



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129245** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/22** (2006.01)  
**A61K 47/34** (2017.01)  
**A61K 47/38** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>a 2020 04101</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>03.12.2018</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>27.02.2025</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>62/595,842</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>07.12.2017</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>25.08.2020, Бюл.№ 16</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>26.02.2025, Бюл.№ 9</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2018/063541, 03.12.2018</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Райан Майкл С. (US), Мартін Шеррі-Енн П. (US), Джоунз Морріса (US), Станбро Джастін (US), Бгамбгані Актілеш (US), Блю Джеффри Томас (US), Пікслі Гайді Джоан (US), Грін-Трекслер Ерін Дж. (US), Ісопі Лінн Енн (US)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>МЕРК ШАРП ЕНД ДОУМ ЕЛЕЛСІ, 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065, United States of America (US)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>US 2016/0296616 A1, 13.10.2016 WO 2017/056101 A1, 06.04.2017 WO 2017/179017 A1, 19.10.2017 WO 2011/098837 A1, 18.08.2011 US 2012/219588 A1, 30.08.2012 US 2015/246114 A1, 03.09.2015 US 2003/180352 A1, 25.09.2003 US 2016/324783 A1, 10.11.2016 US 2016/199496 A1, 14.07.2016 US 2016/158248 A1, 09.08.2016</b></p>
---	--

UA 129245 C2

## (54) СКЛАД ВАКЦИННОЇ КОМПОЗИЦІЇ ВІД ВІРУСУ ДЕНГЕ

### (57) Реферат:

Винахід стосується складу вакцини від вірусу денге, які містять щонайменше один живий атенуйований вірус денге, буфер, сахарозу, похідне целюлози, лужну або лужноземельну сіль і амінокислоту.



## Галузь техніки

Даний винахід стосується складів вакцини від вірусу денге, які містять щонайменше один живий атенуований вірус денге або живий атенуований химерний флавівірус, буфер, цукор, похідне целюлози і цукровий спирт або гліколь і, необов'язково, амінокислоту і лужну або лужноземельну сіль; і складу вакцини від вірусу денге, які містять щонайменше один живий атенуований вірус денге або живий атенуований химерний флавівірус, буфер, цукор, щонайменше, 150 мг/мл, носій і, необов'язково, лужну або лужноземельну сіль або лужну або лужноземельну сіль і амінокислоту.

## Рівень техніки

Сімейство Flaviviridae включає прототип вірусу жовтої гарячки (YF), чотири серотипи віруси денге (DENV-1, DENV-2, DENV-3 і DENV-4), вірус японського енцефаліту (JE), вірус кліщового енцефаліту (TBE), вірус Західного Ніла (WN), вірус енцефаліту Сент-Луїс (SLE) і близько 70 інших вірусів, які викликають хвороби. Флавівіруси є маленькими вірусами в оболонці, які містять один геном з позитивною ниткою РНК. Десять генних продуктів кодовані однією рамкою зчитування і трансклюються у вигляді полібілка, організованого в порядку: капсид (С), "премембрана" (prM, яка обробляється до "мембрани" (M) безпосередньо перед виділенням віріону з клітини), "оболонка" (E), потім неструктурні (NS) білки NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b і NS5 (розглядаються в Chambers, T. J. et al., Annual Rev Microbiol (1990) 44:649-688; Henchal, E. A. and Putnak, J. R., Clin Microbiol Rev. (1990) 3:376-396). Окремі флавівірусні білки потім утворюються через точні події процесингу, медійовані хазяїном, а також кодовані вірусом протеази.

Оболонка флавівірусів утворюється з мембрани клітини-хазяїна і містить кодовану вірусом мембрану, закріплену на мембрані (M), і глікопротеїни оболонки (E). Глікопротеїн E є найбільшим вірусним структурним білком і містить функціональні домени, відповідальні за приєднання до поверхні клітини, і інтра-ендосомальні злиті активності. Він також є основною метою імунної системи хазяїна, спричиняючи утворення антитіл, які нейтралізують вірус, які асоційовані із захисним імунітетом.

Віруси денге передаються людині комарами роду *Aedes*, насамперед, *A. aegypti* і *A. albopictus*. Зараження вірусами денге призводить до різної клінічної практики від неочевидного або помірного гарячкового захворювання, через класичну гарячку денге (DF) до геморагічної гарячки денге/шокового синдрому денге (DHF/DSS). Гарячка денге характеризується високою температурою, болем у суглобах і м'язах, висипом, лімфаденопатією і лейкопенією (Gibbons, R. V. and D. W. Vaughn, British Medical Journal (2002) 324:1563-1566). DHF/DSS є більш важкою формою інфекції, що найчастіше виникає у дітей, відміченою судинною проникністю і/або важкими геморагічними виявами, що варіюють від присутності петехії і синців до спонтанного важкого крововиливу і глибокого шоку. Без діагностики і швидкого медичного втручання несподіване настання і швидкий розвиток DHF/DSS можуть бути смертельним за відсутності лікування.

Віруси денге є найбільш значною групою вірусів, що передаються членистоногими, у значенні глобальної захворюваності і смертності при близько ста мільйонах випадків інфекції денге щорічно, які включають, щонайменше, 36 мільйонів випадків гарячки і 250000-500000 випадків DHF/DSS (Gubler, D. J., Clin. Microbiol. Rev. (1998) 11:480-496; Gibbons, supra). У зв'язку з глобальним зростанням населення, урбанізацією населення, особливо в тропіках, і відсутністю стійких заходів боротьби з комарами, комарі-переносники денге розширили своє поширення в тропіках, субтропіках і деяких помірних областях, що привело до ризику зараження денге для більше половини населення світу. Сучасне пересування на реактивних літаках і еміграція людей сприяли глобальному поширенню серотипів денге так, що множинні серотипи денге зараз є ендемічними в багатьох регіонах. Є збільшення частоти епідемій денге і випадків DHF/DSS останні 20 або більше років. Наприклад, у Південно-Східній Азії DHF/DSS є провідною причиною госпіталізації і смерті серед дітей (Gubler, вище; Gibbons and Vaughn, вище).

Зараз розвиток вакцин від флавівірусів досягається зі змінним успіхом. Існує чотири основні підходи, які використовують у спробі отримати можливі вакцини для захисту від захворювання, викликаного флавівірусами: живий атенуований, інактивований нативний вірус, рекомбінантний субодичинний білок і вакцини на основі ДНК. Жива атенуована вакцина від вірусу жовтої гарячки доступна протягом десятиріч, і останнім часом жива послаблена вакцина від японського енцефаліту була зареєстрована в різних країнах світу. Застосування вакцин на основі інактивованих нативних вірусів було продемонстроване для вірусів TBE і JE у вигляді кількох доступних зареєстрованих продуктів. Heinz et al. Flavivirus and flavivirus vaccines. Vaccine 30: 4301-06 (2012).

Незважаючи на успіх вакцин від YF, JE і TBE, описаних вище, використання способів живого

атенуйованого вірусу і інактивованого вірусу для розробки вакцина від вірусу денге зіткнулося зі значними труднощами. Існує чотири серотипи віруси денге (DENV1, DENV2, DENV3 і DENV4), і було виявлено, що штами кожного серотипу циркулюють по всіх ендемічних денге регіонах у всьому світі. Природна інфекція надає довготривалий імунітет до інфікуючого серотипу, але не до інших серотипів денге. Більш важкі форми захворювання (DHF/DSS) виникають найчастіше після вторинної інфекції денге, коли після зараження одним серотипом вірусу денге слідує друге зараження іншим серотипом. Вважається, що більш частий зв'язок DHF і DSS зі вторинним зараженням денге виникає через не нейтралізуючі антитіла, що викликані зараженням вірусом одного типу, які посилюють інфекційність другим типом вірусу денге (антитіло-залежне посилення - АЗП).

Зараз більшістю вакцин, які клінічно тестуються, є живі, послаблені вакцини. Використання інактивованих можливих вакцин також вивчене. Наприклад, в Ivy et al. (патент США 6,432,411) описана чотиривалентна субдинична вакцина, яка містить DEN1-4 80 % E (пептидна ділянка DEN1-4, що відповідає амінокислотам 1-395 DENV-2 поліпептиду в оболонці) білки. В Ivy et al, вище, також описані композиції, які містять DENV 1-4 80 % E і ад'ювант ISCOMATRIX®. У Collier et al. (WO 2012/154202) описані чотиривалентні склади, що містять DEN1-4 80 % E з DEN 1-4. Інактивовані віруси також можуть використовуватися як потенційні кандидатні вакцини або як компоненти ефективної вакцини (Putnak et al. Vaccine 23: 4442-4452 (2005), US 6190859, US 6254873 і Sterner et al. WO 2007/002470). Композиції, що містять живу атенуйовану вакцину від вірусу денге і інактивовану вакцину від денге, описані в Міжнародній заявці на патент № PCT/US14/042625 (WO2014/204892).

