины. Применение адьюванта также может помочь праймировать иммунную систему против антигена в популяции субъектов без ранее существовавшего иммунитета к конкретному штамму гриппа. Адьювант также может повысить доставку вакцины и тем самым снизить количество антигена, необходимого для индукции
- 30 иммунного ответа. Доставка вакцины и/или путь вакцинации могут иметь большое значение. Большинство противогриппозных вакцин вводятся парентерально и, следовательно, в основном могут индуцировать иммунитет против гриппа в крови. Однако вирусы гриппа поступают в организм человека через нос или рот, т.е. через слизистые оболочки. Посредством введения вакцины против гриппа в нос можно
- 35 индуцировать специфический для гриппа иммунитет одновременно на слизистой и в крови. Это может иметь преимущество, когда целью является индукция защитного иммунитета против гриппа, особенно у индивидуумов с отсутствием ранее возникшего иммунитета к вакцинному штамму гриппа или к любому гриппу.

Существует потребность в новых инактивированных вакцинах, таких как вакцины

- 40 на основе цельного инактивированного вируса или фрагмента инактивированного вируса, способных индуцировать защитный иммунитет против гриппа у субъектов с отсутствием ранее возникшего иммунитета на антиген вакцины. Субъекты без достаточного ранее возникшего иммунитета к гриппу и/или с ослабленным иммунным статусом включают субъектов с ослабленным иммунитетом, маленьких детей и большие
- 45 группы населения по всему миру (или все население) в случае пандемий. Настоящее изобретение, в частности, относится к субъектам с ослабленным иммунитетом, например, пожилым людям. Данная группа особенно нуждается в безопасной, инактивированной вакцине, которая может индуцировать иммунологический ответ против вируса гриппа.

Также требуются новые вакцины, которые можно было использовать в качестве предпандемической вакцины, для праймирования иммунологически незащищенной популяции против пандемического штамма до или при объявлении пандемии. Настоящее изобретение относится, в частности, к вакцине для субъектов с ослабленным

5 иммунитетом и примечательно которую можно легко вводить за счет того, что она формулирована для интраназального введения и содержит инактивированные антигены, полученные из патогенов, например, вируса или фрагментов вируса, для применения которой не требуется медицинский обученный персонал. Композиции вакцинных антигенов с сильными адьювантами позволяют повысить иммунный ответ.

10 **Сущность изобретения**

Целью изобретения является обеспечение вакцин, которые способны индуцировать иммунный ответ и обеспечить защитный иммунитет против сезонных и пандемических штаммов вируса гриппа и других патогенных микроорганизмов у субъектов с ослабленным иммунитетом. Один аспект изобретения относится к применению вакцины

15 по изобретению в педиатрии, включая вакцину, эффективную у детей против сезонных штаммов вируса гриппа. Дополнительный аспект изобретения направлен к субъектам всех возрастных групп, когда композиция предназначена для применения во время пандемии гриппа.

Первый аспект изобретения относится к композиции, содержащей:

20 (i) один или более инактивированных антигенов и  
(ii) адьювант, содержащий:  
одну или более карбоновых кислот,  
водную среду и  
необязательно один или более моноглицеридов,

25 для применения в качестве вводимой интраназально вакцины, где указанная вакцина предназначена для иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом.

Композиция формулирована для применения в качестве противогриппозной вакцины для интраназального введения. Изобретение разработано для применения в качестве вакцины для интраназальной иммунизации против гриппа субъектов с ослабленным 30 иммунитетом.

Второй аспект изобретения относится к композиции, содержащей:

один или более инактивированных антигенов вируса гриппа и  
адьювант, содержащий:  
одну или более карбоновых кислот,  
водную среду и  
необязательно один или более моноглицеридов,  
для применения в качестве вводимой интраназально вакцины субъектам с 35 ослабленным иммунитетом.

Третий аспект изобретения относится к композиции, содержащей:

40 (i) один или более антигенов *Streptococcus pneumoniae* и  
(ii) адьювант, содержащий:  
одну или более карбоновых кислот,  
водную среду и  
необязательно один или более моноглицеридов,  
для применения в качестве вводимой интраназально вакцины для применения 45 субъектам с ослабленным иммунитетом для профилактики инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, или для снижения тяжести симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызванной *Streptococcus pneumoniae*.

Четвертый аспект изобретения относится к способу иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом интраназальным введением композиции, содержащей:

(i) один или более инактивированных антигенов вируса гриппа и

(ii) адьювант, содержащий:

одну или более карбоновых кислот,

водную среду и

необязательно один или более моноглицеридов.

#### **Краткое описание чертежей**

Фигура 1: нарастание титров антител в HI против H1N1 A/Ned/602/09(A). Хорьков

группы 1, 3-6 интраназально инокулировали каплями для носа на сутки 0, 21 и 42, и хорькам группы 2 вакцину вводили подкожно на сутки 21 и 42. Титры антител в HI определяли в сыворотке крови, отобранный до иммунизации на сутки 0, 21 и 42 и после последней иммунизации на сутки 64 и 70. Группа 1 (контроль, интраназально физиологический раствор), группа 2 (подкожно TIV), группа 3 (интраназально

расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 5 мкг НА), группа 4 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА), группа 5 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 30 мкг НА) и группа 6 (интраназально инактивированный антиген

цельного вируса, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА). Линии представляют геометрическое среднее по 6 животным в группе с 95% доверительным интервалом (GMT±CI95).

Фигура 2: титры в HI против биологически отдаленных вирусов.

Хорьков группы 1, 3-6 интраназально инокулировали каплями для носа на сутки 0,

21 и 42, и хорькам группы 2 вакцину вводили подкожно на сутки 21 и 42. Титры антител в HI определяли в сыворотке крови, отобранный до иммунизации на сутки 0, 21 и 42 и после последней иммунизации на сутки 64 и 70. Группа 1 (контроль, интраназально физиологический раствор), группа 2 (подкожно TIV), группа 3 (интраназально

расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 5 мкг НА), группа 4 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА), группа 5 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 30 мкг НА) и группа 6 (интраназально инактивированный антиген

цельного вируса, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА). Линии представляют геометрическое среднее по 6 животным в группе с 95% доверительным интервалом (GMT±CI95). Для расчета GMT значение ≤5 заменяли на абсолютное значение 5. А: титры антител против H1N1 A/Swine/Ned/25/80. В: титры антител против H1N1 A/Swine/Italy/14432/76. С: титры антител против H1N1 A/New Jersey/08/76.

Фигура 3: нарастание титров антител в VN против H1N1 A/Ned/602/09.

Хорьков группы 1, 3-6 интраназально инокулировали каплями для носа на сутки 0, 21 и 42, и хорькам группы 2 вакцину вводили подкожно на сутки 21 и 42. Титры антител в VN определяли в сыворотке крови, отобранный до иммунизации на сутки 0, 21 и 42 и после последней иммунизации на сутки 64 и 70. Группа 1 (контроль, интраназально физиологический раствор), группа 2 (подкожно TIV), группа 3 (интраназально

расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 5 мкг НА), группа 4 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА), группа 5 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный

Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 30 мкг НА) и группа 6 (интраназально инактивированный антиген цельного вируса, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА). Линии представляют геометрическое среднее по 6 животным в группе с 95% доверительным интервалом (GMT±CI95).

Фигура 4: сравнение вакцины (Immunose<sup>TM</sup> FLU, содержащей 15 мкг НА расщепленного антигена вируса гриппа с 20 мг/мл (2%) Endocine<sup>TM</sup>) по настоящему изобретению с другими адьювантыми вакциными продуктами, FluMist (живая 10 аттенуированная вакцина) и инъекционные вакцины, на иммунологически незащищенных хорьках.

Фигура 5а: показано ответное нарастание титра IgG1, специфического для вируса гриппа, в течение времени у старых мышей, иммунизированных Immunose<sup>TM</sup> Flu (кружки), у старых мышей, иммунизированных без адьюванта (прямоугольники), у 15 старых мышей, получавших интраназально физиологический раствор (знак плюс) и у молодых мышей, получавших Immunose<sup>TM</sup> Flu (треугольники).

Фигура 5б: показано ответное нарастание титра IgG2a, специфического для вируса гриппа, в течение времени у старых мышей, иммунизированных Immunose<sup>TM</sup> Flu (кружки), у старых мышей, иммунизированных без адьюванта (прямоугольники), у 20 старых мышей, получавших интраназально физиологический раствор (знак плюс) и у молодых мышей, получавших Immunose<sup>TM</sup> Flu (треугольники).

Фигура 5с: показано ответное нарастание титра IgA, специфического для вируса гриппа, в течение времени у старых мышей, иммунизированных Immunose<sup>TM</sup> Flu (кружки), у старых мышей, иммунизированных без адьюванта (прямоугольники), у 25 старых мышей, получавших интраназально физиологический раствор (знак плюс) и у молодых мышей, получавших Immunose<sup>TM</sup> Flu (треугольники).

Таблица 5: эффективность формулированных в Endocine<sup>TM</sup> вакцин против вируса гриппа 2009 H1N1 на хорьках по данным клинических, вирусологических показателей 30 и результатов макроскопического патологического обследования: группа 1 (контроль, интраназально физиологический раствор), группа 2 (подкожно TIV), группа 3 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 5 мкг НА), группа 4 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, 35 в дозе 15 мкг НА), группа 5 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 30 мкг НА) и группа 6 (интраназально инактивированный антиген цельного вируса, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА).

Клинические баллы. Выживаемость, число животных, которые выжили до 4 суток 40 после иммунизации; лихорадка (°C), максимальное повышение температуры в виде среднего значения со стандартным отклонением, число животных, у которых наблюдали лихорадку, в круглых скобках, (\*), температуру тела 1 животного в группе 4 было невозможно определить за счет неисправности регистратора; потеря массы тела в % в период между 0 и 4 сутками после иммунизации представлена в виде среднего значения 45 со стандартным отклонением, число животных с потерей массы тела в круглых скобках.

Вирусология. Вирусовыделение в мазках материала из носовой полости и горла, площадь под кривой (AUC) для результатов по титрации на 1-4 сутки после иммунизации, количество животных, имеющих 1 или более мазков, положительных на наличие вируса,

в круглых скобках; вирусная нагрузка в легких и носовых раковинах ( $\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{г}$ ) на 4 сутки после иммунизации в виде среднего значения со стандартным отклонением или нижний предел детектирования в случае, когда все животные в группе дали отрицательный результат на присутствие вируса, количество животных с вирусом в 5 легких и носовых раковинах в круглых скобках.

Макроскопическое патологическое обследование. % установленной пораженной паренхимы легких при визуальном осмотре во время некропсии на 4 сутки после иммунизации в виде среднего значения со стандартным отклонением, количество животных с пораженными легкими в круглых скобках; весовое соотношение масса 10 легких/масса тела ( $\times 10^2$ ) на 4 сутки после иммунизации представлено в виде среднего значения со стандартным отклонением.

Таблица 6: полукаличественная оценка гистопатологических показателей на 4 сутки после иммунизации.

15 а<sup>a</sup>: группа 1 (контроль, интраназально физиологический раствор), группа 2 (подкожно TIV), группа 3 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 5 мкг НА), группа 4 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА), группа 5 (интраназально расщепленный антиген, 20 адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 30 мкг НА) и группа 6 (интраназально инактивированный антиген цельного вируса, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, в дозе 15 мкг НА).

Гистопатология. Полукаличественная оценка гистопатологических показателей на 4 сутки после иммунизации. Степень альвеолита/повреждения альвеол, баллы: 0, 0%; 25 1, 25%; 2, 25-50%; 3, >50%; тяжесть альвеолита, баллы: без наличия воспалительных клеток (0); несколько воспалительных клеток (1); умеренное количество воспалительных клеток (2); много воспалительных клеток (3); при наличии альвеолярного отека, альвеолярных геморрагий и пневмоцитарной гиперплазии типа II стекла оценивали как положительные (нет=0, да=1); все результаты по гистопатологии представлены в виде 30 среднего значения со стандартным отклонением.

#### Подробное описание изобретения

При описании вариантов осуществления изобретения в целях достижения ясности будет иметь место обращение к специальной терминологии. Однако изобретение не ограничивается специальными терминами, выбранными таким образом, и очевидно, 35 понятно, что каждый специальный термин включает все технические эквиваленты, которые функционируют аналогично для выполнения аналогичной цели.

Термин «субъект с ослабленным иммунитетом» означает субъектов в возрасте  $\geq 65$  лет и беременных женщин. Термин также охватывает людей всех возрастных групп с нарушенной иммунной системой в результате генетического дефекта, индуцированной 40 патогеном супрессии иммунной системы или индуцированной лекарственным препаратом супрессии иммунной системы.

Следовательно, пациенты с ослабленным иммунитетом включают, не ограничиваясь этим, следующие группы пациентов: больных раком, субъектов, получающих химиотерапию, субъектов, подвергающихся лучевой терапии, пациентов с 45 трансплантированными органами, субъектов, подвергающихся трансплантации солидных органов, пациентов с трансплантированными стволовыми клетками, субъектов, подвергающихся аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, субъектов, подвергающихся аутологичной трансплантации гемопоэтических

стволовых клеток, ВИЧ-инфицированных пациентов, субъектов со СПИДом, пациентов с синдромом трансплантат-против-хозяина, пациентов, находящихся на иммуносупрессивных препаратах, например, получающих глюкокортикоидную или стероидную терапию, субъектов с хроническими заболеваниями, например, с болезнью почек в терминальной стадии, диабетом, циррозом.

Термин «период, близкий к пандемии» относится к периоду времени около пандемии. Такие пандемии представляют периоды времени, официально объявленные ВОЗ, изобретение относится к периоду времени непосредственно перед официальным объявлением пандемии и сразу же после пандемии, во время которых рекомендуется проводить вакцинацию.

Один или более инактивированных антигенов вируса гриппа в композиции по изобретению может представлять один или более штаммов вируса гриппа А, В и/или С. Вакцинная композиция, которая способна праймировать иммунный ответ и обеспечивать защитный иммунитет против пандемических штаммов вируса гриппа обычно содержит антигены только из одного штамма вируса гриппа А (моновалентная вакцина), в то время, как вакцинная композиция, которая способна праймировать иммунный ответ и обеспечивать защитный иммунитет против сезонных штаммов вируса гриппа, обычно содержит антигены из трех или более различных штаммов (трехвалентная или четырехвалентная вакцина). Наиболее часто из двух штаммов вируса гриппа А и одного или более штаммов вируса гриппа В.

Изобретение также относится к способу иммунизации до или во время периода эпидемий или пандемий, включающему интраназальное введение вакцинной композиции, включающей композицию по изобретению, а также к способу иммунизации субъектов в педиатрии, включающему интраназальное введение вакцинной композиции, включающей композицию по изобретению, и также относится к способу иммунизации иммунологически незащищенных субъектов, включающему интраназальное введение вакцинной композиции, включающей композицию по изобретению.

Изобретение относится к иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом, например, пожилых людей, в качестве такой популяции, которая заражается, когда она подвергается обычным вакцинным стратегиям. С возрастом у людей в иммунной системе происходят многочисленные изменения. Хорошо установлено, что с возрастом иммунная система начинает терять некоторые свои функции и становится неспособной отвечать так же быстро или так же эффективно на стимулы, как это обычно имеет место у взрослых людей с нормальной иммунной функцией. Изменения, которые происходят с возрастом, ассоциированы с существенными клиническими проявлениями, такими как более высокая частота случаев инфекционных заболеваний (например, пневмонии и гриппа). С возрастом происходят изменения гуморального и клеточного иммунного ответа, во многом снижение иммунной реактивности, которое имеет место в популяции пожилых людей, ассоциировано с изменениями Т-клеточного ответа. Потеря эффективной иммунной активности в основном является результатом изменений в Т-клеточном компартменте, что происходит, частично, в результате инволюции тимуса. С возрастом люди становятся субъектами с ослабленным иммунитетом в результате иммуностарения. Иммуностарение является термином, используемым для описания снижения иммунных функций у пожилых людей в возрасте  $\geq 65$  лет. Следовательно, растущий возраст ассоциирован с повышенной чувствительностью к инфекциям и слабым ответом на вакцинацию. По этим причинам существует потребность в более эффективных вакцинах для популяции пожилых людей, таких как вакцины по настоящему изобретению.