Нативні віруси є одними з найбільш часто використовуваних антигенів у кількох вакцинних продуктах через їх здатність викликати гуморальні і клітинні імунні відповіді. Вакцинні продукти, які містять нативні віруси, складно стабілізувати, оскільки вони чутливі до тепла, заморожування/розморожування і інших стресів під час обробки, що призводить до значних втрат ефективності. Ці продукти звичайно зберігають замороженими (нижче -20 °C) або у вигляді висушеного порошку. Заморожені продукти нелегко зберігати і розповсюджувати, оскільки вони вимагають суворої відповідності вимогам холодового ланцюга для запобігання втраті ефективності. Сушіння нативних вірусів, особливо оболонкових вірусів, часто призводить до значних втрат ефективності через стреси заморожування і сушіння, що зустрічаються у процесі сушіння. Тому в даній галузі техніки існує необхідність у створенні стабільних складів вірусу денге.

Суть винаходу

Даний винахід стосується стабільних складів живої атенуйованої вакцини денге. Додавання похідного целюлози і цукрового спирту або гліколю поліпшує стабільність і/або вихід після сушіння. Альтернативно, додавання цукру у кількості щонайменше 150 мг/мл поліпшує стабільність і/або вихід після мікрохвильового сушіння.

У одному аспекті винахід стосується складу, який містить живу атенуйовану вакцину денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус (ЖАХВ), буфер при рН від близько 6,5 до 8,5, цукор, гліколь або цукровий спирт і похідне целюлози, вибране з групи, яка складається з карбоксиметилцелюлози, гідроксипропілцелюлози (ГПЦ), гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ), 2-гідроксietилцелюлози (2-ГЕЦ), кроскармелози і метилцелюлози або їх фармацевтично прийнятної солі; необов'язково лужну або лужноземельну сіль і, необов'язково, амінокислоту, вибрану з групи, яка складається з Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro або Glu, або їх поєднання.

У одному варіанті буфер вибирають із групи, яка складається з сукцинату, гістидину, фосфату, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, ацетату і цитрату, або їх поєднання. У іншому варіанті лужною або лужноземельною сіллю є хлорид магнію, хлорид кальцію, хлорид калію, хлорид натрію або їх поєднання. У додатковому варіанті цукром є трегалоза або сахароза. У одному варіанті похідним целюлози є фармацевтично прийнятна сіль карбоксиметилцелюлози. У іншому варіанті гліколь вибирають з групи, яка складається із пропіленгліколю, поліпропіленгліколю, етиленгліколю, поліетиленгліколю і монометиллових ефірів поліетиленгліколю. У додатковому варіанті цукровим спиртом є гліцерин.

У іншому аспекті склад містить живу атенуйовану вакцину денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус у кількості приблизно 100-10000000 БУО/мл, буфер при рН від приблизно 6,5 до 8,5, приблизно 50-300 мг/мл цукру, приблизно 2,5-10,0 мг/мл пропіленгліколю (ПГ) або гліцерину, і приблизно 0,3-10 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію (КМЦ натрію), необов'язково приблизно 10-150 мМ NaCl і, необов'язково, приблизно 10-100 мМ амінокислоти,

вибраної з групи, яка складається з Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro або Glu, або їх комбінацію; живу атенуйовану вакцину денге у кількості приблизно 100-100000 БУО/мл, приблизно 5-300 мМ гістидину, TRIS, Bis-Tris або фосфатний буфер, або їх комбінацію при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 50-300 мг/мл цукру, приблизно 3-10 мг/мл пропіленгліколю або гліцерину і приблизно 3-10 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, необов'язково, приблизно 15-75 мМ NaCl, і, необов'язково приблизно 10-75 мМ амінокислоти, вибраної з групи, яка складається з Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro або Glu, або їх комбінацію; живу атенуйовану вакцину денге при приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 5-300 мМ буферу на основі фосфату калію при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 60-120 мг/мл сахарози або трегалози або їх комбінації, приблизно 3-7 мг/мл пропіленгліколю або гліцерину, і приблизно 3-7 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію зі середньою молекулярною масою приблизно 90000, і приблизно 30-90 мМ NaCl, і необов'язково приблизно 10-75 мМ амінокислоти Leu, Lys або Glu, або їх комбінацію; живу атенуйовану вакцину денге при приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 11 мМ буферу на основі фосфату калію при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 90 мг/мл сахарози, приблизно 5 мг/мл пропіленгліколю або гліцерину, приблизно 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію зі середньою молекулярною масою приблизно 90,000, і приблизно 75 мМ NaCl; живу атенуйовану вакцину денге при приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 11 мМ буфер на основі фосфату калію при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 90 мг/мл сахарози, приблизно 5 мг/мл пропіленгліколю, приблизно 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію зі середньою молекулярною масою приблизно 90000, приблизно 50 мМ NaCl, і приблизно 25 мМ Leu; живу атенуйовану вакцину денге при приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 11 мМ буферу на основі фосфату калію при рН приблизно 7,5, приблизно 90 мг/мл сахарози, приблизно 5 мг/мл пропіленгліколю, приблизно 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію зі середньою молекулярною масою приблизно 90000, і приблизно 30 мМ NaCl. У одному аспекті представлених вище варіантів склад додатково містить приблизно 90-200 мг/мл трегалози.

У переважному варіанті винаходу склад містить живу атенуйовану вакцину денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус у кількості приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 11 мМ буферу на основі фосфату калію при рН приблизно 7,5-8, приблизно 90 мг/мл сахарози, приблизно 110 мг/мл трегалози, приблизно 5 мг/мл пропіленгліколю, приблизно 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію зі середньою молекулярною масою приблизно 90000, приблизно 50 мМ NaCl і приблизно 25 мМ Leu. У одному аспекті представлених вище варіантів склад додатково містить поверхнево-активну речовину, вибрану з полоксамеру 188 і полоксамеру 407 при приблизно 0,0001-5 % мас./об.

Винахід також стосується складу, який містить живу атенуйовану вакцину денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус у кількості приблизно 100-10000000 БУО/мл, буфер при рН приблизно 6,5-8,5, цукор у кількості приблизно 150-300 мг/мл, носій, вибраний з групи, яка складається з полівінілпіролідону (ПВП), карбоксиметилцелюлози, гідроксипропілцелюлози (ГПЦ), гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ), 2-гідроксіетилцелюлози (2-ГЕЦ), кроскармелози, метилцелюлози або їх фармацевтично прийнятної солі, людського сироваткового альбуміну (ЛСА) і желатину; необов'язково, лужну сіль або лужноземельну сіль у кількості приблизно 5-100 мМ; необов'язково, амінокислоту Gln, Pro або Glu, або їх комбінацію.

У одному варіанті буфер вибирають з групи, яка складається з сукцинату, гістидину, фосфату, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, ацетату і цитрату, або їх комбінації. У іншому варіанті лужною або лужноземельною сіллю є хлорид магнію, хлорид кальцію, хлорид калію, хлорид натрію або їх комбінація. У додатковому варіанті цукром є трегалоза або сахароза, або їх комбінація. У одному варіанті відношення сахарози до трегалози становить 1:1-1:4. В іншому варіанті носієм є карбоксиметилцелюлоза натрію, ГПМЦ, ЛСА або желатин.

У іншому аспекті винахід стосується складів живої атенуйованої вакцини денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус у кількості приблизно 200-100000 БУО/мл, буфер при рН приблизно 6,5-8,0, приблизно 150-300 мг/мл цукру у вигляді комбінації сахарози і трегалози, приблизно 0,3-40 мг/мл КМЦ натрію, ЛСА, ГПМЦ або желатину, необов'язково, приблизно 10-100 мМ лужної або лужноземельної солі, і, необов'язково приблизно 5-25 мМ глутамінової кислоти; живу атенуйовану вакцину денге у кількості приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 5-300 мМ гістидину, TRIS або фосфатного буферу або їх поєднання при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 50-100 мг/мл сахарози, приблизно 90-200 мг/мл трегалози, приблизно 0,3-10 мг/мл КМЦ натрію або приблизно 10-40 мг/мл желатину, і приблизно 30-90 мМ лужної або лужноземельної солі; живу атенуйовану вакцину денге у кількості приблизно 600-20000 БУО/мл,

приблизно 5-20 мМ фосфату калію при рН приблизно 7-8, приблизно 75 мг/мл сахарози, приблизно 175 мг/мл трегалози, приблизно 5 мг/мл КМЦ натрію зі середньою молекулярною масою приблизно 90000, і приблизно 30 мМ NaCl; живу атенуйовану вакцину денге у кількості приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 5-20 мМ фосфату калію при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 75 мг/мл сахарози, приблизно 175 мг/мл трегалози, приблизно 25 мг/мл желатину і приблизно 30 мМ NaCl; живу атенуйовану вакцину денге у кількості приблизно 600-20000 БУО/мл, приблизно 5-20 мМ фосфату калію при рН приблизно 7,0-8,0, приблизно 250 мг/мл сахарози і приблизно 50 мг/мл ПВП К12. У одному аспекті представлених вище варіантів, склад додатково містить поверхнево-активну речовину, вибрану з полоксамеру 188 і полоксамеру 407 у кількості приблизно 0,0001-5 % мас./об.