Популяции субъектов с ослабленным иммунитетом имеют ослабленную иммунную систему. Человек может стать субъектом с ослабленным иммунитетом в результате естественных причин, таких как беременность и возраст, или в результате болезни или терапевтического лечения. В дополнении к иммуностарению, ассоцииированному с возрастом, субъекты могут стать субъектами с ослабленным иммунитетом в результате заболеваний, оказывающих отрицательное влияние на иммунную систему, а также терапевтического лечения. Субъекты с хроническими вирусными заболеваниями, такими как вызванные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который непосредственно направлен на CD4 Т-клетки иммунной системы, в течение всей жизни находятся на противовирусных и иммуносупрессивных препаратах для поддержания низкого уровня вируса, что, в свою очередь, приводит к ослаблению иммунной системы. Другие хронические вирусные инфекции, такие как вызванные вирусом гепатита В (HBV) и вирусом гепатита С (HCV), для которых требуется длительное лечение, также связаны с состоянием ослабленной иммунной функции, которое приводит к повышенной чувствительности к бактериальным, грибковым или другим вирусным патогенам. Пациенты после трансплантации органов являются еще одной группой пациентов, которые классифицируются в качестве субъектов с ослабленным иммунитетом, поскольку они находятся на иммуносупрессивных препаратах для предупреждения отторжения трансплантированного органа их иммунной системой. Кроме того, некоторые виды противоопухолевой терапии также могут привести к развитию состояния ослабленной иммунной функции, поскольку лечение в дополнении к индукции гибели и предупреждению роста злокачественной опухоли оказывает выраженное отрицательное влияние на иммунную систему.

Общей проблемой для индивидуумов с ослабленным иммунитетом является то, что

они не отвечают в достаточной степени на парентеральные вакцины и, следовательно, они нуждаются в новых подходах для повышения степени эффективности вакцин в данной популяции субъектов. Настоящее изобретение предлагает такой новый подход.

Существует потребность в безопасных и эффективных вакцинах против сезонного гриппа и других оппортунистических инфекций, подходящих для взрослых и детей с ослабленными состояниями и пожилых людей в возрасте  $\geq 65$  лет, а также беременных женщин. Субъекты с ослабленным иммунитетом восприимчивы к тяжелым инфекциям или инфекциям с осложнениями, например, в результате гриппа. Например, в США установлено, что ежегодное среднее число 225000 госпитализаций и 36000 летальных исходов относится к сезонному гриппу.

Живые аттенуированные вирусные вакцины ассоциированы с проблемами безопасности. Вакцина Flumist<sup>®</sup>/Fluenz не была официально разрешена, за счет проблем с безопасностью, для применения у маленьких детей младше 2 лет, пожилых людей или других субъектов с ослабленным иммунитетом. Парадоксально, но именно это субъекты с ослабленным иммунитетом, которые входят в группу с особенно высоким риском заражения гриппом. Вакцина Flumist<sup>®</sup> разрешена для применения у более старших детей, но она является живой аттенуированной вирусной вакциной. Кроме того, вакцина Fluenz должна использоваться у людей, которые являются гиперчувствительными (обладают аллергией) к активным веществам или любому из других ингредиентов вакцины, к гентамицину или к яйцам или яичным белкам. Она также не должна использоваться для людей с ослабленным иммунитетом за счет состояний, таких как заболевания крови, симптоматическая ВИЧ-инфекция и рак, или в результате некоторых видов лечения. Вакцину также не следует применять у детей, которые получают лечение

салицилатами (например, обезболивающими препаратами, такими как аспирин).

С удивлением было обнаружено, что интраназальное введение адьювантных неживых противогриппозных вакцин индуцировало очень высокие иммунные ответы и последующую полную защиту от гриппа у хорьков без предварительно существовавшего иммунитета к антигену вакцины. Вакцины на основе цельного и расщепленного инактивированного антигена приводили к более высоким результатам по сравнению с инъекционной промышленно доступной противогриппозной вакциной Fluarix®.

Показано в примере 1.

В композиции по изобретению не используется живой аттенуированный вирус, а используются инактивированные антигены вируса гриппа. Кроме того, ее можно вводить интраназально. Интраназальное введение композиции по изобретению позволяет широко ее использовать и вводить без специального обучения, например, в период, близкий к пандемии, и во время пандемии - самоведением. Применение инактивированных антигенов вируса гриппа позволяет использовать их для вакцинации маленьких детей без проблем с безопасностью, которые свойственны живым аттенуированным вирусным вакцинам. Заявители настоящего изобретения разработали вакцину, эффективную у субъектов с ослабленным иммунитетом, которую можно вводить интраназально, тем самым обеспечив вышеуказанные преимущества и удовлетворив важные потребности для восприимчивых популяций и групп пациентов.

В первом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей:

(i) один или более инактивированных антигенов и

(ii) адьювант, содержащий:

одну или более карбоновых кислот,

водную среду и

необязательно один или более моноглицеридов,

для применения в качестве вводимой интраназально вакцины, где указанная вакцина предназначена для иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом.

Композиция по изобретению подходит для применения в качестве противогриппозной вакцины для интраназального введения. Композиция по изобретению направлена на применение в качестве вакцины для интраназальной иммунизации против гриппа субъектов с ослабленным иммунитетом. В одном варианте осуществления композиция предназначена для применения в качестве вакцины для иммунизации пожилых людей в возрасте  $\geq 65$  лет. В одном варианте осуществления композиция предназначена для иммунизации беременных женщин.

Вирусы гриппа включают три типа А, В и С. Вирусы гриппа А заражают широкий ряд хозяев, птиц и млекопитающих, включая людей, лошадей, свиней, хорьков и цыплят. Вирус гриппа В заражает людей, хорьков и тюленей, и вирус гриппа С заражает людей, собак и свиней. Животные, зараженные гриппом А, часто функционируют в качестве резервуара вируса гриппа, создавая пулы генетически и антигенно различающихся вирусов, которые передаются в человеческую популяцию. Передача может происходить через тесный контакт между людьми и зараженными животными, например, при уходе за домашним скотом. Передача от человека человеку может иметь место через тесный контакт или при ингаляции капель, образовавшихся при кашле или чихании.

Внешняя поверхность вирусных частиц гриппа А состоит из липидной оболочки, которая содержит гликопroteины гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA).

Гликопротеин HA состоит из двух субединиц, названных HA1 и HA2. HA содержит сайт связывания сиаловой кислоты, который связывается с сиаловой кислотой, находящейся на внешней оболочке эпителиальных клеток верхних и нижних

дыхательных путей, и проникает в клетки посредством эндоцитоза, опосредованного рецептором. После входления в клетку вирусные частицы гриппа высвобождают свой геном, который поступает в ядро и инициирует продукцию новых вирусных частиц гриппа. Также продуцируется NA, которая расщепляет сиаловую кислоту на поверхности 5 клетки для предупреждения захвата высвобожденных вирусных частиц гриппа. Вирус имеет короткий инкубационный период, в типичном случае примерно пять суток, хотя инкубационный период может варьировать в широких пределах. Вирус начинает выделяться примерно за один день до начала заболевания, и, как правило, выделение продолжается в течение трех-пяти суток. Типичные симптомы включают жар,

10 утомляемость, недомогание, головную боль, ломоту и боли в мышцах и суставах, кашель и боль в горле. Некоторые симптомы могут продолжаться в течение нескольких недель после заражения.

Различные штаммы вируса гриппа характеризуются в основном мутациями в гликопroteинах НА и НА, и поэтому НА и НА используются для идентификации 15 субтипов вируса (т.е. H5N1 указывает на субтип 5 по НА и субтип 1 по НА). При этом противогриппозные вакцины часто направлены на молекулы НА и НА. В обычных противогриппозных вирусных вакцинах часто используются цельные инактивированные вирусы, которые содержат соответствующие молекулы НА и/или НА. Альтернативно 20 в качестве вакцин могут использоваться рекомбинантные формы белков НА и НА или их субъединицы. Антигены в вакцинальных композициях могут представлять инактивированные антигены, например, такие как цельные инактивированные вирусы, расщепленные антигены, субъединичные антигены, рекомбинантные антигены или пептиды. Термин «антиген» или «иммуноген» определяется, как вещество, которое может служить в качестве мишени для иммунного ответа. Также термин включает 25 белковые антигены, компоненты рекомбинантных белков, вирусоподобные частицы (VLP), а также генно-инженерные РНК или ДНК, которые - когда поступают в клетки организма - то «внутренний аппарат» клеток-хозяев «читает» ДНК и использует ее для синтеза белков патогена. Поскольку данные белки распознаются в качестве чужеродных, то когда они процессируются клетками-хозяевами и располагаются на их поверхности, 30 то иммунная система «предупреждается об опасности», и затем запускает ряд иммунных ответов. Термин также включает вещество, которое имитирует инактивированные бактерии или вирусы или их фрагменты. Иммунный ответ может быть клеточным или гуморальным, и детектироваться в системных и/или мукозальных компартментах.

Однако вирус гриппа является РНК-содержащим вирусом и поэтому подвержен

35 частым мутациям, приводящим к устойчивым и постоянным изменениям антигенного состава вируса. Антигенный состав относится к участкам полипептида, которые распознаются иммунной системой, таким как антителосвязывающие эпитопы. Небольшие, минорные изменения антигенного состава часто относят к антигенному дрейфу. Вирусы гриппа А также способны к «обмену» генетического материала из 40 других субтипов в процессе, называемом реассортиментом, приводя к большим изменениям в антигennом составе, который называется антигенным сдвигом. Поскольку иммунный ответ на вирусные частицы базируется на связывании антител с гликопротеинами НА и НА, то частые изменения гликопротеинов снижают эффективность приобретенного иммунного ответа против вирусов гриппа во времени, 45 в конечном итоге приводя к потере иммунитета. Способность вируса гриппа А подвергаться быстрому антигенному сдвигу часто запускает эпидемии гриппа за счет отсутствия ранее существовавшего иммунитета на новый штамм.

Вакцинация для профилактики гриппа является особенно важной для людей, которые

имеют повышенный риск развития тяжелых осложнений в результате гриппа или имеют более высокий риск связанных с гриппом амбулаторных визитов к врачу, ED и госпитализаций. Центр контроля заболеваний (CDC) рекомендует, чтобы в ситуациях ограниченной поставки вакцин мероприятия по вакцинации должны быть сосредоточены

5 на вакцинации субъектов, имеющих риск развития тяжелых осложнений в результате гриппа. Субъекты с повышенным риском могут включать, не ограничиваясь этим,

всех детей в возрасте от 6 до 59 месяцев;

всех субъектов в возрасте  $\geq 50$  лет;

взрослых и детей, страдающих хроническим заболеванием легких (включая

10 бронхиальную астму) или сердечно-сосудистым заболеванием (за исключением изолированной гипертензии), заболеванием почек, печени, неврологическим заболеванием, заболеванием крови или метаболическими расстройствами (включая сахарный диабет);

15 субъектов с иммуносупрессией (включая иммуносупрессию, вызванную лечением или ВИЧ-инфекцией);

женщин, которые беременны или могут забеременеть во время сезона гриппа;

дети или подростки (в возрасте от 6 месяцев до 18 лет), которые получают длительное лечение аспирином и могут иметь риск развития синдрома Рея после инфекции, вызванной вирусом гриппа;

20 лица, постоянно проживающие в интернатах и других учреждениях по длительному уходу.

Признаками штамма вируса гриппа, которые дают потенциальную возможность вызвать вспышку пандемии, являются следующие: вирусный штамм содержит новый гемагглютинин по сравнению с гемагглютинином в циркулирующих в последнее время

25 штаммах, которые могут или не могут сопровождаться изменением субтипа нейраминидазы; вирусный штамм способен передаваться горизонтально в человеческой популяции, и он является патогенным для людей. Новый гемагглютинин может быть гемагглютинином, который отсутствовал в человеческой популяции в течение продолжительного периода времени, возможно, в течение нескольких десятилетий,

30 например, такой как H2. Или он может представлять гемагглютинин, который не циркулировал в человеческой популяции ранее, например, H5, H9, H7 или H6, которые обнаружены у птиц. В каждом случае большинство, или по меньшей мере большая часть или даже вся популяция, ранее не сталкивалась с антигеном и является иммунологически незащищенной от него.

35 Вакцина по изобретению, в частности, направлена на применение для субъектов с ослабленным иммунитетом, например, пожилых людей в возрасте  $\geq 65$  лет. Изобретение также направлено на применение для субъектов, страдающих заболеванием или подвергающихся лечению, которые индуцируют у субъектов ослабленный иммунитет. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для

40 применения у пациентов, больных раком. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у беременных женщин. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у людей, получающих химиотерапию. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у людей, получающих лучевую терапию.

45 В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у пациентов с трансплантированными органами. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у людей, подвергающихся трансплантации солидных органов. В одном варианте осуществления

композиция по изобретению предназначена для применения у пациентов с трансплантированными стволовыми клетками. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у субъектов, подвергающихся аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В 5 одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у субъектов, подвергающихся аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у ВИЧ-зараженных пациентов. В одном 10 варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у субъектов, больных СПИДом. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у пациентов, страдающих синдромом трансплантат-против-хозяина. В одном варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у пациентов, получающих иммуносупрессивные препараты, например, глюкокортикоидную терапию. В одном 15 варианте осуществления композиция по изобретению предназначена для применения у пациентов, получающих стероидную терапию. Кроме того, композиция предназначена для применения в качестве вакцины для субъектов с ослабленным иммунитетом всех возрастных групп во время пандемии или периодов, близких к пандемии. В одном варианте осуществления изобретение предназначено для применения у субъектов с 20 ослабленным иммунитетом в педиатрии.

Следовательно, композиция, в частности, направлена на применение у субъектов с ослабленным иммунитетом в педиатрии во время пандемии. Субъектами с ослабленным иммунитетом в педиатрии могут быть дети в возрасте до 18 лет, например, дети в возрасте от 0 до 18 лет, в частности, дети до 12 лет или младше. Как правило, дети 25 находятся в возрасте до 8 лет, например, в возрасте 6 лет или младше. Важной группой пациентов, предназначенной для применения вакцины по изобретению, в частности, являются дети с ослабленным иммунитетом в возрасте от 2 месяцев до младше 9 лет, обычно дети с ослабленным иммунитетом в возрасте от 3 месяцев до младше 9 лет, например, в возрасте от 6 месяцев до младше 8 лет, наиболее типично в возрасте от 6 30 месяцев до младше 7 лет, например, в возрасте от 6 месяцев до младше 72 месяцев, или в возрасте от 6 месяцев до 60 месяцев или в возрасте от 6 месяцев до 24 месяцев. Композиция по изобретению предназначена, по меньшей мере частично, для применения в качестве вакцины в педиатрии у субъектов с ослабленным иммунитетом.

Субъекты с ослабленным иммунитетом могут представлять субъектов всех 35 возрастных групп, когда композиция, в частности, относится к вакцине для применения во время пандемий или периода около пандемий.

ИнTRANАЗАЛЬНОЕ введение предназначается для обозначения введения в носовую полость любым способом введения, таким как распыление вакцины в носовую полость или введение вакцины с помощью пипетки закапыванием вакцины в носовую полость 40 или нанесением на слизистую носовой полости.

Композиция преимущественно содержит один или более инактивированных антигенов вируса гриппа, а не живой аттенуированный вирус. Как указывалось, это позволяет избежать проблем с безопасностью при выборе группы пациентов, а также проблем в отношении производства, распределения и отпуска. Инактивированный антиген вируса 45 гриппа можно выбрать из группы, состоящей из цельного инактивированного вируса, расщепленного вируса, субединичного антигена вируса гриппа и рекомбинантных антигенов. Применение рекомбинантных белков может осуществляться для повышения титра нейтрализующих антител, продуцированных в ответ на иммунизацию вирусом.

Гликозилирование НА играет важную роль в способности иммунного ответа вызывать ответную выработку антител и способности вируса «избегать» воздействия иммунной системы. Следовательно, можно получить рекомбинантные белки НА, содержащие гетерогенные гликаны комплексного типа, а также рекомбинантные белки, которые 5 моногликозилированы или не гликозилированы, с повышенной иммуногенностью.

Предпочтительно инактивированный антиген вируса гриппа представляет собой расщепленный антиген или субъединичный антиген вируса гриппа, более 10 предпочтительно расщепленный антиген.

Геном вируса гриппа А содержит 11 генов в 8 фрагментах РНК, кодирующих 11

белков: гемагглютинин (НА), нейраминидазу (NA), нуклеопротеин (NP), M1, M2, NS1, NS2 (NEP: ядерный экспортный белок), PA, PB1 (основная полимераза 1), PB1-F2 и PB. Инактивированные антигены вируса гриппа могут быть выбраны из любого одного 15 белка или комбинации белков, происходящих из вируса.