У деяких аспектах представлених вище варіантів склад додатково містить алюмінієвий ад'ювант. Вказані вище склади можуть бути заморожені або ліофілізовані, або відновлені у розчині. У одному варіанті відновлення проводять приблизно 0,5-1,0 мл фізіологічного розчину, води або бактеріостатичної води для ін'єкцій (БВДІ) і, необов'язково, розріджувачем, що містить алюмінієвий ад'ювант. У іншому варіанті складом є водний розчин до ліофілізації або мікрохвильового сушіння у вакуумі.

У одному варіанті жива послаблена вакцина денге містить чотиривалентний живий атенуйований вірус денге або живий атенуйований химерний флавівірус. У іншому варіанті ЖАВ або ЖАХВ містить вірусний геном, який містить делецію приблизно 30 нуклеотидів, що відповідає TL-2 структурі петля на стеблі 3' нетрансльованої (НТР) ділянки; який знижує реплікативну здатність вірусу. У додатковому варіанті живим атенуйованим вірусом денге є ЖАВ, який містить вірусний геном, який містить делецію приблизно 30 нуклеотидів, що відповідає TL-2 структурі петля на стеблі 3' нетрансльованої (НТР) ділянки, і є імуногенним проти серотипу денге 3, де вірусний геном ЖАВ додатково містить делецію нуклеотидів проти ходу транскрипції від  $\Delta 30$  делеції, що відповідає TL-3 структурі 3'НТР.

У переважних варіантах винаходу живою атенуйованою вакциною денге є жива атенуйована чотиривалентна вакцина, яка містить DEN1 $\Delta$ 30 вірус, DEN2/4 $\Delta$ 30 вірус (DEN2  $\Delta$ 30ЖАХВ на DEN4 кістяку), DEN3 $\Delta$ 30 вірус і DEN4 $\Delta$ 30 вірус. У іншому переважному варіанті живим атенуйованим вірусом денге є ЖАВ, який містить rDEN1 $\Delta$ 30-1545, rDEN2/4 $\Delta$ 30 (ME)-1495,7163, rDEN3 $\Delta$ 30/31-7164 і rDEN4 $\Delta$ 30-7132,7163,8308.

Короткий опис креслень

ФІГ. 1: Дія КМЦ натрію, ПГ, амінокислот на DENV4 вихід ліофілізації для DEN4 складів.

ФІГ. 2: Дія КМЦ натрію, ПГ, амінокислот на DENV4 стабільність для DEN4 складів. Склад 26 (\*) не тестують через руйнування коржика після зберігання при 25 °С.

ФІГ. 3: Дія цукрового спирту на DENV4 вихід ліофілізації для DEN4 складів.

ФІГ. 4: Дія цукрового спирту на DENV4 стабільність для DEN4 складів.

ФІГ. 5: Дія рН на DENV4 вихід ліофілізації для DEN4 складів.

ФІГ. 6: Дія рН на DENV4 стабільність для DEN4 складів.

ФІГ. 7: Дія буферу на DENV4 вихід ліофілізації для DEN4 складів.

ФІГ. 8: Дія буферу на DENV4 стабільність для DEN4 складів.

ФІГ. 9: Дія NaCl концентрації на DENV4 вихід ліофілізації для DEN4 складів.

ФІГ. 10: Дія NaCl концентрації на DENV4 стабільність для DEN4 складів.

ФІГ. 11: Дія пропіленгліколю і гліцерину на вихід ліофілізації серотипів Денге.

ФІГ. 12: Дія пропіленгліколю і гліцерину на стабільність серотипів Денге.

ФІГ. 13: Дія L-15 концентрації на відносну ефективність заморожених, висушених мікрохвилями (МХС) і ліофілізованих (ліо.) DEN1 складів.

ФІГ. 14: Дія L-15 концентрації на відносну ефективність заморожених, висушених мікрохвилями (МХС) і ліофілізованих (ліо.) DEN2 складів.

ФІГ. 15: Дія L-15 концентрації на відносну ефективність заморожених, висушених мікрохвилями (МХС) і ліофілізованих (ліо.) DEN3 складів.

ФІГ. 16: Дія L-15 концентрації на відносну ефективність заморожених, висушених мікрохвилями (МХС) і ліофілізованих (ліо.) DEN4 складів.

ФІГ. 17: Відносна ефективність заморожених, висушених мікрохвилями (МХС) і ліофілізованих (ліо.) DEN1 складів.

ФІГ. 18A- B: А) Стабільність чотиривалентних складів при 37 °С через один тиждень. В) Стабільність чотиривалентних складів при 25 °С через один місяць.

ФІГ. 19A-D: Стабільність чотиривалентних складів (DEN1-DEN4) при 2-8 °С, тестована кожні 3 місяці аж до 18 місяців.

Детальний опис винаходу

В описі і в прикладеній формулі винаходу форми в однині включають посилання на

множину, якщо контекст явно не наказує на інше.

Посилання на "або" вказує одну або обидві можливості, якщо контекст явно не диктує одну зі вказаних можливостей. У деяких випадках "і/або" використовують для виділення однієї або обох можливостей.

5 Термін "приблизно", при модифікації кількості (наприклад, мМ або М) речовини або композиції, частки (об./об. або мас./об.) компоненту складу, рН розчину/складу, значення параметра, що характеризує стадію у способі, або подібного, стосується зміни чисельної кількості, яка може виникнути, наприклад, при типовому вимірюванні, маніпуляціях і відборі зразків, що застосовуються при приготуванні, характеристикації і/або застосуванні речовини або композиції; при інструментальній помилці в цих методиках; при різницях у виробництві, джерелі або чистоті інгредієнтів, що застосовуються для отримання або застосування композицій, або проведених методик; і подібних. У певних варіантах, "приблизно" може означати зміну на  $\pm 0,1\%$ ,  $0,5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$ ,  $3\%$ ,  $4\%$ ,  $5\%$  або  $10\%$ .

10 Термін "об'ємоутворювальні агенти" включає агенти, які забезпечують структуру сублімованого продукту. Звичайні приклади, що використовуються для об'ємоутворювальних агентів, включають маніт, гліцин і лактозу. На доповнення до отримання фармацевтично естетичного коржика, об'ємоутворювальні агенти можуть також надавати корисні властивості відносно зміни температури руйнування, забезпечення захисту від замерзання-розморожування і підвищення стабільності білка протягом тривалого зберігання. Ці агенти також можуть служити модифікаторами тоничності.

15 "Посилальний зразок вірусу денге" має той же склад компонентів вірусу денге і співвідношення компонентів, як і зразок складу вірусу денге, що тестується, і стосується твердої композиції відразу ж після сушіння складу вірусу денге в тих же умовах, що і зразок складу вірусу денге, що тестується (тобто ліофілізація, сушіння мікрохвилями, сушіння ліосферами), або вказаної вище висушеної твердої композиції, яка зберігається в умовах, де є відсутність або мінімальна втрата інфекційності вірусу денге (тобто зберігається при або нижче  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); або замороженого твердого складу вірусу денге при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

"Гліколь" стосується хімічної сполуки з двома гідроксильними групами.

20 "Втрата інфекційності" стосується порівняння втрати вірусної реплікації зразка вірусу денге, що тестується, до посилального зразка вірусу денге із застосуванням способів, відомих у даній галузі техніки. В одному варіанті втрату інфекційності вимірюють із застосуванням аналізу відносної інфекційності денге. У іншому варіанті втрату інфекційності вимірюють із застосуванням аналізу бляшкоутворення.

25 Терміни "ліофілізація", "ліофілізований" і "сублімований" стосується способу, який продукт сушить спочатку заморожуванням з подальшим видаленням льоду або замороженого розчинника сублімацією у вакуумному середовищі. Експіріент може бути доданий у складі перед ліофілізацією для поліпшення стабільності ліофілізованого продукту при зберіганні.