Композиция по изобретению может содержать любой инактивированный вирус

гриппа. Как должно быть понятно специалисту в данной области, вирус гриппа 20 варьирует от сезона к сезону и также изменяется в зависимости от географического региона и популяций, которые он заражает. Настоящее изобретение относится к вакцинам, содержащим адьювант по изобретению и инактивированные антигены вируса гриппа из одного или более вирусов гриппа. Инактивированный антиген вируса гриппа, 25 используемый в вакцинной композиции по изобретению, будет представлять любой антигенный материал, полученный из инактивированного вируса гриппа. Например, он может содержать инактивированные цельные вирусные частицы. Альтернативно он может содержать разрушенный вирус (расщепленный вирус), где остается, например, иммуногеный белок, например, белок ионных каналов M2 или гликопротеины. В 30 качестве антигенного материала в вакцинных композициях могут использоваться очищенные препараты мембранных гликопротеинов, гемагглютинин (НА) и/или нейраминидаза (NA) вируса гриппа. Вакцинная композиция по изобретению может содержать один или более типов антигенных материалов. Тип вируса гриппа, используемый для приготовления вакцинной композиции, конечно, будет зависеть от гриппа, против которого реципиент вакцины должен быть защищен.

Например, инактивированный антиген вируса гриппа включает один или более антигенов, например, генетического остова одного или более следующих вирусов гриппа: вируса A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60), B/Ann Arbor/1/66, FluMist MDV-A (са A/ 35 Ann Arbor/6/60), FluMist MDV-B (са B/Ann Arbor/1/66), остова штамма-донора A/Leningrad/17 и PR8.

В других конкретных примерах вакцинные композиции по изобретению содержат инактивированный антиген вируса гриппа, например, полипептидную последовательность НА или NA (или, по меньшей мере, последовательность на 90% идентичную или, по меньшей мере, на 95% идентичную этим последовательностям) из 40 одного или более следующих вирусов: A/New Caledonia; A/Sydney; A/Panama; B/Johannesburg; B/Victoria; B/Hong Kong; A/Shandong/9/93; A/Johannesburg/33/94; A/Wuhan/395/95; A/Sydney/05/97; A/Panama/2007/99; A/Wyoming/03/2003; A/Texas/36/91; A/Shenzhen/227/95; A/Beijing/262/95; A/New Caledonia/20/99; B/Ann Arbor/1/94; B/Yamanashi/166/98; B\_Johannesburg.sub.--5.sub.--99; BVictoria/504/2000; B/Hong Kong/330/01; B\_Brisbane.sub.-45 32.sub.--2002; B/Jilin/20/03; вирус гриппа А H1N1, вирус гриппа А H3N2, вирус гриппа А H9N2, вирус гриппа А H5N1, вирус гриппа А H7N9, вирус гриппа В, и штамм пандемии гриппа (объявленный ВОЗ или не циркулирующий в человеческой популяции).

В одном варианте осуществления штамм вируса гриппа может представлять один

или более штаммов, ранее рекомендованных ВОЗ для применения в противогриппозной вакцине.

Адьювант в композиции по изобретению является критическим для интраназального введения и для проявления ее эффективности. Подходящим адьювантом для

- 5 интраназального введения может быть адьювант, который необязательно содержит моноэфир глицерина и жирной кислоты, или он может представлять комбинацию жирных кислот. Карбоновые кислоты, используемые в таких адьювантах, включают длинноцепочечные (C4-C30) алкиловые, алкениловые или алкиниловые карбоновые кислоты, которые необязательно могут быть разветвленными или неразветвленными,
- 10 циклическими или ациклическими, необязательно содержащими одно, два или много мест ненасыщенности (двойная или тройная связь), которые могут быть необязательно любого типа.

Моноглицериды, используемые в таких адьювантах, могут представлять сложные эфиры карбоновых кислот и глицерина, где карбоновые кислоты могут представлять

- 15 длинноцепочечные (C4-C30) алкиловые, алкениловые или алкиниловые карбоновые кислоты, которые необязательно могут быть разветвленными или неразветвленными, циклическими или ациклическими, необязательно содержащими одно, два или много мест ненасыщенности (двойная или тройная связь), которые могут быть необязательно любого типа.

- 20 Концентрация моноглицерида в вакцинной композиции может находиться в пределах, например, от 1 до 50 мг/мл, например, примерно от 1 до примерно 25 мг/мл, примерно от 5 до примерно 15 мг/мл или примерно 10 мг/мл.

- Концентрация жирной кислоты в вакцинной композиции может находиться в пределах, например, от 0,5 до примерно 50 мг/мл, например, примерно от 1 до примерно 25 мг/мл, примерно от 1 до примерно 15 мг/мл, примерно от 1 до примерно 10 мг/мл, примерно от 2 до примерно 8 мг/мл или примерно 6-7 мг/мл. В одном варианте осуществления концентрация жирной кислоты в вакцинной композиции на молярной основе соответствует концентрации (на молярной основе) моноглицерида.

- Любая комбинация диапазонов концентрации, указанных выше, для моноглицерида и жирной кислоты находится в контексте настоящей заявки. Кроме того, самый широкий указанный диапазон включает предпочтительный диапазон, и затем диапазон сужается к наиболее предпочтительному диапазону.

- Заявители настоящего изобретения установили, что адьюванты, описанные выше и раскрытые в международной заявке WO 2012/042003 (которая в полном объеме включена в виде ссылки), являются особенно пригодными, когда вакцинация проводится интраназальным путем, например, введением на слизистую носовой полости. Заявители изобретения установили, что применение таких адьювантов при вакцинации интраназальным путем повышает иммунный ответ при вакцинации. Заявители установили, что применение таких адьювантов является безопасным и хорошо
- 40 переносится несколькими видами животных, включая людей.

- Следовательно, композиция может содержать моноглицериды, которые представляют глицериды, моноэтерифицированные карбоновыми кислотами, выбранными из группы, состоящей из лауриновой кислоты (C12), миристиновой кислоты (C14), пальмитиновой кислоты (C16), пальмитолеиновой кислоты (C16:1), олеиновой кислоты (C18:1), линолевой кислоты (C18:2), стеариновой кислоты, гексановой кислоты, каприловой кислоты, декановой кислоты (каприновой кислоты), арахиновой кислоты, бегениновой кислоты, лигноцериновой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеарионовой кислоты, эйказапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, гамма-линоленовой

кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, эруциновой кислоты, нервоновой кислоты.

В дополнительном варианте осуществления моноглицериды представляют глицериды, моноэтерифицированные карбоновыми кислотами, выбранными из группы, состоящей из пальмитолеиновой кислоты (C16:1), олеиновой кислоты (C18:1) и линолевой кислоты (C18:2).

Предпочтительно моноглицерид представляет глицерид, моноэтерифицированный олеиновой кислотой (глицерилолеат).

Адьювант предпочтительно содержит одну или более карбоновых кислот, выбранных

из группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, стеариновой кислоты, гексановой кислоты, каприловой кислоты, декановой кислоты (каприновой кислоты), арахиновой кислоты, бегениновой кислоты, лигноцериновой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеаридоновой кислоты, эйкозапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, гамма-линоленовой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, эруциновой кислоты, нервоновой кислоты. Предпочтительно одна или более карбоновых кислот выбраны из группы, состоящей из олеиновой кислоты и лауриновой кислоты.

В комбинации с подходящими вариантами осуществления адьювант включает

глицерилолеат, олеиновую кислоту и водную среду. Вакцинальная композиция по настоящему изобретению также может включать дополнительные фармацевтические эксципиенты. Такими фармацевтическими эксципиентами могут быть:

1. Агенты для контроля тоничности/осмолярности вакцины. Такие агенты представляют, например, физиологические соли, такие как хлорид натрия. Другими физиологическими солями являются хлорид калия, дигидрофосфат калия, динатрий фосфат, хлорид магния и т.д. Такой агент также может представлять другие ионные вещества, которые оказывают влияние на ионную силу и стабильность. Осмолярность вакцины можно довести до значения в пределах примерно от 200 до примерно 400 мОsm/кг, предпочтительно в пределах примерно от 240 до примерно 360 мОsm/кг или осмолярность может быть близка к физиологическому уровню, например, в физиологических пределах примерно от 290 до 310 мОsm/кг.

2. Агенты для доведения pH или забуферивания вакцинальной композиции. Обычно pH вакцинальной композиции находится в пределах примерно от 5 до примерно 8,5. Агенты, подходящие для доведения pH, или буферные вещества включают соляную кислоту, гидроксид натрия (для доведения pH), а также фосфатный буфер, Трис-буфер, цитратный буфер, ацетатный буфер, гистидиновый буфер и т.д. (для забуферивания вакцины).

3. Другие добавки, например, такие как поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, хелатообразующие агенты, антибактериальные препараты, инактиваторы вирусов, консерванты, красители, противовспенивающие агенты, стабилизаторы или поверхностно-активные агенты, или их комбинации.

Поверхностно-активный агент может быть гидрофильным, инертным и биосовместимым, например, таким как полоксамеры, такие как Pluronic F68 или Pluronic 127.

Антибактериальные агенты могут представлять, например, амфотерицин или любое его производное, хлортетрациклин, формальдегид или формалин, гентамицин, неомицин, полимиксин В или его производные, стрептомицин или их комбинации.

Антиоксиданты могут представлять, например, аскорбиновую кислоту или токоферол, или их комбинацию.

Инактиваторы вирусов могут представлять, например, формалин, бета-пропиолактон, УФ-облучение, нагревание или их комбинации.

Консервант может представлять, например, бензетония хлорид, ЭДТА, фенол, 2-феноксиэтанол или тримеросал, или их комбинацию. Было показано, что ЭДТА является 5 хелатообразующим агентом, антиоксидантом и стабилизатором.

Красители могут представлять, например, индикаторы (такие как феноловый красный) или бриллиантовый зеленый или их комбинацию.

Противовспенивающим агентом может быть полидиметилсилозон.

Поверхностно-активными веществами могут быть, например, анионогенные,

10 катионогенные или неионогенные или цвитерионные, такие как полиоксиэтилен и его производные, полисорбаты (такие как, например, полисорбат 20 или полисорбат 80), твин 80, полоксамеры (такие как Pluronic F68) или любые их комбинации.

Как правило, концентрация моноглицерида в вакцинной композиции находится в пределах примерно от 0,1 г до примерно 5,0 г на 100 мл, или в пределах примерно от 15 0,1 г до примерно 2,0 г на 100 мл, или примерно от 0,5 г до примерно 2,0 г на 100 мл, примерно от 0,5 г до примерно 2,0 г, например, примерно от 0,5 г до примерно 1,5 г на 100 мл вакцинной композиции.

Кроме того, концентрация одной или более карбоновых кислот находится в количестве в пределах примерно от 0,1 г до примерно 5,0 г на 100 мл, или в пределах 20 примерно от 0,1 г до примерно 2,0 г на 100 мл, или примерно 0,5 г до примерно 2,0 г, например, от 0,5 г до примерно 1,5 г на 100 мл вакцинной композиции.

Один или более моноглицеридов вместе с одной или более карбоновыми кислотами в вакцинной композиции могут находиться в количестве максимально 10% (масс./об.) или максимально 5% (масс./об.), или максимально 4 масс./об., или максимально 3 масс./25 об., или максимально 2% (масс./об.), или максимально 1% (масс./об.), или максимально 0,5% (масс./об.), или максимально 0,1% (масс./об.), или максимально 0,05% (масс./об.).

Адьювант может включать комбинацию липидов, выбранных из группы, состоящей изmonoолеина, олеиновой кислоты, лауриновой кислоты и соевого масла. В одном подходящем варианте осуществления адьювант включает олеиновую кислоту, 30 лауриновую кислоту в Трис-буфере. Соответственно данный вариант осуществления включает от 0,25 г до 0,75 г олеиновой кислоты, от 0,25 г до 0,75 г лауриновой кислоты в 7-15 мл Трис-буфера (рН 7-9). Конкретный пример включает от 0,4 г до 0,5 г олеиновой кислоты, от 0,3 г до 0,4 г лауриновой кислоты в 8-10 мл 0,1М Трис-буфера (рН 7-9). В дополнительном подходящем варианте осуществления адьювант включает олеиновую 35 кислоту и monoолеин в Трис-буфере. Соответственно данный вариант осуществления включает от 0,25 г до 0,75 г олеиновой кислоты, от 0,25 г до 0,75 г monoолеина в 7-15 мл Трис-буфера. Конкретный пример включает от 0,3 г до 0,4 г олеиновой кислоты, от 0,4 г до 0,5 г monoолеина в 8-10 мл 0,1М Трис-буфера (рН 7-9). Дополнительный вариант осуществления включает от 0,5 г до 0,25 г monoолеина, от 0,5 г до 0,25 г олеиновой 40 кислоты, от 0,25 г до 0,75 г соевого масла в 7-15 мл Трис-буфера (рН 7-9). Конкретный пример данного варианта осуществления включает от 0,1 г до 0,2 г monoолеина, от 0,8 г до 1,5 г олеиновой кислоты и от 0,5 г до 0,6 г соевого масла в 8-12 мл Трис-буфера (рН 7-9).

Три типа адьювантов успешно использовались в примерах, приведенных ниже: 45 пример адьюванта А содержит от 0,4 г до 0,5 г олеиновой кислоты, от 0,3 г до 0,4 г лауриновой кислоты в 8-10 мл 0,1М Трис-буфера (рН 7-9); пример адьюванта В содержит от 0,3 г до 0,4 г олеиновой кислоты, от 0,4 г до 0,5 г monoолеина в 8-10 мл 0,1М Трис-буфера (рН 7-9); и пример адьюванта С содержит от 0,1 г до 0,2 г monoолеина, от 0,8 г

до 1,5 г олеиновой кислоты и от 0,5 до 0,6 г соевого масла в 8-12 мл Трис-буфера (рН 7-9). Как правило, данные адъюванты готовят в концентрации (масс./об.) содержания липидов на уровне 2-12% (6 г-12 г на 100 мл), наиболее типично 3-10%, например, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% или 9%. Данные концентрации представляют концентрации самой 5 адъюванной смеси. Затем данный адъювант смешивают с композицией, содержащей антиген, в соотношении от 2:1 до 1:8, например, в соотношении 1:1, с обеспечением вакцинной композиции с содержанием липидов на уровне 4%, начав с адъюванта с содержанием липидов на уровне 8%. Как правило, содержание липидов в вакцинной 10 композиции по изобретению находится в пределах от 0,5% до 6% (масс./об.), как правило, от 1% до 6% (масс./об.), более типично от 1% до 4%.

Примером композиции В является композиция Endocine<sup>TM</sup>, содержащая эквимолярные количестваmonoолеата глицерина и олеиновой кислоты (от 0,3 г до 0,4 г олеиновой кислоты, от 0,4 г до 0,5 г monoолеина в 8-10 мл 0,1М Трис-буфера (рН 7-9)), и было установлено, что она является исключительно эффективной у иммунологически 15 незащищенных субъектов с отсутствием ранее существовавшего иммунитета на антиген. В более предпочтительном варианте осуществления данную композицию с содержанием липидов на уровне 8% разводят композициями, содержащими антиген, с обеспечением вакцинной композиции с содержанием липидов на уровне 1-4% (масс./об.).

Как указывалось выше, композиция является подходящей для применения в способе 20 иммунизации в период, близкий к пандемии, или во время пандемии, включающем интраназальное введение вакцинной композиции по изобретению. Способ иммунизации в период, близкий к пандемии, или во время пандемии, можно использовать для субъектов всех возрастов. Изобретение также относится к способу иммунизации 25 субъектов с ослабленным иммунитетом во время сезонных эпидемий, включающему интраназальное введение вакцинной композиции, как описано.

Как указывалось выше, изобретение относится к способу иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом, включающему интраназальное введение вакцинной 30 композиции.

В примерах ниже показана эффективность данной вакцинной композиции у иммунологически незащищенных от гриппа животных (хорьков) и животных с 35 ослабленным иммунитетом, таких как старые мыши.