30 "Ліосфера" в даному описі стосується висушених заморожуванням єдиних тіл, які містять терапевтично активний агент, який по суті є сферичним або яйцеподібним. У деяких варіантах діаметр ліосфери становить від приблизно 2 до приблизно 12 мм, переважно, від 2 до 8 мм, наприклад, від 2,5 до 6 мм або від 2,5 до 5 мм. У деяких варіантах об'єм ліосфери становить від приблизно 20 до 550 мкл, переважно, від 20 до 100 мкл, наприклад, від 20 до 50 мкл. У варіантах, де ліосфера по суті не є сферичною, розмір ліосфери може бути описаний відносно її співвідношення сторін, яке являє собою відношення найбільшого розміру до найменшого розміру. Співвідношення сторін ліосфер може становити від 0,5 до 2,5, переважно, від 0,75 до 2, наприклад, від 1 до 1,5.

35 "Вакуумне сушіння мікрохвилями" в даному описі стосується способу сушіння, при якому використовують опромінення мікрохвилями (також відоме як радіаційна енергія або неіонізуюче опромінення) для утворення висушених вакцинних продуктів (переважно,  $<6\%$  вологи) вакцинного складу сублімацією. У деяких варіантах мікрохвильове сушіння проводять, як описано в US2016/0228532. У одному варіанті мікрохвильове опромінення проводять у форматі хвиль, які розповсюджуються.

40 "Відновленим розчином" є такий, який отриманий розчиненням висушеного вірусу у твердій формі (такій як ліофілізований коржик) в розріджувачі так, що вірус диспергується у відновленому розчині. Відновлений розчин підходить для введення (наприклад, внутрішньом'язового введення), і необов'язково може підходити для підшкірного введення.

45 "Сіль(солі)" у даному описі означають кислі солі, отримані з неорганічними і/або органічними кислотами, а також основні солі, отримані з неорганічними і/або органічними основами. Фармацевтично прийнятні (тобто не токсичні, фізіологічно прийнятні) солі є переважними, хоча 50 інші солі також використовують. Типові основні солі включають солі амонію, солі лужних 60

металів, такі як солі натрію, літію і калію, солі лужноземельних металів, такі як солі кальцію і магнію, солі цинку, солі з органічними основами (наприклад, органічні аміни), такі як N-Me-D-глюкамін, холін, трометамін, дициклогексиламіни, тре-бутиламіни і солі з амінокислотами, такими як аргінін, лізин і тому подібне.

5 "Цукровий спирт" стосується багатоатомних спиртів, які отримані з цукру і мають загальну формулу  $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  або 10. Приклади включають, але не обмежені ними, маніт, сорбіт, еритрит, ксиліт і гліцерин.

У даному описі "x % (мас./об.)" еквівалентно x г/100 мл (наприклад, 5 % мас./об. дорівнює 50 мг/мл).

10 Термін "живий атенуйований вірус денге", який також називається тут "ЖАВ", означає знижену здатність вірусу денге спричиняти захворювання порівняно з диким типом вірусу денге. Фахівець у даній галузі техніки зрозуміє, що віруси можуть піддаватися мутації при культивуванні, пасируванні або поширенні. ЖАВ може містити природні мутації, на доповнення до мутацій, викликаних у цілях клонування. ЖАВ може бути гомогенною або гетерогенною

15 Термін "живий атенуйований химерний вірус" (альтернативно, "живий атенуйований химерний флавівірус") або "ЖАХВ" стосується живого послабленого химерного вірусу, де вірусний геном містить кістяк першого флавівірусу (включаючи С, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B і NS5 гени) і передмембранний (prM) і оболонковий (Е) гени другого флавівірусу, де

20 другий флавівірус вибирають з DENV1, DENV2, DENV3 або DENV4. Першим флавівірусом може бути відмінний серотип денге або інший флавівірус, такий як вірус жовтої гарячки.

Термін " $\Delta 30$  ЖАВ" стосується живого атенуйованого DEN1, DEN2, DEN3 або DEN4 вірусу, де ЖАВ містить вірусний геном, який містить делецію приблизно 30 нуклеотидів (nt), що відповідає

25 TL2 структурі петля на стеблі 3' нетрансльованої (НТР) ділянки від приблизно nt 143 до приблизно nt 172, що знижує реплікативну здатність вірусу (див. WO 03/092592 і Whitehead et al., патент США № 8,337,860).

Термін " $\Delta 30$  ЖАХВ" стосується живого атенуйованого химерного флавівірусу (ЖАХВ) з DENV 1-4, де ЖАХВ містить вірусний геном, який містить делецію приблизно 30 nt, що

30 відповідає TL2 структурі петля на стеблі 3' нетрансльованої (НТР) ділянки від приблизно nt 143 до приблизно nt 172, що знижує реплікативну здатність вірусу (див. WO 03/092592 і Whitehead et al., патент США № 8,337,860).

Термін " $\Delta 30/\Delta 31$  ЖАВ" стосується живого атенуйованого DEN1, DEN2, DEN3 або DEN4 вірусу, де вірусний геном містить делецію приблизно 30 nt в TL2 структурі петля на стеблі 3' НТР, і додатково містить окрему делецію, яка не сполучається, проти ходу транскрипції

35 приблизно 31 nt на приблизно nt 258-228 3' НТР, яка видаляє послідовність аж до, і включаючи TL-3 гомологічну структуру так, що делеція розповсюджується до 5' межі TL-3 гомологічної структури денге 3'НТР. Див. Whitehead et al., патент США 8,337,860. У переважних варіантах винаходу, DEN3 ЖАВ містить  $\Delta 30/\Delta 31$  мутації.

Термін " $\Delta 30/\Delta 31$  ЖАХВ" стосується живого атенуйованого химерного DEN1, DEN2, DEN3

40 або DEN4 вірусу, як описано вище, де вірусний геном химерного вірусу містить 30 nt делецію TL2 структури петля на стеблі 3' НТР, і додатково містить окрему делецію, яка не сполучається, проти ходу транскрипції 31 nt 3' НТР, яка видаляє TL-3 структуру, як описано вище.

Термін "ЖАЧВ" або "жива послаблена чотиривалентна вакцина денге" або "ЖАЧВ вакцина"

45 стосується вакцини, яка містить ефективну кількість DEN1 ЖАВ або ЖАХВ, DEN2 ЖАВ або ЖАХВ, DEN3 ЖАВ або ЖАХВ і DEN4 ЖАВ або ЖАХВ. У одному варіанті щонайменше один з ЖАВ або ЖАХВ денге містить  $\Delta 30$  мутацію TL-2 структури в 3' НТР, як описано вище і в WO 03/092592. У деяких переважних варіантах ЖАЧВ містить наступні ознаки: (1) rDEN1 $\Delta 30$ , який є DENV1 ЖАВ, де DENV1 вірусний геном містить 30 nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР; (2) rDEN2/4 $\Delta 30$ , який є DENV2 ЖАХВ, що містить DENV2 prM і Е гени на DENV4 кістяку, де DEN4 кістяк містить 30-nt делеції, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР; (3) rDEN3 $\Delta 30/\Delta 31$ , який є DENV3 ЖАВ, де DENV3 вірусний геном містить 30 nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР і окрему делецію, яка не сполучається, проти ходу транскрипції 31 nt, що відповідає TL-3 структурі 3' НТР; і (4)

50 rDEN4 $\Delta 30$ , який є DENV4 ЖАВ, де DENV4 вірусний геном містить 30 nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР (див. Фігуру 1 з WO2016106107).

"Нереплікаційна вакцина" стосується вакцини від вірусу денге для профілактики або лікування зараження вірусом денге або його клінічних симптомів, вибраної з рекомбінантної субодиночної вакцини, інактивованої вакцини, кон'югованої вакцини або ДНК вакцини.

60 "Інактивована вакцина" стосується вакцини, яка містить ефективну кількість убитого або не активного цільного вірусу денге і фармацевтично прийняттого носія, де вірус інактивований

будь-якими засобами, включаючи хімічні сполуки, тепло або опромінення. Інактивована вакцина має низьку залишкову інфекційність після інактивації, наприклад <5 бляшкоутворювальних одиниць (БУО)/мл після інактивації. У переважних варіантах є дуже низька кількість залишкової інфекційності після інактивації, наприклад  $\leq 4$  БУО/мл,  $\leq 3$  БУО/мл або  $\leq 2$  БУО/мл, <1 БУО/мл,  $\leq 0,5$  БУО/мл або  $\leq 0,1$  БУО/мл. БУО конкретної вакцини може бути визначено, наприклад, з використанням аналізу бляшкоутворення, аналізу імунозабарвленням або іншого способу, відомого в даній галузі техніки для визначення інфекційності вірусу.

"Кон'югована вакцина" стосується вакцини, яка містить денге антиген, ковалентно приєднаний до білка-носія.

"ДНК вакциною" є вакцина, яка містить послідовність нуклеотидів, яка кодує антиген білка денге, включаючи білки денге, фрагменти білка денге і злиті білки денге, і їх варіанти. ДНК вакцини містять плазмід (наприклад, ДНК або вірусний плазмід), який містить послідовність нуклеотидів, які кодують цільовий антиген, функціонально зв'язаний з промотором.