Удивительно высокая эффективность в индукции иммунного ответа у иммунологически незащищенных субъектов дает основание предположить, что вакцина по изобретению способна индуцировать иммунный ответ у субъектов с ослабленным 40 иммунитетом в плане того, что они становятся способными отвечать на инфекционные вирусы, когда они еще не имеют сильную иммунозащиту. Субъекты с ослабленным иммунитетом будут иметь большую пользу от вакцинной композиции по изобретению. Следовательно, дополнительный аспект изобретения относится к адъювантированным 45 инактивированным антигенам против гриппа, вводимым интраназально пациентам с ослабленным иммунитетом, включая пациентов с иммunoстарением; ВИЧ-инфицированных пациентов; субъектов, принимающих иммуносупрессивные препараты, реципиентов недавно трансплантированных органов; недоношенных новорожденных и пациентов после хирургических операций. Данный аспект относится к композиции, содержащей:

- 45 (i) один или более инактивированных антигенов и
- (iii) адъювант, содержащий:
  - одну или более карбоновых кислот,
  - водную среду и

необязательно один или более моноглицеридов, для применения в качестве вводимой интраназально вакцины, где указанная вакцина предназначена для иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом.

Удивительным эффектом настоящего изобретения, как показано в примере 2, является

- 5 то, что композиция по настоящему изобретению способна снижать вирусвыделение. Субъекты с ослабленным иммунитетом выделяют больше вируса, чем здоровые взрослые с нормальной иммунной системой. Следовательно, субъекты с ослабленным иммунитетом способны передавать больше вируса людям, находящимся вблизости с ними, таким как персонал, ухаживающий за престарелыми и больными людьми, члены
- 10 семьи, лица, постоянно проживающие в домах-интернатах по уходу за престарелыми. Следовательно, настоящее изобретение может быть пригодно для лечения субъектов с ослабленным иммунитетом, таких как субъекты в возрасте  $\geq 65$  лет, беременные женщины, пациенты, больные раком, пациенты, получающие химиотерапию, ВИЧ-зараженные индивидуумы. Настоящее изобретение может быть пригодно для
- 15 профилактики распространения вируса субъектами с ослабленным иммунитетом, которые приведены в таблице 1. В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения у субъектов с ослабленным иммунитетом в возрасте  $\geq 65$  лет для снижения вирусвыделения. В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения
- 20 у беременных женщин для снижения вирусвыделения. В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения у ВИЧ-инфицированных субъектов для снижения вирусвыделения. В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения у субъектов, получающих иммуносупрессивные препараты, например,
- 25 глюкокортикоидную терапию, для снижения вирусвыделения. Кроме того, композиция по настоящему изобретению может быть особенно пригодна для контроля пандемии снижением вирусвыделения. В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения у субъектов с ослабленным иммунитетом для снижения вирусвыделения в пандемической зоне. В одном варианте
- 30 осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения у субъектов с ослабленным иммунитетом для снижения вирусвыделения в период, близкий к пандемии. В одном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению предназначена для применения у субъектов с ослабленным иммунитетом для снижения вирусвыделения в период, близкий к пандемии.

- 35 Способ иммунизации против гриппа пациентов с ослабленным иммунитетом интраназальным введением композиции, описанной выше, представляет интересный аспект с неожиданным результатом.

Ежегодно в США примерно 90% более чем 30000 летальных исходов в результате гриппа имеет место среди людей в возрасте 65 лет или старше, что свидетельствует о восприимчивости этой популяции. Существующие в настоящее время противогриппозные вакцины имеют низкий эффект у пожилых людей (17-53%) по сравнению с молодыми взрослыми людьми (70-90%). Повышенная восприимчивость к вирусной инфекции и низкая эффективность вакцинации среди пожилых людей является результатом иммunoстарения. Иммunoстарение является прогрессирующим, зависимым от возраста снижением функций иммунной системы, которое затрагивает врожденный и адаптивный иммунитет. Важной частью врожденной иммунной системы являются паттерн-распознающие рецепторы (PRR), которые распознают консервативные структуры широкого ряда патогенов. Группа PRR, известная как toll-подобные

рецепторы (TLR), вовлечена в распознавание вируса гриппа. Дендритные клетки (DC) образуют важный мостик между врожденной и адаптивной иммунной системой, экспрессируя TLR и захватывая антиген. Результаты нескольких исследований показали зависимые от возраста изменения в функции DC, например, пониженную способность захватывать антиген, пониженную экспрессию и функции TLR, нарушенную способность к миграции и пониженную активирующую способность Т-клеток.

Старение также сопровождается постепенным снижением количества «необученных» В-клеток и увеличением количества эффекторных В-клеток, что приводит к пониженному разнообразию и пониженной аффинности ответной выработки антител. Старение также оказывает большое влияние на Т-клеточный компартмент двух основных субпопуляций CD4 и CD8 Т-клеток. Наиболее драматическим изменением является инволюция тимуса, которая приводит к снижению количества «необученных» Т-клеток периферических органов у пожилых субъектов. Пониженная функция тимуса оказывает выраженное влияние на популяцию Т-клеток, приводя к пониженному разнообразию репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR). Снижение репертуара TCR ассоциировалось со слабым ответом на вакцинацию и слабым иммунитетом против вируса гриппа. Связанное с возрастом снижение способности иммунной системы индуцировать эффективный ответ на патогены является сложным явлением, вызванным многочисленными изменениями в клетках различных типов.

По этим причинам пожилые люди являются особенно восприимчивой популяцией, и, следовательно, имеется потребность в более эффективных вакцинах для данной группы пациентов, таких как настоящее изобретение, что показано в примере 4.

Как указано выше, интересный аспект изобретения относится к композиции, содержащей один или более инактивированных антигенов вируса гриппа, и

адьювант, содержащий:

одну или более карбоновых кислот,

водную среду и

необязательно один или более моноглицеридов

для применения в качестве вводимой интраназально вакцины субъектам с

ослабленным иммунитетом.

Как правило, композиция предназначена для применения в качестве вводимой интраназально вакцины субъектам с ослабленным иммунитетом против инфекционных патогенов, таких как вирус гриппа. Субъекты с ослабленным иммунитетом соответственно выбраны из группы, состоящей, не ограничиваясь ими, из субъектов в

возрасте  $\geq 65$  лет, беременных женщин, недоношенных младенцев и следующих групп пациентов: больных раком, субъектов, получающих химиотерапию, субъектов, подвергающихся лучевой терапии, пациентов с трансплантированными органами, субъектов, подвергающихся трансплантации солидных органов, пациентов с трансплантированными стволовыми клетками, субъектов, подвергающихся аллогенной

трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, субъектов, подвергающихся аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, ВИЧ-инфицированных пациентов, субъектов со СПИДом, пациентов с синдромом трансплантат-против-хозяина, пациентов, находящихся на иммуносупрессивных препаратах, например, получающих глюкокортикоидную и стероидную терапию.

Как указано выше, иммуностарение обычно обнаруживается у пожилых людей.

Следовательно, один интересный вариант осуществления изобретения относится к композиции для применения в качестве вводимой интраназально вакцины у пожилых субъектов, таких как субъекты в возрасте 55 лет или старше, как правило, 60 лет или

старше, наиболее типично 65 лет или старше, например, 75 лет или старше, например, 80 лет или старше, например, 85 лет или старше, например, 90 лет или старше, где указанная композиция описана в данном документе.

Дополнительный аспект изобретения относится к вакцине для применения у

5 иммунологически незащищенных субъектов, таких как субъекты в педиатрии, которые также представляют пациентов с ослабленным иммунитетом. Было показано, что адьювант по изобретению проявил эффективность у иммунологически незащищенных субъектов при гриппе. Это делает его пригодным для групп иммунологически незащищенных пациентов и пациентов с ослабленным иммунитетом в общем.

10 Следовательно, еще один аспект изобретения относится к композиции для применения в качестве вводимой интраназально вакцины для применения у пациентов с ослабленным иммунитетом в педиатрии, где указанная композиция содержит:

(i) один или более инактивированных антигенов и

(iv) адьювант, содержащий:

15 одну или более карбоновых кислот,

водную среду и

необязательно один или более моноглицеридов.

Вакцины подходящих типов для иммунизации иммунологически незащищенных субъектов и пациентов с ослабленным иммунитетом в педиатрии содержат, согласно

20 настоящему изобретению, антиген соответственно актуального патогена, предназначенный для иммунизации или обработке вакциной. Они включают, не ограничиваясь этим, иммуногены, полученные из вирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса гепатита В, гепатита А, гепатита С, гепатита D и E, вируса гепатита неA/неB, вирусов ветряной оспы и оспы, вируса полиомиелита, вируса кори, вируса

25 иммунодефицита человека (ВИЧ), энтеровирусов, ретровирусов, респираторного синцитиального вируса, ротавируса, вируса папилломы человека, вируса опоясывающего лишая, вируса желтой лихорадки, вируса SARS, вирусов животных, вируса герпеса, цитомегаловируса, вируса опоясывающего лишая, вируса Эпштейна-Барра, вирусов парагриппа, adenovirusов, вирусов Коксаки, пикорнавирусов, риновирусов, вируса

30 краснухи, паповируса и вируса эпидемического паротита. Некоторые неограничивающие примеры известных вирусных антигенов, иных чем антигены вируса гриппа, указанные выше, могут включать следующее: антигены, полученные из ВИЧ-1, такие как tat, nef, gpl20 или gpl[ $\beta$ ]O, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev или их фрагменты и/или их комбинации; антигены, полученные из вирусов герпеса человека, такие как gH, gL, gM,

35 gB, gC, gK, gE или gG или их фрагменты и/или их комбинации; или немедленный ранний белок, такой как ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 из HSV1 или HSV2; антигены, полученные из цитомегаловируса человека, в частности, цитомегаловируса человека, такие как gB и его производные; антигены, полученные из вируса Эпштейна-Барра, такие как gp350 или его производные; антигены, полученные из вируса опоясывающего лишая, такие

40 как gp I, 11, 111 и IE63; антигены, полученные из вируса гепатита, такие как антиген вируса гепатита В, вируса гепатита С или вируса гепатита Е (например, белок оболочки EI или E2, кор-белок, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b, p7 или фрагмент и/или их комбинация HCV); антигены, полученные из вируса папилломы человека (например, HPV6, 11, 16, 18, например, L1, L2, EI, E2, E3, E4, E5, E6, E7 или их фрагмент и/или их комбинации); антигены, полученные из других вирусных патогенов, таких как

45 респираторный синцитиальный вирус (например, белки F и G или их производные); антигены из вируса парагриппа, вируса кори, вируса эпидемического паратита, flaviviruses (например, вируса желтой лихорадки, вируса лихорадки Денге, вируса

клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита) или их фрагмент и/или комбинации.

Антигены могут представлять, например, цельные инактивированные антигены, например, такие как цельные инактивированные вирусы. Антиген также может быть фрагментом патогена, например, фрагментом инактивированного вируса. Антигенные компоненты, которые могут использоваться, представляют, не ограничиваясь этим, например, вирусные, микобактериальные или паразитарные антигены. Бактериальные патогены могут представлять, например, микобактерии, вызывающие туберкулез и проказу, пневмококки, аэробные грамотрицательные или грамположительные бациллы, микоплазмы, стафилококки, стрептококки, *Helicobacter pylori*, сальмонеллы и хламидии. Заболевания также могут представлять бактериальные инфекции, такие как инфекции, вызванные микобактериями, вызывающими туберкулез и проказу, пневмококки, аэробные грамотрицательные бациллы, микоплазмы, стафилококковые инфекции, стрептококковые инфекции, *Helicobacter pylori*, сальмонеллы и хламидии.

Предпочтительные типы вакцин для иммунизации пациентов с ослабленным иммунитетом могут быть выбраны из группы, состоящей из пневмококковой вакцины, вакцины против гепатита А-Е, менингококковой вакцины, вакцины против *Haemophilus influenza b* (Hib), вакцины против дифтерии.

Заболевания также могут представлять паразитарные болезни, такие как малярия, лейшманиоз, трипаносомоз, токсоплазмоз, шистосоматоз, филяриоз, или различные типы рака, например, такие как рак молочной железы, рак желудка, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, рак почек, рак головы и шеи, рак почек, злокачественная меланома, рак горла, рак яичников, рак шейки матки, рак предстательной железы.

Также заболевания могут представлять аллергии на клещи домашней пыли, пыльцу или другие аллергены окружающей среды, и аутоиммунные заболевания, например, такие как системная красная волчанка.

Антиген вакциинной композиции может представлять цельные инактивированные антигены, например, такие как цельные инактивированные вирусы, расщепленные инактивированные антигены или субъединичные инактивированные антигены. Способы инактивации хорошо известны в данной области, такие как инактивация нагреванием, инактивация облучением УФ-светом или инактивация формалином или обработка бета-пропиолактоном.

Композиция по изобретению предназначена для применения в качестве вакцин для иммунизации пациентов с ослабленным иммунитетом. Пациенты с ослабленным иммунитетом соответственно выбраны из группы, состоящей из субъектов с иммunoстарением; ВИЧ-зараженных субъектов; субъектов, принимающих иммunoупрессивные препараты, таких как недавние реципиенты трансплантированных органов; недоношенных младенцев и пациентов после хирургических операций. Как указано выше, иммunoстарение обычно обнаруживается у пожилых людей.

Следовательно, интересный вариант осуществления изобретения относится к композиции для применения в качестве вводимой интраназально вакцины пожилым людям, таким как субъекты в возрасте 55 лет или старше, как правило, 60 лет или старше, наиболее типично в возрасте 65 лет или старше, где указанная композиция описана в данном документе. Субъекты с ослабленным иммунитетом в педиатрии могут представлять детей в возрасте до 18 лет, например, детей в возрасте от 0 до 18 лет, в частности, детей в возрасте 12 лет и младше. В частности, изобретение предназначено для детей с ослабленным иммунитетом в возрасте младше 8 лет, например, в возрасте 6 лет или младше. Важной группой пациентов, предназначенных для применения вакцины,

являются, в частности, дети с ослабленным иммунитетом в возрасте от 2 месяцев до младше 9 лет, как правило, дети в возрасте от 3 месяцев до младше 9 лет, например, в возрасте от 6 месяцев до младше 8 лет, наиболее типично от 6 месяцев до младше 7 лет, например, от 6 месяцев до младше 72 месяцев, или в возрасте от 6 месяцев до 60 месяцев, 5 или в возрасте от 6 месяцев до 24 месяцев. Композиция по изобретению предназначена, по меньшей мере частично, в качестве вакцины для применения у субъектов с ослабленным иммунитетом в педиатрии.

Субъекты с ослабленным иммунитетом могут представлять субъектов всех возрастных групп, когда композиция, в частности, предназначена для вакцинации во 10 время пандемии или в период, близкий к пандемии.

Бактерии *Streptococcus pneumoniae* являются основной причиной заболеваемости и смертности во всем мире с установленным фактом, что каждый год 1,6 млн. людей умирает в результате инфекционного заболевания легких (IPD) (ВОЗ, 2002). IPD наиболее часто имеет место среди очень маленьких детей (младше 24 месяцев) и пожилых людей 15 (старше 65 лет); у пожилых людей имеется наиболее высокий уровень смертности в результате IPD. В настоящее время имеется четыре вакцины для профилактики инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*. Отсутствуют интраназальные вакцины против *Streptococcus pneumoniae*.

Один интересный вариант осуществления изобретения относится к интраназальной 20 альтернативной вакцине для профилактики инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, направленной, в частности, детям и другим иммунологически незащищенным субъектам и пожилым людям, поскольку известно, что данная последняя группа является группой с ослабленным иммунитетом. В композиции по изобретению не используются живые 25 аттенуированные бактерии, а используются инактивированные антигены *Streptococcus pneumoniae*. С удивлением было установлено, что эффективность вакцины по изобретению является результатом используемого адьюванта и удивительный результат был специфическим для иммунологически незащищенных субъектов. Аналогичные 30 результаты предполагаются также для субъектов с ослабленным иммунитетом.

Следовательно, дополнительный аспект изобретения относится к композиции, 35 содержащей:

- (i) один или более инактивированных антигенов *Streptococcus pneumoniae* и
- (ii) адьювант, содержащий:

одну или более карбоновых кислот,  
водную среду и  
35 необязательно один или более моноглицеридов  
для применения в качестве вводимой интраназально вакцины субъектам с  
ослабленным иммунитетом для профилактики инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, или для снижения тяжести симптомов, ассоциированных с инфекцией,  
вызванной *Streptococcus pneumoniae*.

Пациенты с ослабленным иммунитетом соответственно выбраны из группы, 40 состоящей из людей с иммуностарением; ВИЧ-зараженных субъектов; субъектов, принимающих иммуносупрессивные препараты, таких как недавние реципиенты трансплантированных органов; недоношенных младенцев и пациентов после хирургических операций. Как указано выше, иммуностарение обычно обнаруживается 45 у пожилых людей. Следовательно, один интересный вариант осуществления изобретения относится к композиции для применения в качестве вводимой интраназально вакцины пожилым людям, таким как субъекты в возрасте 55 лет или старше, обычно в возрасте 60 лет или старше, наиболее типично в возрасте 65 лет или старше, где указанная

композиция описана в данном документе.

Один важный вариант осуществления изобретения относится к вакцине против пневмококковой инфекции для профилактики и/или снижения симптомов болезненных состояний, выбранных из группы, состоящей из бронхита, пневмонии, септицемии, перикардита, менингита и перитонита.

Один вариант осуществления относится к применению пневмококковой вакцины, такой как вакцина на основе пневмококкового полисахарида (PPV), у субъектов с ослабленным иммунитетом, в частности, пожилых людей в возрасте старше 60 или 65 лет, и/или взрослых людей с ранее имевшей место в анамнезе пневмококковой инфекцией или взрослых с повышенным риском ее развития (например, анатомическая или функциональная аспления, состояние ослабленного иммунитета или заболевания сердца, печени, легких или почек, или реципиенты трансплантата органа, костного мозга или кохлеарного имплантата).

В дополнительном варианте осуществления композиция пневмококковой вакцины по изобретению используется у субъектов в возрасте от 4 недель до 6 лет (например, иммунологически незащищенных субъектов и субъектов с иммунной системой, которая не полностью развилась, т.е. субъектов «с ослабленным иммунитетом») и у пожилых людей, таких как субъекты в возрасте старше 50 лет, как правило, в возрасте 60 лет или старше, более типично в возрасте 65 лет или старше.

Вакцинная композиция по изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые экспципиенты, например, такие как среда, которая может представлять водную среду, дополнительно содержащую поверхностно-активное вещество, которое может быть гидрофильным, инертным и биосовместимым веществом, например, полоксамеры, например, такие как Pluronic F68 или Pluronic 127.

Пневмококковая вакцина по настоящему изобретению может дополнительно содержать антибактериальные агенты, антиоксиданты, инактиваторы вирусов, консерванты, красители, стабилизаторы, противовспенивающие агенты, поверхностно-активные вещества (нейоногенные, анионогенные или катионогенные), описанные в данном документе, или их комбинации. Антибактериальные агенты могут представлять, например, амфотерицин или его производные, хлортетрациклин, формальдегид или формалин, гентамицин, неомицин, полимиксин В или его производное, стрептомицин или их комбинацию. Антиоксиданты могут представлять, например, аскорбиновую кислоту или токоферол, или любую их комбинацию. Инактиваторы вирусов могут представлять, например, формалин, бета-пропиолактон, УФ-облучение, нагревание или любую их комбинацию.

При описании вариантов осуществления настоящего изобретения комбинации и перестановки всех возможных вариантов осуществления подробно не описаны. Тем не менее, простой факт, что некоторые показатели цитированы во взаимно разных зависимых пунктах или описаны в различных вариантах осуществления, не указывает на то, что комбинацию этих показателей невозможно использовать для достижения преимуществ изобретения. Настоящее изобретение предусматривает все возможные комбинации и перестановки описанных вариантов осуществления.

### Примеры

#### Пример 1

#### Цель

Целью настоящего исследования является изучение иммуногенности и протективной эффективности интраназально вводимого адьювантированного расщепленного антигена вируса гриппа и адьювантированного инактивированного антигена цельного вируса

гриппа по настоящему изобретению на модели хорьков.

Исследовали вакцину на основе расщепленного антигена H1N1/California/2009 (вакцина А) с дозами антигена 5, 15 или 30 мкг НА и вакцину на основе антигена инактивированного цельного вируса (вакцина В) с дозой антигена 15 мкг НА.

- 5 Эффективность вакцины оценивали с использованием вируса дикого типа H1N1 A/The Netherlands/602/2009 для контрольного заражения.

Адъювант Endocine<sup>TM</sup> состоял из эквимолярных количествmonoолеата глицерина и олеиновой кислоты с конечной концентрацией 20 мг/мл (2%) в вакцинной композиции.

- 10 В данном опыте вакцина Immunose<sup>TM</sup> FLU означает инактивированные антигены вируса гриппа, смешанные с Endocine<sup>TM</sup>.

Таблица 2

Экспериментальные группы на стадии иммунизации

Номер группы	Количество животных	Тестируемое вещество	Доза антигена (мкг НА, H1N1)	Путь иммунизации
1	6	Физиологический раствор	0	Интраназальный
2	6	Fluarix <sup>®</sup>	15	Подкожный
3	6	Вакцина А	5	Интраназальный
4	6	Вакцина А	15	Интраназальный
5	6	Вакцина А	30	Интраназальный
6	6	Вакцина В	15	Интраназальный

### Приготовление и введение вакцины

Физиологический раствор: 0,9% физиологический раствор, pH 5-5,5.

25 Fluarix<sup>®</sup>: вакцина для парентерального введения (состоит из A/California/7/2009(H1N1)-подобный, A/Perth/16/2009(H3N2)-подобный и B/Brisbane/60/2008-подобный вакциновые штаммы в дозе 15 мкг НА каждого вакцинного штамма). Животных группы 2 вакцинировали подкожно на сутки 21 и 42 по 0,5 мл Fluarix (GlaxoSmithKline Biologicals).

30 Вакцина А: противогриппозная вакцина в виде капель для носа, 5, 15 и 30 мкг НА/0,2 мл, содержащая композицию адъюванта Endocine<sup>TM</sup>, состоящую из эквимолярных количеств monoолеата глицерина и олеиновой кислоты (pH 8, в 0,1M Трис-буфере), с конечной концентрацией 20 мг/мл в вакцинной композиции; расщепленный антиген H1N1/California/2009.

35 Вакцина В: противогриппозная вакцина в виде капель для носа, 15 мкг НА/0,2 мл, содержащая композицию адъюванта Endocine<sup>TM</sup>, состоящую из эквимолярных количеств monoолеата глицерина и олеиновой кислоты (pH 8, в 0,1M Трис-буфере), с конечной концентрацией 20 мг/мл в вакцинной композиции; инактивированный антиген цельного вируса H1N1/California/2009.

### Хорьки

40 Использовали здоровых хорьков-самок (*Mustela putorius furo*: аутбредные), в возрасте примерно 12 месяцев, с массой тела 760-1210 г и серонегативных на антитела против циркулирующих вирусов гриппа В, A/H1N1, A/H3N2 и A/pH1N1, что было показано в тесте ингибирования реакции гемагглютинации (HI). Животных содержали в обычных клетках, группами по 8 животных во время стадии до иммунизации и группами по 6 животных во время стадии иммунизации. Хорьков из опытных групп переносили в 45 клетки-изоляторы в «перчаточном» боксе с отрицательным давлением в день контрольного заражения. Во время всего эксперимента животным скармливали обычный гранулированный корм и воду давали вволю.

### Иммунизация

Пять групп по шесть хорьков получали три интраназальные иммунизации (капли: по 100 мкл в каждую ноздрю с использованием пипетки с фильтром) под анестезией кетамином и домитором на сутки 0, 21 и 42. Животные группы 1 получали 200 мкл стерильного физиологического раствора (0,9% физиологический раствор с pH 5-5,5).

Животных групп 3, 4 и 5 интраназально иммунизировали 200 мкл формулированного в Endocine<sup>TM</sup> расщепленного антигена H1N1/California/2009, содержащего соответственно 5, 15 и 30 мкг НА. Животных группы 6 интраназально иммунизировали 200 мкл формулированного в Endocine<sup>TM</sup> антигена цельного вируса H1N1/California/2009, содержащего соответственно 15 мкг НА. Хорькам контрольной группы 1 вводили интраназально 200 мкл физиологического раствора. Одну группу из шести хорьков (группа 2) вакцинировали подкожно на сутки 21 и 42 0,5 мл Fluarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline Biologicals), сезонная 2010/2011, неадьювантная трехвалентная вакцина (TIV), которая содержала 15 мкг НА каждого вакцинного штамма. Пробы крови для приготовления сыворотки крови отбирали до иммунизации на сутки 0, 21 и 42 и перед контрольным заражением на сутки 64 и 70 эксперимента.

#### **Приготовление и введение вирусного препарата для контрольного заражения**

На сутки 70 всем животным проводили контрольное заражение полевым изолятом вируса гриппа (штамм H1N1 A/The Netherlands/602/2009), который вводили

интратрахеальным путем. Для приготовления вируса для контрольного заражения стоковый раствор вируса гриппа H1N1 A/The Netherlands/602/2009 ( $7,8 \log_{10}$  TCID50/мл) разводили охлажденным на льду PBS до титра  $3,3 \times 10^5$  TCID50/мл. Всех животных заражали интратрахеально 3 мл вирусного препарата для контрольного заражения, содержащего 106 TCID50, который вводили небольшим катетером в трахею с использованием трахеоскопа и высвобождали непосредственно выше бифуркации трахеи. Приготовление и введение вируса для заражения проводили в условиях с уровнем защиты BSL3. Через 1 сутки после заражения образец оставшегося разведения вируса, использованного для заражения, титровали на клетках собачьих почек Мадин-Дарби (MDCK) для подтверждения инфекционности вируса. Обратное титрование разведения, использованного для заражения, через одни сутки после инокуляции показало, что материал по-прежнему содержал  $4,8 \log_{10}$  TCID50.

#### **Процедуры и отбор проб**

Проводили несколько процедур на хорьках в течение эксперимента. Для имплантации температурных датчиков, иммунизации, заражения вирусом и компьютерной томографии

(СТ) животным проводили анестезию смесью кетамина (4-8 мг/кг: в/м; Alfasan, Woerden, Нидерланды) и домитора (0,1 мг/кг: в/м; Orion Pharma, Espoo, Финляндия). Для отбора проб (крови, мазков и промывных жидкостей носовой полости) и эвтаназии кровопусканием животным проводили анестезию кетамином. За две недели до начала опыта в брюшную полость хорьков помещали температурный датчик (ультрамалый температурный датчик DST micro-T; Star-Oddi, Reykjavik, Исландия). Данное устройство регистрировало температуру тела животных каждые 10 мин. Хорьков взвешивали перед каждой иммунизацией (сутки 0, 21 и 42) и в дни контрольного заражения и эвтаназии (сутки 70 и 74). Животных групп 1, 2 и 4 обследовали компьютерной хроматографией на сутки 64, 71, 72, 73 и 74. Пробы крови отбирали до иммунизации на сутки 0, 21 и 42, на сутки 64 и перед заражением на сутки 70. Проводили забор мазков из носовой полости и горла перед заражением на сутки 70 и на каждый день после заражения.

#### **Отбор проб крови и сыворотки**

Пробы крови отбирали и разделяли на 2 равных объема. Один объем, использованный

для выделения РВМС, немедленно переносили в пробирку, содержащую антикоагулянт ЭДТА. Другой объем, использованный для приготовления сыворотки, переносили в пробирку для приготовления сыворотки, содержащую активатор свертывания. Все пробирки для приготовления сыворотки центрифугировали примерно при 2000×g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку разливали на аликовтные порции по 0,1 мл и хранили примерно при -80°C.

#### **Выделение РВМС из плазмы крови**

Пробы крови, использованные для выделения РВМС, немедленно переносили в пробирку, содержащую антикоагулянт ЭДТА, центрифугировали при 880×g в течение 10 мин, плазму хранили примерно при -80°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 3,5 мл буфера для промывания (D-PBS: lot#: RNBB7791, V-CMS: 10700395 и EDTA:lot#: 079K8712, V-CMS:10700037), насыщали на 3 мл lymphoprep и центрифугировали при 800×g в течение 30 мин. После центрифугирования собирали клетки на поверхности раздела, переносили в новую пробирку и 4 раза промывали буфером для промывания. Центрифугировали при 600×g, 465×g и 350×g в течение 10 мин и при 250×g в течение 15 мин на последующих стадиях отмывки. После последней стадии промывки клеточный осадок ресуспендировали, помещали на лед по меньшей мере на 10 мин, ресуспендировали в 1 мл охлажденной на льду среды (RPMI lot# 1MB078, 20% FCS VC# 201110194, 10% ДМСО VC # 10700203), переносили в ампулу и хранили при -80°C.

#### **Серология**

Титры антител против H1N1 A/The Netherlands/602/2009 и 2 отдаленных вирусов H1N1 A/Swine/Ned/25/80 и H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 определяли в реакции ингибиования гемагглютинации (HI) и в тесте нейтрализации вируса (VN). Титры антител против отдаленного вируса H1N1 A/New Jersey/08/76 определяли реакцией ингибиования гемагглютинации.

#### **Анализ HI**

Анализ HI является стандартным анализом связывания, основанным на способности специфических антител к гемагглютинину вируса гриппа блокировать индуцированную вирусом агглютинацию эритроцитов. Пробы предварительно обрабатывали фильтратом холерной культуры (полученной из культур холерного вибриона) для удаления неспецифической антигемагглютинирующей активности. После инкубации в течение 16 ч при 37°C фильтрат холерной культуры инактивировали инкубацией проб в течение 1 ч при 56°C. Готовили серийные двукратные разведения проб в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) (96-луночные планшеты в двух повторностях, начиная с разведения 1:20), и когда пробы показывали неспецифическую гемагглютинацию, то их предварительно обрабатывали эритроцитами индейки. После удаления этих эритроцитов пробы инкубировали с фиксированной концентрацией 4 единиц гемагглютинации (HAU) интересующего вируса гриппа в течение 1 ч при 4°C. Наконец, планшеты независимо оценивались двумя экспертами в отношении ингибиования гемагглютинации, что детектировали по осаждению эритроцитов. Во все анализы включали сыворотку крови контрольных хорьков.

#### **Анализ VN**

Анализ VN является стандартным анализом, основанным на способности субпопуляции вирус-специфических антител к вирусу гриппа нейтрализовать вирус таким образом, что репликация вируса будет отсутствовать в клеточной культуре. Пробы инактивировали нагреванием в течение 30 мин при 56°C и затем готовили серию двукратных разведений проб в инфекционной среде (минимальная эссенциальная среда Игла с добавлением 20 mM Нерес, 0,075% бикарбоната натрия, 2 mM L-глютамина, 100

МЕ/мл пенициллина и стрептомицина, 17,5 мкг/мл трипсина и 2,3 нг/мл амфотерицина В) в 96-луночных планшетах в трех повторностях, начиная с разведения 1:8. Затем разведения проб инкубировали с 25-400 TCID50 интересующего вируса в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После завершения инкубации в течение 1 ч смеси вирус-

<sup>5</sup> антитела переносили в планшеты с монослоями культуры клеток собачьих почек Мадин-Дарби (MDCK), которые показывали конфлюентность на уровне 95-100%. Затем данные планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и затем смеси вирус-антитела удаляли и замещали инфекционной средой. После инкубации в течение 6 суток при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> планшеты анализировали на ридере с использование <sup>10</sup> эритроцитов индейки для детектирования присутствия гемагглютинина вируса гриппа. Титры VN рассчитывали согласно методу, описанному Reed and Muench (Reed L.J., Muench H. (1938). «A simple method of estimating fifty percent endpoints». The American Journal of Hygiene, 27, 493-497).

#### **Репликация вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей**

<sup>15</sup> На сутки 0, 1, 2, 3 и 4 после контрольного заражения у животных под анестезией проводили забор мазков из носовой полости и горла. Через четверо суток после заражения хорьков подвергали эвтаназии кровопусканием под анестезией, после чего проводили полное макроскопическое патологическое обследование тела и отбирали <sup>20</sup> ткани. Отбирали образцы из правой носовой раковины и всех долей правого легкого и хранили при -80°C до последующей обработки. Образцы носовой раковины и легких взвешивали и затем гомогенизировали на FastPrep-24 (MP Biomedicals, Eindhoven, Нидерланды) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса, содержащем 0,5% лактальбумина, 10% глицерина, 200 Е/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина, 100 Е/мл сульфата полимиксина В, 250 мкг/мл гентамицина и 50 Е/мл нистатина (ICN <sup>25</sup> Pharmaceuticals, Zoetermeer, Нидерланды) и быстро центрифугировали перед разведением.