"Субодинична вакцина" стосується вакцини, яка включає один або більше компонентів антигену денге, але не повні віруси денге, таких як імуногенні епітопи денге, білки денге, злиті білки антигену денге, включаючи злиття антигенів різних серотипів денге, або фрагменти білка денге. Субодиничні вакцини в даному описі можуть бути одновалентними (містити один антиген денге) або мультивалентними (містити більше одного компоненту антигену). У переважних варіантах субодинична вакцина є чотиривалентною.

Термін "прайм-буст" стосується терапевтичного режиму, який включає (1) введення пацієнту, який потребує такого, першої композиції вакцини від вірусу денге, де композиція містить (а) щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або живий атенуйований химерний флавівірус (ЖАХВ), і (b) фармацевтично прийнятний носій; (2) очікування, поки мине певна кількість часу; і (3) введення пацієнту другої композиції вакцини від вірусу денге або інактивованої вакцини денге. Друга композиція вакцини від вірусу денге може бути такою ж або відмінною від першої композиції вакцини від вірусу денге. У одному варіанті другою вакциною від вірусу денге є жива атенуйована вакцина денге або рекомбінантна субодинична вакцина денге. Вакцини від вірусу денге, що застосовуються в композиціях відповідно до даного винаходу, використовують для отримання реакції антитіл, які нейтралізують вірус, на гомологічні віруси денге у людини.

Термін "лікування" стосується як терапевтичного лікування, так і профілактичних або превентивних заходів. До осіб або пацієнтів, "які потребують" лікування, належать ті, у кого вже є інфекція денге, з або без виявлення яких-небудь клінічних симптомів, а також ті, які перебувають у зоні ризику зараження денге. Лікування пацієнта вакцинними композиціями від денге відповідно до даного винаходу включає одне або більше з наступних: виклик/підвищення імунної реакції проти денге у пацієнта, виклик реакції антитіла, яке нейтралізує вірус, проти одного або більше вірусів денге, профілактика, полегшення, пригнічення або зниження імовірності клінічних виявів денге у пацієнтів, які були заражені денге, профілактика або зниження імовірності розвитку гарячки денге, DHF або DSS і/або іншого захворювання або ускладнення, пов'язаного із зараженням денге, зниження тяжкості або тривалості клінічних симптомів зараження денге і/або інших захворювань або ускладнень, пов'язаних з денге, і профілактика або зниження імовірності зараження денге.

Термін "фармацевтично ефективна кількість" або "ефективна кількість" означає введення достатньої кількості вакцинної композиції пацієнту для отримання бажаного ефекту, включаючи, але не обмежуючись: виклик/підвищення імунної реакції проти денге у пацієнта, виклик/підвищення реакції антитіла, яке нейтралізує вірус, проти денге у пацієнта, профілактика або зниження імовірності зараження денге, профілактика або зниження імовірності рецидиву зараження денге, профілактика, полегшення або пригнічення клінічних виявів денге у пацієнтів, які були заражені денге, профілактика гарячки денге, DHF і/або DSS, або зниження тяжкості або тривалості захворювання, пов'язаного з денге. Фахівець у даній галузі техніки зрозуміє, що цей рівень може варіювати.

Термін "імунна відповідь" стосується опосередкованої клітинами (Т-клітинами) імунної відповіді і/або антитільної відповіді (В-клітини).

Термін "пацієнт" стосується ссавця, здатного до інфікування вірусом денге, таким як DEN1, DEN2, DEN3 або DEN4, який отримує вакцинні композиції від денге, описані тут, включаючи і імунокомпетентних, і імунокомпрометованих осіб. У переважних варіантах пацієнтом є людина. Як визначено тут, "пацієнт" включає або тих, хто вже заражений гарячкою денге, внаслідок природного зараження або вакцинації, або тих, які можуть бути піддані впливу в майбутньому.

"ISCOM-подібним ад'ювантом" є ад'ювант, який містить імуностимулюючий комплекс (ISCOM), який складається з сапоніну, холестерину і фосфоліпиду, які разом утворюють

характерну вміщену частинку, що має унікальну сферичну клітиноподобну структуру, яка сприяє її функції (огляд див. у Barr and Mitchell, Immunology and Cell Biology 74: 8-25 (1996)). Цей термін включає як ISCOM™ ад'юванти, які отримують з антигеном і містять антиген всередині ISCOM™ частинки, так і ISCOM™ матричні ад'юванти, які є порожнистими ад'ювантами типу ISCOM, які отримують без антигену. У переважних варіантах композицій і способів, представлених тут, ад'ювант типу ISCOM є ISCOM™ матричний частковий ад'ювант, такий як ISCOMATRIX™, який виробляють без антигену (ISCOM™ і ISCOMATRIX™ є зареєстрованими торговими марками CSL Limited, Parkville, Australia).

Позначення "rDEN1Δ30-1545" стосується рекомбінантного денге 1 вірусу, де вірусний геном містить (1) 30 nt делецію TL2 структури петля на стеблі 3' НТР і (2) заміщення на нуклеотидному положенні 1545 на G, яке відбувається після адаптації вірусу до росту в клітинах Vero.

Позначення "rDEN2/4Δ30(ME)-1495,7163" стосується рекомбінантного химерного денге 2/4 вірусу, де вірусний геном містить: (1) денге 4 кістяк (С, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 гени), що містить (i) 30 nt делецію TL2 структури петля на стеблі 3' НТР, і (ii) заміщення на нуклеотидному положенні 1495 на U і 7163 на С, яке виникає після адаптації вірусу до росту в клітинах Vero, і (2) денге 2 ргМ і Е гени.

Позначення "rDEN3Δ30/31-7164" стосується рекомбінантного денге 3 вірусу, де вірусний геном містить: (1) 30 nt делецію TL2 структури петля на стеблі 3' НТР, (2) окрему 31 nt делецію в 3'НТР, проти ходу транскрипції Δ30 мутації, яка видаляє TL-3 структуру, і (3) заміщення на нуклеотидному положенні 7164 на С, яке виникає після адаптації вірусу до росту в клітинах Vero.

Позначення "rDEN4Δ30-7132,7163,8308" стосується рекомбінантного денге 4 вірусу, де вірусний геном містить: (1) 30 nt делецію TL2 структури петля на стеблі 3' НТР і (2) заміщення на нуклеотидному положенні 7132 на U, 7163 на С і 8308 на G, яке виникає після адаптації вірусу до росту в клітинах Vero.

"V180" стосується чотиривалентної субодиночної вакцини, яка складається з усічених оболонкових глікопротеїнів (DEN-80E) з кожного з 4 серотипів вірусу денге (DENV1, DENV2, DENV3 і DENV4), де кожний з Е білків становить приблизно 80 % від довжини дикого типу Е, починаючи від амінокислотного залишку 1 на його N-кінці так, що вказаний Е білок секретується в середовище для вирощування при рекомбінантному експресуванні в клітині хазяїна. Див. Coller et al. WO 2012/154202.

Наступні аббревіатури використовують тут, і вони мають наступні значення: С означає ген капсиду денге, DEN (альтернативно, DENV) означає вірус денге, DF означає гарячку денге, DHF означає геморагічну гарячку денге, DSS означає шоківий синдром денге, h означає години, СГТ означає середнє геометричне титру, ВМ означає внутрішньом'язово, ІМХ означає Iscomatrix™, JE означає японський енцефаліт, ЖАВ означає живий атенуйований вірус, NS (що застосовується в NS1-NS5) означає неструктурний, nt означає нуклеотид, БУО означає бляшкоутворювальні одиниці, ргМ означає ген передмембрани денге, ПК означає підшкірно, ТВЕ означає кліщовий енцефаліт, НТР означає нетрансльовану ділянку, WN (альтернативно, WNV) означає вірус Західного Ніла, YF (альтернативно, YFV) означає вірус жовтої гарячки, і wt означає дикий тип.

Жива атенуйована вакцина від вірусу денге

Як указано вище, композиції вакцини від вірусу денге відповідно до даного винаходу містять живу атенуйовану вакцину денге, яка містить щонайменше один ЖАВ, вибраний з групи, яка складається з вірусу денге 1 типу (DEN1), вірусу денге 2 типу (DEN2), вірусу денге 3 типу (DEN3) і вірусу денге 4 типу (DEN4), або ЖАХВ. У одному варіанті ЖАВ або ЖАХВ містить вірусний геном, який містить TL-2 Δ30 модифікацію в 3'НТР, і де ЖАВ або ЖАХВ: викликає імунну відповідь проти денге, викликає відповідь антитіла, яке нейтралізує вірус, проти денге, захищає від або знижує імовірність зараження або знижує тяжкість або тривалість його клінічних виявів. У варіантах винаходу жива атенуйована вакцина денге є одновалентною, двовалентною, тривалентною або чотиривалентною, тобто викликає імунну відповідь проти або захищає від одного, двох, трьох або чотирьох серотипів DEN 1-4, відповідно. У переважних варіантах даного винаходу жива атенуйована вакцина денге є чотиривалентною, тобто викликає імунну відповідь проти або захищає від серотипів 1-4 DEN, і містить DEN1, DEN2, DEN3 і DEN4 компонент, де кожний компонент є ЖАВ або ЖАХВ.

У додаткових варіантах винаходу жива атенуйована вакцина денге є чотиривалентною ЖАВ або "ЖАЧВ" (тобто містить живі послаблені віруси денге з DENV 1-4, або живі атенуйовані химерні флавівіруси з DENV 1-4, як визначено тут, або їх комбінацію, де щонайменше один з ЖАВ або ЖАХВ є Δ30ЖАВ або Δ30ЖАХВ). У додаткових варіантах винаходу жива атенуйована вакцина денге є чотиривалентною і містить щонайменше один химерний флавівірус, де

химерний флавівірус містить вірусний геном, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує рГМ і Е білки одного серотипу вірусу денге, і нуклеотидну послідовність, що кодує капсидний і неструктурний білки різних флавівірусів, де химерний флавівірус є атенуйованим. У деяких варіантах винаходу капсидний і неструктурний білки химерного флавівірусу походять з інших серотипів денге, ніж рГМ і Е білки.

У деяких варіантах винаходу кожний ЖАВ або ЖАХВ компонент ЖАЧВ відповідно до даного винаходу містить живий атенуйований вірус, який незалежно є або атенуйованим химерним флавівірусом, або атенуйованим вірусом денге, що містить TL-2  $\Delta$ 30 модифікацію в 3'НТР вірусного геному. Атенуація вірусу денге досягається через TL-2  $\Delta$ 30 модифікацію. Однак додаткові атенуюючі мутації також можуть бути включені в один або більше компонентів вакцини, включаючи, але не обмежуючись ними: мутації в положеннях 1495, 1545, 7132, 7163, 7164 і 8308. Атенуюючі мутації можуть бути досягнуті різними методами, включаючи методи, відомі в даній галузі техніки, такі як серійне розбавлення на культурі тканини або більш визначені генетичні маніпуляції. Мутації, що використовуються для атенуації вірусів денге і химерних вірусів денге, відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, WO 02/095075, WO 2006/44857, патент США № 7,189,403, патент США № 8,337,860, WO 2003/103571, WO 2000/014245 і WO 2008/022196. Відомі атенуйовані штами денге також можуть використовуватися у композиціях тут, такі як штами, описані в WO 06/134433, WO 2006/134443, WO 2007/141259, WO 96/40933, WO 2000/057907, WO 2000/057908, WO 2000/057909, WO 2000/057910 і WO 2007/015783.

Переважають варіанти композицій відповідно до даного винаходу містять чотиривалентну живу атенуйовану вакцину денге (ЖАЧВ). Така чотиривалентна жива атенуйована вакцина може містити чотири атенуйовані віруси денге (ЖАВ), три ЖАВ і один атенуйований штам химерного флавівірусу (ЖАХВ), два денге ЖАВ і два ЖАХВ, один денге ЖАВ і три ЖАХВ, або чотири ЖАХВ.

У переважних варіантах ЖАЧВ містить наступні ознаки: (1) rDEN1 $\Delta$ 30, який є DENV1 ЖАВ, де DENV1 вірусний геном містить 30 nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР; (2) rDEN2/4 $\Delta$ 30, який є DENV2 ЖАХВ, що містить DENV2 рГМ і Е гени на DENV4 кістяку, де DEN4 кістяк містить 30-nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР; (3) rDEN3  $\Delta$ 30/ $\Delta$ 31, який є DENV3 ЖАВ, де DENV3 вірусний геном містить 30 nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР і окрему делецію, яка не сполучається, проти ходу транскрипції 31 nt, що відповідає TL-3 структурі 3' НТР; і (4) rDEN4 $\Delta$ 30, який є DENV4 ЖАВ, де DENV4 вірусний геном містить 30 nt делецію, що відповідає TL2 структурі петля на стеблі в 3' НТР.

У варіантах даного винаходу, які містять химерні флавівіруси, кожний химерний флавівірус містить вірусний геном, який містить нуклеотидні послідовності, що кодують рГМ і Е білки одного серотипу вірусу денге, і нуклеотидні послідовності, які кодують капсидний і неструктурний білки (тобто "основ") різних флавівірусів, де кожний з химерних флавівірусів послаблений. Способи конструювання штаму рекомбінантного живого атенуйованого флавівірусу можуть включати використання відомого атенуйованого штаму як основи, де спосіб включає заміщення придатних генів (рГМ і Е) від спорідненого цільового вірусу на еквівалентні гени вірусу-основи. Наприклад, цей підхід був використаний для WNV, де химерним вірусом є міжтипний химерний на основі атенуйованого DEN-4 штаму, що містить рГМ і Е гени WNV (Bray, M. et al., J. Virol. (1996) 70:4162-4166; Chen, W., et al., J. Virol. (1995) 69:5186-5190; Bray, M. and Lai, C.-J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:10342-10346; Lai, C. J. et al., Clin. Diagn. Virol. (1998) 10:173-179).

Іншим підходом є використання YF 17D атенуйованого штаму жовтої гарячки як основи для розвитку рекомбінантних химерних вакцин, який раніше використовували для JE вірусу, DEN вірусів і WN вірусу. Химерна вакцина від жовтої гарячки може бути сконструйована такою, що містить кістяк жовтої гарячки, через заміну генів, що кодують рГМ і Е білки з будь-якого штаму жовтої гарячки, наприклад, YFV 17D, на гени серотипу денге. Після ДНК клонування РНК зчитують і трансфікують у клітини Vero з отриманням химерних вірусів, що мають YFV 17D механізм реплікації і зовнішньою оболонкою спорідненого вірусу денге. Див. Guirakhoo et al., Journal of Virology, 74(12): 5477-5485 (2000); Guy et al., Vaccine 28: 632-649 (2010); Monath T.P. Adv Virus Res (2003) 61:469-509; Monath et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103:6694; і WO 98/37911. Таким чином, в деяких варіантах винаходу жива атенуйована вакцина денге містить (1) щонайменше один химерний флавівірус, який містить рГМ і Е білки одного серотипу денге і кістяк жовтої гарячки, і (2) щонайменше один ЖАВ або ЖАХВ, який містить вірусний геном, який містить 30-нуклеотидну делецію TL-2 структури петля на стеблі 3'НТР.

Химерні живі атенуйовані флавівіруси, що використовуються в композиціях відповідно до даного винаходу, можуть також містити химерний вірус денге, де вірусний геном містить рГМ і Е

гени одного серотипу вірусу денге і капсидний і неструктурний гени різних серотипів вірусу денге. У варіантах, де химерний вірус містить кістяк з другого серотипу денге, кістяк денге містить делецію приблизно 30-нуклеотидів 3'НТР, яка відповідає TL-2 структурі петля на стеблі і, необов'язково, може містити додаткові атенуюючі мутації. Будь-який атенуований вірус денге  
 5 або вірус денге дикого типу може використовуватися як кістяк химерного вірусу, введенням 30-нуклеотидної делеції TL-2 структури петля на стеблі у вірусний кістяк атенуованого денге або вірусний кістяк денге дикого типу. Атенуація кістяка вірусу денге може бути досягнута через серійний пасаж, через введення певних генетичних мутацій або через використання відомих атенуованих штамів денге. Химерні вакцини від денге описані, наприклад, в Whitehead et al.  
 10 WO 03/092592. У деяких варіантах винаходу жива атенуована вакцина містить химерний флавівірус, де капсидний і неструктурний білки отримують із серотипів денге, відмінних від prM і E білків.

Композиції вакцини від вірусу денге відповідно до даного винаходу містить ефективну кількість живої атенуованої вакцини від вірусу. У деяких варіантах винаходу ефективність  
 15 живої атенуованої вакцини від денге становить від 10 до приблизно  $1 \times 10^7$  бляшкоутворювальних одиниць (БУО). У альтернативних варіантах ефективність живої атенуованої вакцини від денге становить від приблизно  $1 \times 10^2$  до приблизно  $1 \times 10^6$  БУО. У інших варіантах ефективність живої атенуованої вакцини від денге становить від приблизно  $1 \times 10^3$  до приблизно  $1 \times 10^5$  БУО.