После забора мазки из носовой раковины и горла хранили при -80°C в той же среде, которую использовали для обработки образцов тканей. Серию 10-кратных разведений супернатантов легких и мазков в четырех повторностях использовали для определения титров вируса в конфлюентных слоях клеток MDCK, как описано ранее (Rimmelzwaan G.F. et al., J. Virol. Methods, 1998, Sep. 74(1), 57-66).

#### **Результаты по определению титра антител**

Уровни антител в сыворотке крови определяли на сутки 0, 21, 42, 64 и 70 перед каждой <sup>35</sup> иммунизацией. Титры антител против H1N1 A/The Netherlands/602/2009 и 2 отдаленных вирусов H1N1 A/Swine/Ned/25/80 и H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 определяли в реакции ингибирования гемагглютинации (HI) и в teste нейтрализации вируса (VNT). Титры антител против отдаленного вируса H1N1 A/New Jersey/08/76 определяли реакцией ингибирования гемагглютинации (HI).

Титры антител HI - гомологичные: H1N1 A/The Netherlands/602/2009

<sup>40</sup> Средние геометрические значения титра HI приведены на фигуре 1. Значение ≤5 заменяли на соответствующее абсолютное значение 5 для расчета геометрического среднего. Все сыворотки, полученные до начала опыта (0 сутки), были отрицательными на наличие антител в HI (титр: ≤5).

Анализ установленных титров HI по группам дал следующие результаты:

Группа 1 (физиологический раствор; контроль на инфекцию)

Все пробы сыворотки крови были отрицательными на присутствие антител в HI.

Группа 2 (Fluarix®; контрольная вакцина при парентеральном введении)

В одной пробе сыворотки крови, отобранный после первой иммунизации (сутки 42),

был низкий титр антител НI (титр: 13). Низкие титры (в пределах 13-70) детектировали после второй иммунизации в сыворотке крови пяти из шести животных.

Группа 3 (вакцина А, 5 мкг НА, интраназально)

Все пробы, отобранные после первой иммунизации, были положительными на

антитела НI (сутки 21; GMT: 477, пределы 160-1120). Титры антител НI существенно повышались после второй иммунизации (сутки 42; GMT: 1669, пределы 1120-2560) и у четырех из шести животных также после третьей иммунизации (сутки 64; GMT: 2158, пределы 1280-3840). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры НI, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 2103, пределы 1120-3840).

Группа 4 (вакцина А, 15 мкг НА, интраназально)

Пять из шести проб, отобранных после первой иммунизации, были положительными на антитела НI (сутки 21; GMT: 1130, пределы 5-5760). Все пробы, отобранные после второй иммунизации, были положительными на антитела НI; титры антител НI существенно повышались у пяти животных (сутки 42; GMT: 3673, пределы 1120-5760). Третья иммунизация не приводила к повышенным титрам антител НI (сутки 64; GMT: 2386, пределы 1920-4480). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры НI, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 2281, пределы 1280-2560).

Группа 5 (вакцина А, 30 мкг НА, интраназально)

Все пробы, отобранные после первой иммунизации, были положительными на антитела НI (сутки 21; GMT: 1249, пределы 400-3200). У пяти из шести животных титры антител НI существенно повышались после второй иммунизации (сутки 42; GMT: 1874, пределы 640-3840) и у двух животных также после третьей иммунизации (сутки 64; GMT: 1837, пределы 1280-3200). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры НI, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 1699, пределы 640-3200).

Группа 6 (вакцина В, 15 мкг НА, интраназально)

Пять из шести проб, отобранных после первой иммунизации, были положительными на антитела НI (сутки 21; GMT: 87, пределы 5-1280). Титры антител НI существенно повышались у всех животных после второй иммунизации (сутки 42; GMT: 577, пределы 100-2880) и у двух животных также после третьей иммунизации (сутки 64; GMT: 626, пределы 160-2560). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры НI, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 583, пределы 160-2240).

Гетерологичные: H1N1 A/Swine/Ned/25/80, H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 и H1N1 A/New Jersey/08/76

Определяли титры антител НI против отдаленных вирусов H1N1 A/Swine/Ned/25/80, H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 и H1N1 A/New Jersey/08/76. Геометрические средние значения титров НI против отдаленных вирусов представлены на фигуре 2. Значение  $\leq 5$  заменяли на соответствующее абсолютное значение 5 для расчета геометрического среднего. Все сыворотки, полученные до начала опыта (0 сутки) были отрицательными на наличие антител в НI (титр:  $\leq 5$ ). Титры перекрестно реагирующих антител НI были существенно ниже, чем титры гомологичных антител H1N1 A/The Netherlands/602/2009.

Анализ установленных титров НI по группам дал следующие результаты:

Группа 1 (физиологический раствор; контроль на инфекцию)

Все пробы сыворотки крови были отрицательными на присутствие антител в НI. В одной пробе, отобранной на сутки 64, был очень низкий титр антител НI, равный 7,5,

против H1N1 A/Swine/Italy/14432/76.

Группа 2 (Fluarix<sup>®</sup>; контрольная вакцина при парентеральном введении)

Все пробы были отрицательными на присутствие антител HI против H1N1 A/Swine/Ned/25/80 и H1N1 A/Swine/Italy/14432/76. Детектировали низкие титры антител HI против H1N1 A/New Jersey/08/76 у трех из шести животных после первой иммунизации в сыворотке крови, отобранный на сутки 42.

Группа 3 (вакцина А, 5 мкг НА, интраназально)

У всех животных продуцировались перекрестно реагирующие антитела против трех отдаленных вирусов. Наиболее высокие титры определялись после второй и/или третьей иммунизации. Титры антител против H1N1 A/Swine/Ned/25/80 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 6 (пределы 5-7,5), 24 (пределы 5-60), 32 (пределы 20-80) и 19 (пределы 5-70). Титры антител против H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 16 (пределы 5-50), 38 (пределы 10-80), 63 (пределы 40-160) и 42 (пределы 20-120). Титры антител против H1N1 A/New Jersey/08/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 5, 26 (пределы 7,5-70), 39 (пределы 5-80) и 29 (пределы 20-50).

Группа 4 (вакцина А, 15 мкг НА, интраназально)

У всех животных продуцировались перекрестно реагирующие антитела HI против трех отдаленных вирусов после второй иммунизации. Третья иммунизация не приводила к повышению титров антител HI. Титры антител против H1N1 A/Swine/Ned/25/80 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 42 (пределы 5-90), 239 (пределы 20-1120), 88 (пределы 50-160) и 75 (пределы 40-160). Титры антител против H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 78 (пределы 5-280), 327 (пределы 35-1280), 153 (пределы 80-320) и 105 (пределы 70-160). Титры антител против H1N1 A/New Jersey/08/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 25 (пределы 5-80), 176 (пределы 60-400), 64 (пределы 40-140) и 63 (пределы 40-160).

Группа 5 (вакцина А, 30 мкг НА, интраназально)

У всех животных, за исключением одного, продуцировались перекрестно реагирующие антитела HI против H1N1 A/Swine/Ned/25/80. У всех животных продуцировались перекрестно реагирующие антитела HI против H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 и H1N1 A/New Jersey/08/76. Наиболее высокие титры определяли после второй и/или третьей иммунизации. Титры антител против H1N1 A/Swine/Ned/25/80 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 23 (пределы 5-80), 41 (пределы 5-320), 42 (пределы 5-320) и 34 (пределы 5-320). Титры антител против H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 39 (пределы 5-160), 54 (пределы 5-640), 78 (пределы 20-720) и 50 (пределы 5-480). Титры антител против H1N1 A/New Jersey/08/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 9 (пределы 5-30), 40 (пределы 5-400), 35 (пределы 5-160) и 27 (пределы 5-160).

Группа 6 (вакцина В, 15 мкг НА, интраназально)

У всех животных продуцировались перекрестно реагирующие антитела HI против A/Swine/Italy/14432/76. У всех животных, за исключением одного животного, продуцировались перекрестно реагирующие антитела HI против H1N1 A/Swine/Ned/25/80, и у всех животных, за исключением одного, продуцировались перекрестно реагирующие антитела HI к H1N1 A/New Jersey/08/76. Наиболее высокие титры определяли после второй и/или третьей иммунизации. Титры антител против H1N1 A/Swine/Ned/25/80 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 7 (пределы 5-40), 19 (пределы 5-80), 15 (пределы 5-80) и 9 (пределы 5-40). Титры антител против

H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 9 (пределы 5-160), 32 (пределы 5-160), 27 (пределы 5-160) и 15 (пределы 5-80). Титры антител против H1N1 A/New Jersey/08/76 в HI (GMT) на сутки 21, 42, 64 и 70 равнялись соответственно 8 (пределы 5-80), 47 (пределы 10-240), 19 (пределы 5-140) и 13 (пределы 5-80).

#### **Титры антител VN**

Гомологичные: H1N1 A/The Netherlands/602/2009

Титры антител в VN определяли в пробах сыворотки крови от всех опытных животных. Геометрические средние значения титров VN представлены на фигуре 3. Все сыворотки, полученные до начала опыта (0 сутки) были отрицательными на наличие антител в VN (титр:  $\leq 8$ ).

Анализ установленных титров VN по группам дал следующие результаты:

Группа 1 (физиологический раствор; контроль на инфекцию)

Все пробы сыворотки крови были отрицательными на присутствие антител в VN, за исключением одного животного на сутки 42, у которого титр составлял  $\leq 64$ .

Группа 2 (Fluarix<sup>®</sup>; контрольная вакцина при парентеральном введении)

Все пробы сыворотки крови были отрицательными на присутствие антител в VN.

Группа 3 (вакцина А, 5 мкг НА, интраназально)

Четыре из шести проб, отобранные после первой иммунизации, были положительными на антитела VN (сутки 21; GMT: 19, пределы 8-64). Все пробы, отобранные после второй иммунизации, были положительными на антитела VN. Титры антител VN существенно повышались у пяти животных после второй иммунизации (сутки 42; GMT: 242, пределы 64-859) и после третьей иммунизации (сутки 64; GMT: 995, пределы 362-2436). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место сравнимые или более низкие титры VN, чем на сутки 64 (сутки 70; GMT: 535, пределы 304-859).

Группа 4 (вакцина А, 15 мкг НА, интраназально)

Пять из шести проб, отобранных после первой иммунизации, были положительными на антитела VN (сутки 21; GMT: 147, пределы 8-724). Все пробы, отобранные после второй иммунизации, были положительными на антитела VN. Титры антител VN существенно повышались у пяти животных после второй иммунизации (сутки 42; GMT: 2376, пределы 64-8192) и у двух животных после третьей иммунизации (сутки 64; GMT: 1688, пределы 662-4871). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры VN, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 1581, пределы 351-3444).

Группа 5 (вакцина А, 30 мкг НА, интраназально)

Все пробы, отобранные после первой иммунизации, были положительными на антитела VN (сутки 21; GMT: 74, пределы 11-627). Титры антител VN существенно повышались у пяти из шести животных после второй иммунизации (сутки 42; GMT: 504, пределы 41-3435) и у трех из шести животных после третьей иммунизации (сутки 64; GMT: 1673, пределы 724-4884). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры VN, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 1699, пределы 304-5793).

Группа 6 (вакцина В, 15 мкг НА, интраназально)

Две из шести проб, отобранных после первой иммунизации, были слабоположительными на антитела VN (сутки 21; GMT: 12, пределы 8-64). Все пробы, отобранные после второй иммунизации, были положительными на антитела VN (сутки 42; GMT: 78, в пределах 32-304). Титры антител VN повышались после третьей

иммунизации (сутки 64; GMT: 242, пределы 113-747). В пробах, отобранных на сутки 70 (день заражения), имели место титры VN, сравнимые с установленными на сутки 64 (сутки 70; GMT: 177, пределы 91-362).

Гетерологичные: H1N1 A/Swine/Ned/25/80, H1N1 A/Swine/Italy/14432/76. Определяли

- 5 титры VN против отдаленных вирусов H1N1 A/Swine/Ned/25/80 и H1N1 A/Swine/Italy/14432/76 (данные не представлены). Все группы 3, 4, 5 и 6 превосходили группы 1 и 2 на сутки 42, 64 и 70.

### **Пример 2**

Для всех опытных животных определяли некоторые клинические и патологические

- 10 показатели, т.е. смертность, температуру тела, массу тела, вентилируемый объем легких, вирусную нагрузку в носовых раковинах и легких, вирусовыделение в верхних дыхательных путях, посмертное макроскопическое патологическое обследование массы легких, средний процент пораженной ткани легких, микроскопическое исследование показателей воспаления в носовых раковинах и легких. Животные групп 3, 4 и 5 15 превосходили группы 1 и 2 по всем тестированным макроскопическим и большинству микроскопических показателей (данные не представлены).

### **Репликация вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей**

На сутки 0, 1, 2, 3 и 4 после контрольного заражения у животных под анестезией

- 20 проводили забор мазков из носовой полости и горла. Через четверо суток после заражения хорьков подвергали эвтаназии кровопусканием под анестезией, после чего проводили полное макроскопическое патологическое обследование тела и отбирали образцы ткани. Отбирали образцы из правой носовой раковины и всех долей правого легкого и хранили при -80°C до последующей обработки. Образцы носовой раковины и легких взвешивали и затем гомогенизировали на FastPrep-24 (MP Biomedicals, Eindhoven, 25 Нидерланды) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса, содержащем 0,5% лактальбумина, 10% глицерина, 200 Е/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина, 100 Е/мл сульфата полимиксина В, 250 мкг/мл гентамицина и 50 Е/мл нистатина (ICN Pharmaceuticals, Zoetermeer, Нидерланды) и быстро центрифугировали перед разведением.

После забора мазки из носовой раковины и горла хранили при -80°C в той же среде,

- 30 которую использовали для обработки образцов тканей. Серию 10-кратных разведений супернатантов легких и мазков в четырех повторностях использовали для определения титров вируса в конфлюентных слоях клеток MDCK, как описано ранее (Rimmelzwaan G.F. et al., J. Virol. Methods, 1998, Sep. 74(1), 57-66).

### **Макроскопическое патологическое обследование и гистопатология**

- 35 Животных подвергали эвтаназии согласно стандартному протоколу, как описано ранее (van den Brand J.M. et al., PLoS One, 2012, 7(8)e, 42343). Вкратце, трахею пережимали таким образом, чтобы легкие не спадались при вскрытии плевральной полости, что позволяло провести точную визуальную оценку областей пораженной паренхимы легких. Отбирали образцы для гистологического исследования левого легкого и 40 помещали в 10% нейтральный забуференный формалин (после медленной инфузии формалином), заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином-эозином (HE) для исследования световой микроскопией. Образцы отбирали стандартным путем, не руководствуясь изменениями, выявленными при макроскопическом осмотре. Проводили полу количественную оценку связанного с 45 вирусом гриппа воспаления в легких, как описано ранее (таблица 6) (Munster V.J. et al., Science, 2009, Jul. 24; 325(5939):481-3). Все стекла исследовали «вслепую» без информации о характере обработки животных.

### **Результаты по вирусной нагрузке в легких и верхних дыхательных путей**

У всех хорьков контрольных групп 1 (интраназально физиологический раствор) и 2 (парентерально TIV) имели место высокие титры репликации компетентного вируса в легких (соответственно средние значения титров: 5,7 и 5,5 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/г ткани) и носовых раковинах (соответственно средние значения титров: 7,2 и 6,9 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/г ткани) (таблица 5). У хорьков групп 3, 4 и 5 (интраназально вакцины на основе расщепленного антигена pH1N1/09, адьювантированные Endocine<sup>TM</sup>) отсутствовал детектируемый инфекционный вирус в легких и носовых раковинах. У хорьков группы 6 (интраназально цельный вирус, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup> в дозе 15 мкг НА) отсутствовал детектируемый инфекционный вирус в легких, и имел место средний титр 4,1 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/г ткани в носовых раковинах, который был достоверно ниже по сравнению с контрольной группой 1 ( $p=0,02$ ).

Интраназальная иммунизация вакцинами pH1N1/09, адьювантированными Endocine<sup>TM</sup>, приводила к снижению титров вируса в мазках, забранных из носа и горла, по сравнению с введением физиологического раствора или TIV. Вирусные нагрузки, выраженные в виде кривой (AUC), на временной интервал 1-4 сутки после иммунизации, в носовой полости и горле приведены в таблице 5. Вирусные нагрузки в мазках из носа в группах 3, 4 и 5 (интраназально расщепленный антиген, адьювантированный Endocine<sup>TM</sup>, соответственно в дозах 5, 15 и 30 мкг НА), но не в группах 2 и 6, были достоверно ниже по сравнению с группой 1 (группа 1 против групп 3-5;  $p\leq 0,03$ ). Вирусные нагрузки в мазках из горла в группах 1 и 2 были сравнимы между собой и достоверно выше, чем в группах 3, 4, 5 и 6 ( $p\leq 0,03$ ).