Аналізи вірусних бляшок визначають кількість бляшкоутворювальних одиниць (БУО) у вірусному зразку. Коротко, в аналізі імунного бляшкоутворення денге моношар клітин хазяїна (наприклад, клітини Vero), що злився, заражають вірусом денге при варіюючому розбавленні і покривають напівтвердим покриттям, яке містить метилцелюлозу, для запобігання безладному поширенню вірусної інфекції. Інфіковані вірусом клітини лізують і розповсюджують інфекцію на  
 25 сусідні клітини, де повторюють цикл інфекція-лізис. Інфіковані клітини утворюють бляшку (групу інфікованих клітин Vero, оточених не інфікованими клітинами), яка може бути видна візуально після фіксації і імунного забарвлення із застосуванням анти-денге серотипу моноклональних антитіл (mAb). Бляшки рахують, і результати, в поєднанні з коефіцієнтами розбавлення, використовують для розрахунку кількості бляшкоутворювальних одиниць на мл (БУО/мл) у  
 30 зразках. Результат ефективності денге БУО/мл представляє кількість інфекційних частинок у зразку і оснований на припущенні, що кожна утворена бляшка є типовою для однієї інфекційної вірусної частинки.

#### Субодинична вакцина денге

У деяких варіантах винаходу складі додатково містять рекомбінантну субодиничну вакцину  
 35 від денге, яка містить один або більше білків антигенів денге. У переважних варіантах цього аспекту винаходу рекомбінантна субодинична вакцина від денге містить один або більше білків денге, злитих білків або їх фрагмент або фрагменти. В інших переважних варіантах рекомбінантна субодинична вакцина від денге містить оболонку денге або E білок, або його фрагмент.

У інших переважних варіантах рекомбінантна субодинична вакцина від денге є чотиривалентною, тобто викликає імунну відповідь проти всіх чотирьох серотипів денге. Рекомбінантна субодинична вакцина від денге може містити чотири рекомбінантні білки денге або менше чотирьох, наприклад, рекомбінантний DEN1 білок, рекомбінантний DEN2 білок і рекомбінантний DEN3/4 злитий білок. У деяких варіантах рекомбінантна субодинична вакцина  
 45 від денге містить глікопротеїн оболонки вірусу денге або його фрагменти, DEN1-4 (наприклад, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E або DEN4-80EZip), який утворюється і секретується з використанням рекомбінантної системи експресії. Вказана субодинична вакцина може необов'язково містити ад'ювант, як описано більш детально нижче.

У деяких варіантах цього аспекту винаходу рекомбінантна субодинична вакцина від денге  
 50 містить один або більше очищених білків оболонки вірусу денге ("E"), фармацевтично прийнятний ексципієнт, де кожний E білок становить приблизно 80 % довжини дикого типу E, починаючи з амінокислотного залишку 1 в його N-кінці так, що вказаний E білок секретується у середовище для вирощування при рекомбінантному експресуванні в клітині хазяїна, і де композиція спричиняє утворення нейтралізуючих антитіл у людини. У деяких варіантах  
 55 винаходу рекомбінантна субодинична вакцина від денге додатково містить ефективну кількість ад'юванта. У деяких варіантах винаходу DEN-4 E білок є двомірним ("DEN4-80EZip"), як описано в US 6,749,857 і WO 2012/154202.

У деяких варіантах цього аспекту винаходу E білки в композиції, описаній вище, рекомбінантно утворюються і експресуються в клітині хазяїна комах. У інших переважних  
 60 варіантах E білок рекомбінантно утворюється і експресується в клітинах хазяїна *Drosophila*

melanogaster Schneider 2 (S2).

Рекомбінантні Е білки вірусу денге можуть бути отримані методами системи експресії клітинної культури, в якій використовують клітини *Drosophila Schneider 2 (S2)*. Ця система була продемонстрована для отримання рекомбінантних оболонкових білків денге, які зберігають подібну природному структуру (Cuzzubbo et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. (2001) 8:1150-55; Modis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100:6986-91; Modis et al., Nature (2004) 427:313-9; Zhang et al., Structure (2004)12(9):1607-18). Також було показано, що ця система експресії експресує інші рекомбінантні оболонкові білки від інших флавівірусів, таких як віруси Західного Ніла, японського енцефаліту, гепатиту С і кліщового енцефаліту. Рекомбінантні оболонкові білки денге можуть бути усічені на С-закінченні, залишаючи 80 % природного оболонкового білка ("80E"). Таким чином, 80E визначений як приблизно перші 80 % послідовних амінокислот Е білка, починаючи з амінокислоти 1 на його N-кінці.

Як указано вище, деякі варіанти цього аспекту винаходу містять усічені 80E білки, які складаються з приблизно 80 % довжини дикого Е, починаючи з амінокислотного залишку 1 на його N-кінці. Е білки, що використовуються в деяких варіантах винаходу, мають видалену частину мембранного якора (приблизно останні 10 % Е на карбокси закінченні) білка. Іншими словами, усічені 80E білки, що використовуються в деяких варіантах винаходу, складаються з перших 90 % послідовних амінокислот Е, починаючи з амінокислоти 1 його N-закінчення, таким чином дозволяючи йому секретуватися у позаклітинне середовище, сприяючи відновленню. Усічення може додатково видаляти "стовбурову" частину Е білка, який зв'язує 80E частину з частиною мембранного білка; стовбурова частина не містить гідних уваги антигенних епітопів і тому не включена в переважні антигени, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E або DEN4-80EZip. Більше 90 %, але менше 100 % Е білка може бути клоновано і секретовано, тобто білок може мати довжину 90 %+, карбокси усічену, і може включати частину трансмембранного домену доти, поки усічений Е білок секретується. "Секретований" означає здатний до секретування, і звичайно секретований, з трансформованих клітин у системі експресії. Таким чином, фахівець у даній галузі техніки зрозуміє, що Е білки денге, які використовують у композиціях і способах відповідно до даного винаходу, можуть варіюватися від 80 %, представлених тут, доти, поки білок секретується. У переважних варіантах кожного аспекту даного винаходу, DEN Е білки становлять приблизно 80 % довжини, починаючи з N-кінцевої амінокислоти оболонкового білка і закінчуючи амінокислотою в інтервалі 393-401 амінокислоти, наприклад, від амінокислоти 1 до амінокислоти 395 вірусу денге 2 типу. У альтернативних варіантах кожного аспекту винаходу Е білок денге може мати приблизно 75 %, приблизно 85 %, приблизно 90 %, приблизно 95 % або приблизно 98 % послідовних амінокислот Е, починаючи з амінокислоти 1 на його N-кінці. У типових варіантах аспектів винаходу DEN Е білок містить приблизно 80 % послідовних амінокислот Е білка, починаючи з амінокислоти 1 його N-закінчення; такий як DEN1-80E, як зазначено нижче в SEQ ID NO:1, DEN2-80E, як зазначено нижче в SEQ ID NO:2, DEN3-80E, як зазначено нижче в SEQ ID NO:3 і DEN4-80E, як зазначено нижче в SEQ ID NO:4.

Секретований Е білок також може містити домени, які сприяють димеризації, такі як в DEN4-80EZip білку, так, що імуногенність рекомбінантного білка додатково поліпшується. Типовий DEN4-80EZip білок містить послідовність амінокислот, вказану нижче в SEQ ID NO:5. У деяких варіантах цього аспекту винаходу DEN1, DEN2 і DEN3 80E антигени, включені в композицію, є мономерними, і DEN4 80E антиген є двовимірним.

У альтернативних варіантах цього аспекту винаходу DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E і DEN4-80E білки в композиції є мономерними. У таких варіантах DEN4 компонент присутній в кількості, що становить від приблизно 1,5 до приблизно 3 разів від окремих кількостей DEN1, DEN2 і DEN3 білків, переважно, приблизно 2 разів від кількості DEN1, DEN2 і DEN3 компонентів (білків). У переважних варіантах цього аспекту винаходу відношення DEN1:DEN2:DEN3:DEN4 антигенів у композиціях становить приблизно 1:1:1:2.