**Результаты по макроскопическому патологическому обследованию и гистопатологии**  
Пониженная репликация вируса в группах хорьков, которых иммунизировали вакцинами pH1N1/09, адьювантированными Endocine<sup>TM</sup>, согласовывалась с уменьшением макроскопических патологических изменений в легких (таблица 5).

Макроскопические посмертные патологические очаги в легких включали фокальную или мультифокальную консолидацию, характеризующуюся четко ограниченным покраснением паренхимы. У всех хорьков в контрольной группе 1 (интраназально физиологический раствор) и группе 2 (парентерально TIV) имела место пораженная ткань легких на среднем процентном уровне 50% и 37%, соответственно, и она соответствовала средней относительной массе легких (RLW), равной соответственно 1,5 и 1,3 (таблица 5). В противоположность, легкие хорьков в группах 3, 4, 5 и 6 (интраназально вакцины pH1N1/09, адьювантированные Endocine<sup>TM</sup>) были поражены существенно меньше со средним процентом пораженной ткани легких на уровне 7-8%. Значения RLW для четырех Endocine<sup>TM</sup>-вакцинированных групп согласуются с этими наблюдениями (находились в узких пределах от 0,8 до 0,9).

Консолидация легочной ткани коррелировала с острой бронхо-интерстициальной пневмонией, которая была выявлена при микроскопическом исследовании. Она характеризовалась наличием воспалительных клеток (в основном макрофагов и нейтрофилов) в просвете и стенках альвеол, и набуханием или потерей выстилающих пневмоцитов. Кроме того, в более тяжелых случаях альвеолита обычно наблюдали богатую белком отечную жидкость, фибриновые полосы и вышедшие из сосудов эритроциты в альвеолярных пространствах и пневмоцитарную гиперплазию типа II. Гистологические показатели, оцененные в баллах, обобщены в таблице 5. Наиболее тяжелые патологические изменения в альвеолах были обнаружены в контрольных группах (интраназально физиологический раствор) и 2 (парентерально TIV). Все

показатели оцененных патологических очагов в альвеолах были наиболее низкими в группе 5, но фактически различия между группами 3, 4, 5 и 6 были не достоверными.

В заключение, в легких - интраптрахеальное заражение вирусом H1N1 A/Netherlands/602/2009 на модели хорьков приводило к развитию пневмонии от слабой до тяжелой степени. Однако у некоторых животных из вакцинированных групп при макроскопическом патологическом обследовании видимые патологические изменения в легких отсутствовали вовсе. Основываясь на макроскопической посмертной оценке патологических очагов в легких (установленном % пораженной ткани легких), хорьки в вакцинированной группе 4 (вакцина А 15 мкг НА) и вакцинированной группе 5 (вакцина А 30 мкг НА) имели, по меньшей мере, патологические очаги в легких, которые оценивались очень низкими баллами на уровне 7%, затем сразу же следовали хорьки из вакцинированной группы 3 (вакцина А 5 мкг НА) и группы 6 (вакцина В 15 мкг НА) в обоих случаях на уровне 8%. У животных группы 1, обработанных плацебо PBS, было самое большое количество патологических очагов в легких с высоким средним количеством баллов на уровне 50%. У хорьков в контрольной группе 1 с парентеральной вакцинацией было несколько меньше, но все-таки, много патологических изменений в легких на уровне в среднем 37%. Средняя относительная масса легких (RLW) четко коррелировала с установленным процентом пораженной ткани легких, что подтверждало значение данных установленных процентов пораженной ткани легких.

Результаты микроскопического исследования легких подтверждали по большинству оцененных показателей патологических изменений легких, что наилучшие баллы были для группы 5 при вакцинации в самой высокой дозе (вакцина А 30 мкг НА), и постепенное усиление изменений в ткани дыхательной системы коррелировало со снижением дозы НА вакцины А (соответственно группы 3 и 2). Вакцинация вакциной В в дозе 15 мкг НА практически была равной результатам с вакциной А, введенной в самой низкой дозе 5 мкг НА (группа). Обработка плацебо PBS (группа 1), результаты которой были оценены как самые худшие по всем гистопатологическим показателям, следовала близко к контрольной группе 2, животные в которой были вакцинированы парентерально. Примечательно, что у животных, вакцинированных интраназально (группы 3, 4, 5 и 6), отсутствовали альвеолярные геморрагии.

Общие выводы - следовательно, в заключении, основываясь на средних баллах оценки патологии на данной модели на хорьках с контрольным заражением вирусом, наилучшие результаты показала вакцинация вакциной А в дозе 30 мкг НА (группа 5), которая приводила к развитию наименьших патологическим очагов в дыхательной системе, в то время как обработка плацебо PBS давала наихудшие результаты и приводила к наибольшему развитию патологических очагов в дыхательных путях. Проведенная вакцинация вакциной А в дозе 15 мкг НА (группа 4) была несколько хуже по сравнению с группой 5, затем следовала вакцинация вакциной А в дозе 5 мкг НА (группа 3), которая давала практически одинаковые результаты с вакцинацией вакциной В в дозе 15 мкг НА (группа 6). У всех вакцинированных интраназально животных, независимо от дозы и типа вакцины, отсутствовали альвеолярные геморрагии. Контрольная парентеральная вакцинация (группа 2) давала низкие результаты с заметными патологическими очагами в дыхательных путях, и она была минимально лучше по сравнению с обработкой плацебо PBS (группа 1).

### **Пример 3**

В таблице 3 ниже и на фигуре 4 приведено сравнение вакцины по настоящему изобретению с другими продуктами, FluMist и инъекционными вакцинами у иммунологически незащищенных хорьков.

Таблица 3

	Вакцина от	Хорьки(иммунологически незащищенные)	Доза	Путь введения	Вакцинный штамм (H1N1)	Штамм, используемый для оценки (H1N1)	Титр NT при оценке
5	GSK* (GSK H1N1)	N=6	15 мкг НА, без адьюванта	IM	A/California/7/09	A/The Netherlands/602/09	Перед контрольным заражением (после 2 вакцинации)
	GSK*	N=6	15 мкг НА, AS03 <sub>A</sub>	IM			
10	Novartis# (Novartis TIV)	N=3	15 мкг НА, без адьюванта	IM	A/Brisbane/59/07	A/California/7/09	Перед контрольным заражением (после 2 вакцинации)
	Medimmune# (pandemic LAIV)	N=3	1×10 <sup>7</sup> TCID <sub>50</sub>	IN	A/California/7/09 (ca)		
15	GSK (GSK TIV)	N=6	15 мкг НА, без адьюванта	SC	A/California/7/09	A/The Netherlands/602/09	Сутки 42 (после 2 вакцинации)
	Eurocine Vaccines Immunose <sup>TM</sup> FLU**	N=6	15 мкг НА, Endocine <sup>TM</sup> 20 мг/мл	IN			

\* Baras et al., Vaccine, 29, 2011, 2120-2126

#Chen et al., JID, 2011:203

\*\*Вакцины с Eurocine: настоящее исследование

У животных в группах с моновалентной пандемической вакциной GSK (GSK H1N1), трехвалентной инактивированной вакциной Novartis (Novartis TIV), трехвалентной инактивированной вакциной GSK (GSK TIV) титр в реакции нейтрализации (NT) был ниже 15.

Результаты свидетельствуют о том, что вакцинная композиция по настоящему изобретению, Immunose<sup>TM</sup> FLU, которая здесь представляет вакцину, содержащую 15 мкг НА расщепленного антигена вируса гриппа с 20 мг/мл (2%) Endocine<sup>TM</sup> (группа 4, таблица 2), показывает аналогичные титры в реакции нейтрализации с пандемической вакциной LAIV FluMist Medimmune (см. фигуру 5) и более высокие титры с инъекционными вакцинами, в то время как неадьювантная вакцина TIV индуцирует слабый ответ.

#### Пример 4

Оценка гуморального иммунного ответа у мышей в возрасте 15 месяцев после противогриппозной вакцинации с или без Endocine<sup>TM</sup>.

#### Цель

Целью настоящего исследования была оценка специфической ответной выработки антител на антигены гриппа при комбинировании с адьювантом Endocine<sup>TM</sup> и интраназальном введении старым мышам (в возрасте 15 месяцев).

Адьювант Endocine<sup>TM</sup> содержал эквимолярные количества моноолеата глицерина и олеиновой кислоты с конечной концентрацией 20 мг/мл (2%) в вакцинной композиции.

В данном опыте вакцина Immunose<sup>TM</sup> FLU означает инактивированные антигены вируса гриппа, смешанные с Endocine<sup>TM</sup>.

Ответную выработку антител, специфических к вирусу гриппа, оценивали на мышах-самках, вакцинированных композициями, содержащими H1N1/California/2009/

расщепленный антиген с или без Endocine<sup>TM</sup>, в опыт была включена группа, получавшая физиологический раствор в качестве контроля. Мышей вакцинировали интраназально трехкратно с интервалом в три недели. Пробы крови для оценки ответной выработки антител отбирали на сутки -1, 20, 41 и 63. Опытные группы и вакцинныe композиции

представлены в таблице 4.

Таблица 4

Группа	Возраст (месяцы)	День вакцинации	Путь введения	Доза НА на вакцинацию	Endocine <sup>TM</sup> (2%)	Количество мышей (n)
1 Immunose FLU (старые мыши)	15	0, 21 и 42	in	3 мкг	+	8
2 Неадьювантная вакцина (старые мыши)	15	0, 21 и 42	in	3 мкг	-	8
3 NaCl (старые мыши)	15	0, 21 и 42	in	-	-	4
4 Immunose FLU (молодые мыши)	2	0, 21 и 42	in	3 мкг	+	8

### Вакцинныепрепараты и введение

В данном опыте вакцина Immunose<sup>TM</sup> содержала: капли для интраназального введения, 300 мкг НА (H1N1/California/2009/мл + Endocine<sup>TM</sup> 20 мг/мл (2%).

Неадьювантная вакцина: капли для интраназального введения, содержащие 300 мкг НА (H1N1/California/2009/мл. NaCl: капли для интраназального введения, содержащие 0,9 масс.% соли хлорида натрия.

В данном опыте использовали четыре группы мышей-самок Balb/c. Три группы включали мышей в возрасте 15 месяцев в начале исследования (старые). В одну группу входили мыши в возрасте 2 месяцев в начале исследования (молодые). Мышей вакцинировали интраназальным введением 5 мкл композиции в каждую ноздрю. Доза вирусных частиц гриппа в каждой иммунизации составляла 3 мкг гемагглютинина (НА), 3 мкг НА в 2×5 мкл композиции. Мышей вакцинировали интраназально трехкратно с интервалом 3 недели на сутки 1, 21 и 42.

### Отбор и анализ проб

Пробы сыворотки крови отбирали на сутки -1, 20, 41 и 63. Пробы анализировали на ответную выработку антител, IgG, IgG1, IgG2a и IgA, на инактивированные расщепленные антигены вируса гриппа (сезон 2012/2013, как опубликовано ВОЗ, включая A/California/07/2009(H1N1)), с использованием ELISA.

Данные показали, что интраназальное введение Immunose<sup>TM</sup> Flu старым мышам приводило к повышению титров IgG1 по сравнению с мышами, получавшими неадьювантную вакцину. Кроме того, у старых мышей, вакцинированных Immunose<sup>TM</sup> Flu, ответную выработку специфических IgG1-антител детектировали на сутки 20 по сравнению с сутками 41 у старых мышей, получивших неадьювантную вакцину, как показано на фигуре 6а. На сутки 41 специфические IgG2a-антитела на вирус гриппа детектировали в сыворотке крови старых мышей, получавших Immunose<sup>TM</sup> Flu, на уровне, сравнимом с молодыми мышами, получавшими Immunose<sup>TM</sup> Flu, в то время как IgG2a-антитела, специфические к вирусу гриппа, не детектировали у старых мышей, получавших неадьювантную вакцину, как показано на фигуре 6б. Титры IgA-антител, специфических к вирусу гриппа, детектировали только у мышей, вакцинированных Immunose<sup>TM</sup> Flu, как показано на фигуре 6с.

В совокупности данные, полученные в настоящем опыте, показывают, что добавление Endocine<sup>TM</sup> к интраназальной противогриппозной вакцине приводило к повышению титров IgG и IgG1, специфических к вирусу гриппа, в сыворотке крови старых мышей

по сравнению с титрами, индуцированными интраназальной доставкой вакцины без Endocine<sup>TM</sup>. Кроме того, добавление Endocine<sup>TM</sup> способствовало индукции большего числа респондеров IgG2a и продукции более высоких титров IgG2a после двух и трех доз у старых мышей (число респондеров не показано). Повышение титра IgG2a показало, что вакцина Immunose<sup>TM</sup> Flu способна индуцировать ответную выработку антител Th1-типа. Кроме того, добавление Endocine<sup>TM</sup> в вакцину для старых мышей способствовало ответной выработке IgA. Общий анализ конечных титров IgG и IgG1 показывал достоверное различие между старыми и молодыми мышами, вакцинированными Immunose<sup>TM</sup> Flu, свидетельствуя о том, что старые мыши (в возрасте 15 месяцев в начале опыта) имели низкую иммунную способность, т.е. отвечали хуже на вакцинацию по сравнению с молодыми животными.

**Сокращения, использованные в примерах:**

HA - белок гемагглютинин вируса гриппа

TCID<sub>50</sub> - 50% инфекционная доза для тканевой культуры

PBMC - мононуклеарные клетки периферической крови

HI - анализ ингибиования гемагглютинации вируса гриппа

SOP - стандартная операционная процедура

PBS - забуференный фосфатом физиологический раствор

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

GMT - геометрические средние значения титров (использованные для выражения серологических данных)

FCS - фетальная телячья сыворотка (добавка в культуральную среду)

VN - анализ нейтрализации вируса

ДМСО - диметилсульфоксид

Таблица 5

		Группа <sup>a</sup>					
		1	2	3	4	5	6
Клинические баллы	Выживаемость	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6
	Лихорадка	1,7±0,6 (6/6)	1,1±0,4 (6/6)	1,3±0,3 (6/6)	1,2±0,6 (4/5*)	1,1±0,6 (6/6)	1,3±0,2 (6/6)
	Потеря массы тела	18,0±4,6 (6/6)	11,5±2,1 (6/6)	-2,2±2,6 (1/6)	1,7±1,5 (4/6)	2,7±3,3 (4/6)	4,7±3,1 (6/6)
Вирусология	Вирусная нагрузка в легких [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /г ткани]	5,7±0,5 (6/6)	5,5±0,9 (6/6)	≤1,5 (0/6)	≤1,4 (0/6)	≤1,3 (0/6)	≤1,3 (0/6)
	Вирусная нагрузка в носовых раковинах [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /г ткани]	7,2±2,4 (6/6)	6,9±1,5 (6/6)	≤1,9 (0/6)	≤1,7 (0/6)	≤1,7 (0/6)	4,1±2,7 (3/6)
	Вирусовыделение в мазках из носовой полости	2,6 (5/6)	1,2 (4/6)	0,058 (1/6)	0,0 (0/6)	0,0 (0/6)	1,4 (3/6)
	Вирусовыделение в мазках из горла	10 (6/6)	10 (6/6)	0,0 (1/6)	0,14 (1/6)	0,0 (1/6)	4,2 (5/6)
Макроскопическое патологическое обследование	Пораженная ткань легких [%]	50±25 (6/6)	37±21 (6/6)	8±4 (5/6)	7±5 (4/6)	7±5 (4/6)	8±4 (5/6)
	Относительная масса легких	1,5±0,5	1,3±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,2	0,9±0,1

Таблица 6

		Группа <sup>a</sup>					
		1	2	3	4	5	6
Гистопатология	Степень альвеолита/повреждения альвеол (баллы 0-3)	2,08±0,74 (6/6)	1,88±0,54 (6/6)	0,42±0,52 (3/6)	0,08±0,20 (1/6)	0,04±0,10 (1/6)	0,42±0,41 (4/6)
	Тяжесть альвеолита (баллы 0-3)	2,04±0,68 (6/6)	1,63±0,31 (6/6)	0,50±0,69 (3/6)	0,08±0,20 (1/6)	0,04±0,10 (1/6)	0,46±0,46 (4/6)

	Альвеолярный отек (% положительных стекол)	29±29 (4/6)	21±19 (4/6)	4±10 (1/6)	0±0 (0/6)	0±0 (0/6)	8±13 (2/6)
	Альвеолярные геморрагии (% положительных стекол)	21±40 (2/6)	17±26 (2/6)	0±0 (0/6)	0±0 (0/6)	0±0 (0/6)	0±0 (0/6)
	Пневмоцитарная гиперплазия типа II (% положительных стекол)	42±34 (4/6)	46±37 (4/6)	8±20 (1/6)	4±10 (1/6)	0±0 (0/6)	4±10 (1/6)

## (57) Формула изобретения

1. Применение композиции, содержащей один или более неживых антигенов вируса гриппа, выбранных из группы, состоящей из антигена цельного инактивированного вируса, расщепленного вируса, субъединичного антигена вируса гриппа и рекомбинантных антигенов, и адьювант, содержащий одну или более карбоновых кислот, водную среду и один или более моноглицеридов, в качестве вводимой интраназально вакцины, где указанная вакцина предназначена для иммунизации субъектов с ослабленным иммунитетом против гриппа для снижения вирусовыделения.
- 10 2. Применение по п.1, где субъекты с ослабленным иммунитетом представляют собой субъектов в возрасте  $\geq 65$  лет.
3. Применение по п.1, где субъекты с ослабленным иммунитетом представляют собой субъектов с ослабленным иммунитетом в педиатрии.
- 15 4. Применение по п.1, где неживой антиген вируса гриппа представляет расщепленный антиген.
- 20 5. Применение по п.1, где один или более моноглицеридов представляют глицериды,monoэстерифицированные карбоновыми кислотами, выбранными из группы, состоящей из лауриновой кислоты (C12), миристиновой кислоты (C14), пальмитиновой кислоты (C16), пальмитолеиновой кислоты (C16:1), олеиновой кислоты (C18:1), линолевой кислоты (C18:2), стеариновой кислоты, гексановой кислоты, каприловой кислоты, декановой кислоты (каприновой кислоты), арахidonовой кислоты, бегеновой кислоты, лигноцериновой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеарионовой кислоты, эйказапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, гамма-линоленовой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, эруциновой кислоты, нервоновой кислоты.
- 25 6. Применение по п.1, где один или более моноглицеридов представляют глицериды, monoэстерифицированные карбоновыми кислотами, выбранными из группы, состоящей из пальмитолеиновой кислоты (C16:1), олеиновой кислоты (C18:1) и линолевой кислоты (C18:2).
- 30 7. Применение по п.1, где один или более моноглицеридов представляет глицерид, моноэстерифицированный олеиновой кислотой (глицерилолеат).
8. Применение по п.1, где одна или более карбоновых кислот выбраны из группы, состоящей из лауриновой кислоты, миристиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, пальмитолеиновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, стеариновой кислоты, гексановой кислоты, каприловой кислоты, декановой кислоты (каприновой кислоты), арахиновой кислоты, бегеновой кислоты, лигноцериновой кислоты, альфа-линоленовой кислоты, стеарионовой кислоты, эйказапентаеновой кислоты, докозагексаеновой кислоты, гамма-линоленовой кислоты, дигомо-гамма-линоленовой кислоты, арахидоновой кислоты, эруциновой кислоты, нервоновой кислоты.
- 40 9. Применение по п.1, где одна или более карбоновых кислот выбраны из группы, состоящей из олеиновой кислоты и лауриновой кислоты.
- 45 10. Применение по п.1, где карбоновая кислота представляет олеиновую кислоту.
11. Применение по п.1, где адьювант включает глицерилолеат, олеиновую кислоту

и водную среду.

12. Применение по п.1, где вакцинная композиция содержит моноглицериды в количестве в пределах примерно от 0,1 г до примерно 5,0 г на 100 мл, или в пределах примерно от 0,1 г до примерно 2,0 г на 100 мл, или примерно от 0,5 г до примерно 2,0 г, например, от 0,5 г до примерно 1,5 г на 100 мл вакцинной композиции.

13. Применение по п.1, где вакцинная композиция содержит карбоновые кислоты в количестве в пределах примерно от 0,1 г до примерно 5,0 г на 100 мл, или в пределах примерно от 0,1 г до примерно 2,0 г на 100 мл, или примерно от 0,5 г до примерно 2,0 г, например, от 0,5 г до примерно 1,5 г на 100 мл вакцинной композиции.

14. Применение по п.1, где один или более моноглицеридов вместе с одной или более карбоновыми кислотами в адьювантной смеси находятся в количестве максимально 10% (мас./об.) или максимально 5% (мас./об.), или максимально 4% мас./об., или максимально 3% мас./об., или максимально 2% (мас./об.), или максимально 1% (мас./об.) от массы вакцины.

15. Применение по п.1, где субъекты с ослабленным иммунитетом выбраны из группы, состоящей из субъектов в возрасте  $\geq 65$  лет, беременных женщин, недоношенных младенцев и следующих групп пациентов: больных раком, субъектов, получающих химиотерапию, субъектов, подвергающихся лучевой терапии, пациентов с трансплантированными органами, субъектов, подвергающихся трансплантации

20 солидных органов, пациентов с трансплантированными стволовыми клетками, субъектов, подвергающихся аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, субъектов, подвергающихся аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, ВИЧ-инфицированных пациентов, субъектов со СПИДом, пациентов с синдромом трансплантат-против-хозяина, пациентов, находящихся на

25 иммуносупрессивных препаратах, например, получающих глюкокортикоидную терапию и стероидную терапию, субъектов с хроническими заболеваниями, например, с болезнью почек в терминальной стадии, диабетом, циррозом.

30

35

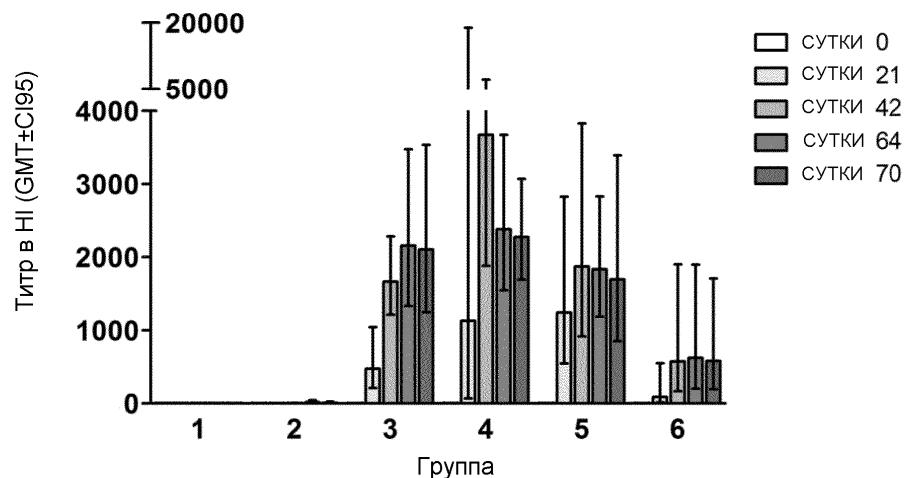
40

45

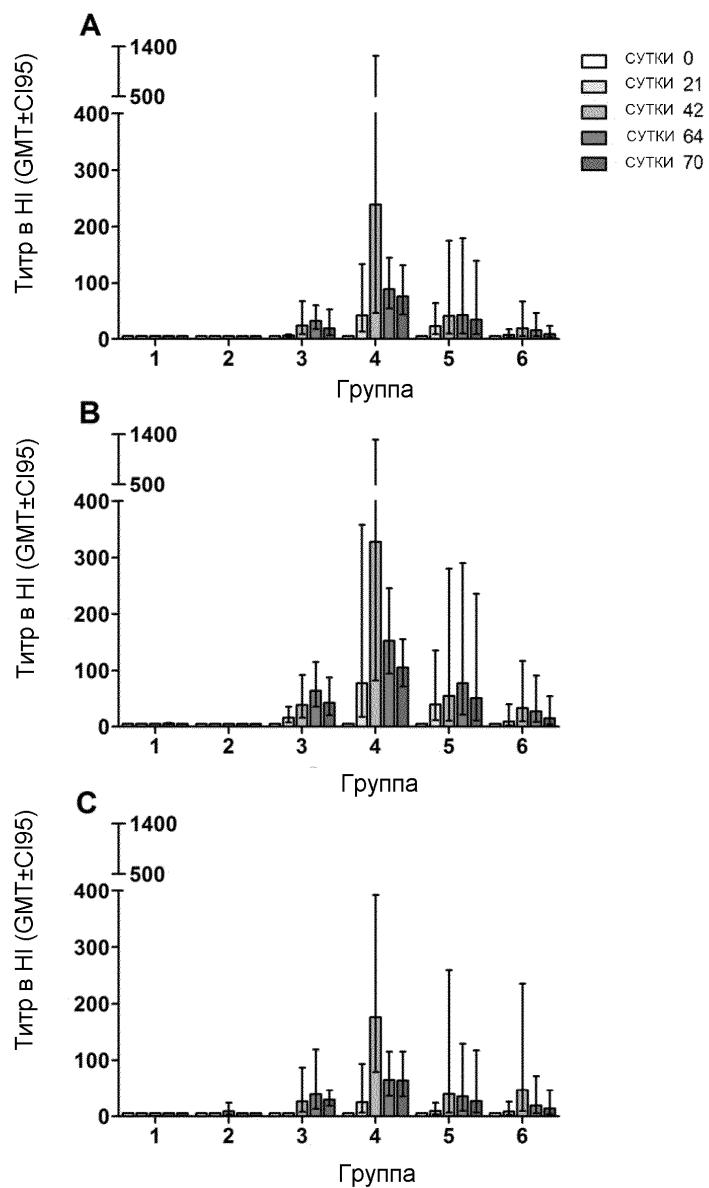
526066

1/7

ФИГ. 1

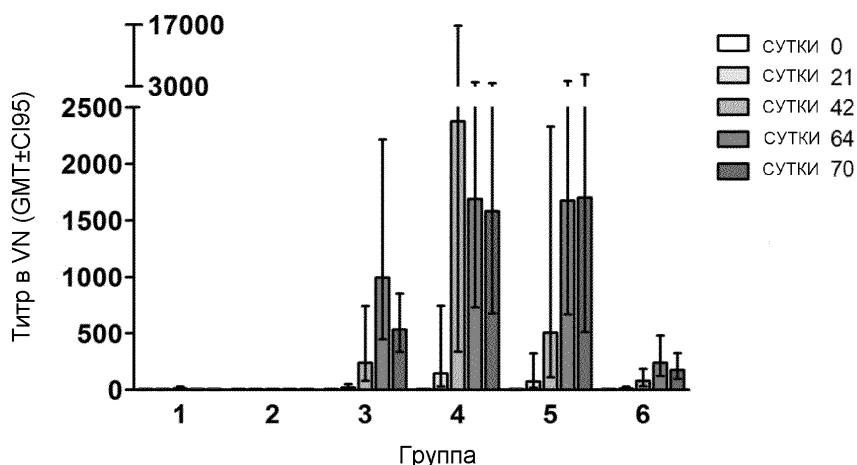


ФИГ. 2

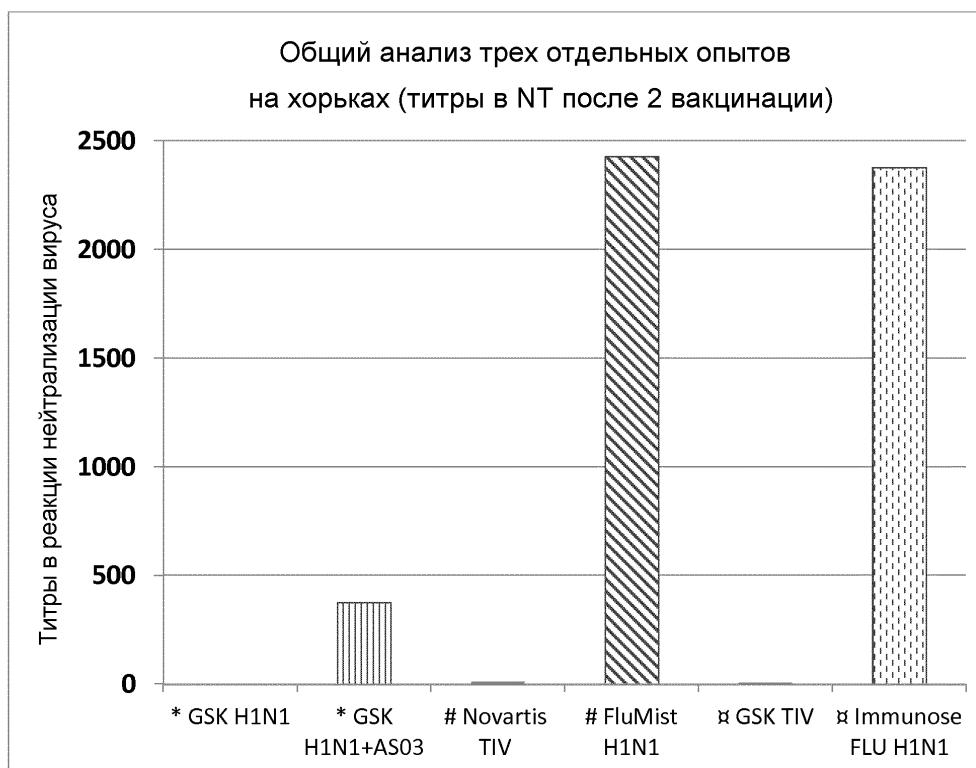


3/7

ФИГ. 3

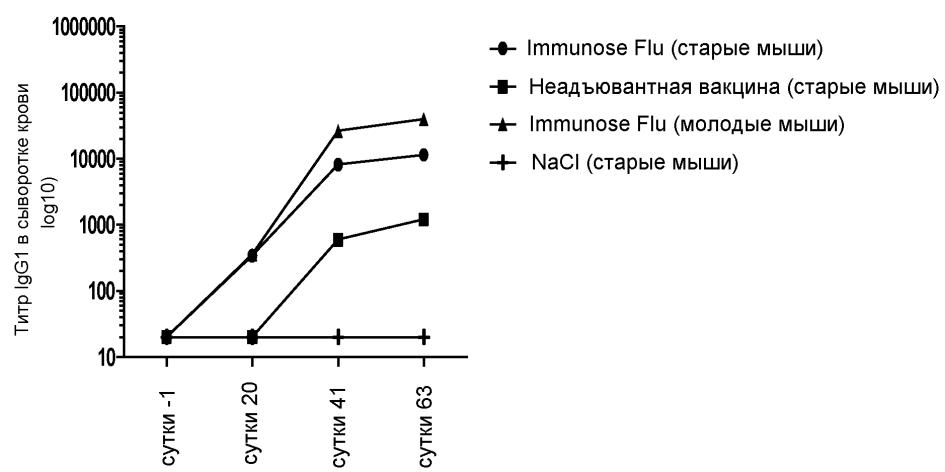


ФИГ. 4



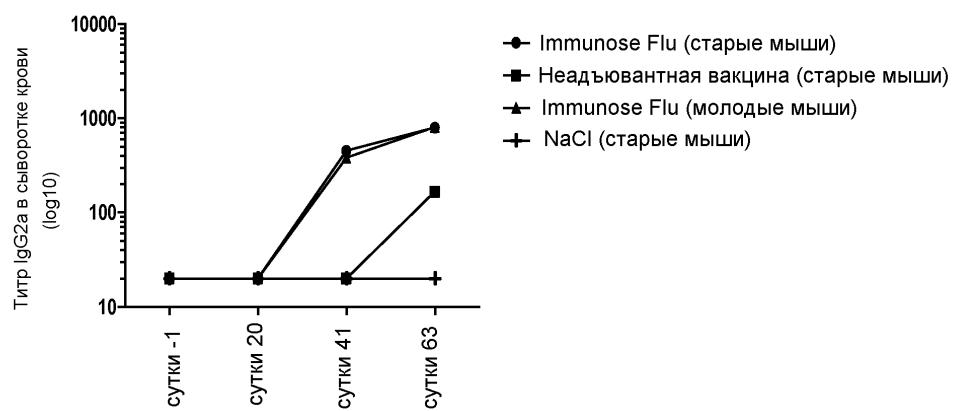
ФИГ. 5а

## Титр IgG1 во времени



ФИГ. 5b

## Титр IgG2a во времени



ФИГ. 5с

## Титр IgA во времени