У варіантах винаходу, які містять Е білки денге, кількість кожного Е білка в композиції становить від приблизно 0,5 мкг до приблизно 500 мкг. У альтернативних варіантах кількість кожного Е білка становить від приблизно 0,5 мкг до приблизно 450 мкг, 0,5 мкг до приблизно 400 мкг, 0,5 мкг до приблизно 350 мкг, 0,5 мкг до приблизно 300 мкг, 0,5 мкг до приблизно 250 мкг, 0,5 мкг до приблизно 200 мкг, 0,5 мкг до приблизно 150 мкг, 0,5 мкг до приблизно 100 мкг, 0,5 мкг до приблизно 50 мкг, 5,0 мкг до приблизно 500 мкг, 5,0 мкг до приблизно 450 мкг, 5,0 мкг до приблизно 400 мкг, 5,0 мкг до приблизно 350 мкг, 5,0 мкг до приблизно 300 мкг, 5,0 мкг до приблизно 250 мкг, 5,0 мкг до приблизно 200 мкг, 5,0 мкг до приблизно 150 мкг, 5,0 мкг до приблизно 100 мкг, 5,0 мкг до приблизно 50 мкг, 10 мкг до приблизно 500 мкг, 10 мкг до приблизно 450 мкг, 10 мкг до приблизно 400 мкг, 10 мкг до приблизно 350 мкг, 10 мкг до

приблизно 300 мкг, 10 мкг до приблизно 250 мкг, 10 мкг до приблизно 200 мкг, 10 мкг до приблизно 150 мкг, 10 мкг до приблизно 100 мкг, 10 мкг до приблизно 50 мкг, 25 мкг до приблизно 500 мкг, 25 мкг до приблизно 450 мкг, 25 мкг до приблизно 400 мкг, 25 мкг до приблизно 350 мкг, 25 мкг до приблизно 300 мкг, 25 мкг до приблизно 250 мкг, 25 мкг до приблизно 200 мкг, 25 мкг до приблизно 150 мкг, 25 мкг до приблизно 100 мкг або від 25 мкг до приблизно 50 мкг. У додаткових переважних варіантах кількість кожного Е білка в композиції становить від приблизно 1,0 мкг до приблизно 100 мкг. У ще додаткових варіантах кількість кожного Е білка в композиції вибирають з приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 або 500 мкг.

#### Інактивована вакцина денге

Інактивовані вакцини денге містять один або більше цільних інактивованих вірусів денге і/або один або більше інактивованих химерних вірусів денге. У деяких варіантах цього аспекту винаходу інактивована вакцина денге є чотиривалентною і містить цільний інактивований DEN1, DEN2, DEN3 і DEN4. У альтернативних варіантах інактивована вакцина містить чотири інактивовані химерні віруси денге. У ще інших варіантах інактивована вакцина є чотиривалентною і містить один або більше цільних інактивованих вірусів денге і один або більше інактивованих химерних вірусів денге, наприклад, інактивований цільний DEN1 вірус, інактивований цільний DEN2 вірус, інактивований DEN3 химерний вірус і інактивований DEN4 химерний вірус. Фахівець у даній галузі техніки зрозуміє, що будь-яке поєднання інактивованих цільних або химерних DEN вірусів може використовуватися у чотиривалентних композиціях і способах відповідно до даного винаходу, доти, поки вакцина вражає всі чотири серотипи денге.

Інактивовані вакцини денге, що застосовуються у композиціях і способах винаходу, описані в Putnak et al. Vaccine 23: 4442-4452 (2005), US 6190859, US 6254873 і Sterner et al. WO 2007/002470. Альтернативно, штами вірусу денге і химерні штами денге/химерні штами флавівірусу можуть бути інактивовані для застосування у композиціях способами, відомими в даній галузі техніки, наприклад, хімічними сполуками, теплом або опроміненням.

Отже, даний винахід також стосується вказаних вище складів, які містять ефективні кількості живої атенуйованої вакцини від денге і нереплікаційної вакцини від денге, де жива послаблена вакцина від денге містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус (ЖАХВ), де ЖАВ або ЖАХВ містить вірусний геном, який містить 30-нуклеотидну делецію TL-2 структури петля на стеблі в 3'НТР. У деяких варіантах винаходу нереплікаційну вакцину від денге з композицій вакцин від вірусу денге даного винаходу вибирають з рекомбінантної субодичної вакцини від денге або інактивованої вакцини від денге. У одному варіанті склад ліофілізований, заморожений, висушений мікрохвилями або має ліосфери з ефективними кількостями живої атенуйованої вакцини від денге і нереплікаційної вакцини від денге. У іншому варіанті склад живої атенуйованої вакцини від денге відновлюють рідким розчином, який містить нереплікаційну вакцину від денге, наприклад, V180.

У переважних варіантах винаходу жива атенуйована і нереплікаційна вакцини від денге є чотиривалентними (тобто містять DEN1, DEN2, DEN3 і DEN4 компоненти або викликають імунну відповідь проти DEN1, DEN2, DEN3 і DEN4).

#### Ад'юванти

Спільне введення вакцин зі сполуками, які поліпшують імунну відповідь проти цільового антигену, відомими як ад'юванти, ретельно вивчали. На доповнення до підвищення імунної реакції проти цільового антигену, деякі ад'юванти можуть використовуватися для зниження кількості антигену, необхідного для виклику бажаної імунної реакції, або зниження кількості ін'єкцій, необхідних у клінічному режимі для того, щоб викликати імунну відповідь і забезпечити захист від захворювання.

Виходячи з цього, складу вакцини від вірусу денге відповідно до даного винаходу можна застосовувати як ад'юванти. Ад'ювантом складів, описаних тут, може бути будь-який ад'ювант, який забезпечує бажану функцію, як описано вище, і не інактивує або значно впливає на титр ЖАВ або ЖАХВ композиції.

Було визначено, що сполуки на основі алюмінію мають ад'ювантну активність більше 60 років тому (огляд див. в Lindblad, E.B. Immunol. and Cell Biol. 82: 497-505 (2004); Baylor et al. Vaccine 20: S18-S23 (2002)). Алюмінієві ад'юванти звичайно вважаються безпечними при застосуванні у придатних дозах. Багато з них були схвалені для введення людині контролюючими органами по всьому світу.

Отже, сполуки на основі алюмінію, такі як гідроксид алюмінію (Al(OH)<sub>3</sub>), гідроксифосфат алюмінію (AlPO<sub>4</sub>), аморфний сульфат гідроксифосфату алюмінію (АСГА) або так званий "алюм" (KAl(SO<sub>4</sub>)·12H<sub>2</sub>O) (див. Klein et al., Analysis of aluminum hydroxyphosphate vaccine adjuvants by Al

MAS NMR., J. Pharm. Sci. 89(3): 311-21 (2000)), можуть бути об'єднані з представленими тут композиціями. У типових варіантах представленого тут винаходу алюмінієвим ад'ювантом є гідроксифосфат алюмінію або АСГА. У альтернативних варіантах алюмінієвим ад'ювантом є ад'ювант на основі фосфату алюмінію, позначений тут "АФА". У інших варіантах ад'ювантом є гідроксид алюмінію.

Фахівець у даній галузі техніки зможе визначити оптимальну дозу алюмінієвого ад'юванта, яка і безпечна, і ефективна для підвищення імунної реакції на цільові віруси денге. Обговорення профілю безпеки алюмінію, а також кількості алюмінію, включені в ліцензовані FDA вакцини, представлено в Baylor et al., Vaccine 20: S18-S23 (2002). Загалом, ефективна і безпечна доза алюмінієвого ад'юванта варіюється від 50 мкг до 1,25 мг елементарного алюмінію на дозу (концентрація від 100 мкг/мл до 2,5 мг/мл).

Таким чином, конкретні варіанти даного винаходу включають композиції, які містять живу атенуйовану вакцину від вірусу денге і додатково включають алюмінієвий ад'ювант. У варіантах винаходу композиції денге містять ад'ювант, який містить від приблизно 50 мкг до приблизно 1,25 мг елементарного алюмінію на дозу вакцини. У інших варіантах алюмінієвий ад'ювант на дозу композиції вакцини містить кількість елементарного алюмінію, що становить від приблизно 100 мкг до приблизно 1,0 мг, від приблизно 100 мкг до приблизно 900 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 850 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 800 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 700 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 600 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 500 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 400 мкг, від приблизно 100 мкг до приблизно 300 мкг, від приблизно 100 до приблизно 250 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 1,25 мг, від приблизно 200 мкг до приблизно 1,0 мг, від приблизно 200 мкг до приблизно 900 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 850 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 800 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 700 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 600 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 500 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 400 мкг, від приблизно 200 мкг до приблизно 300 мкг, від приблизно 300 мкг до приблизно 1,25 мг, від приблизно 300 мкг до приблизно 1,0 мг, від приблизно 300 мкг до приблизно 900 мкг, від приблизно 300 мкг до приблизно 850 мкг, від приблизно 300 мкг до приблизно 800 мкг, від приблизно 300 мкг до приблизно 700 мкг, від приблизно 300 мкг до приблизно 600 мкг, від приблизно 300 мкг до приблизно 500 мкг, від приблизно 400 мкг до приблизно 1,25 мг, від приблизно 400 мкг до приблизно 1,0 мг, від приблизно 400 мкг до приблизно 900 мкг, від приблизно 400 мкг до приблизно 850 мкг, від приблизно 400 мкг до приблизно 800 мкг, від приблизно 400 мкг до приблизно 700 мкг, від приблизно 400 мкг до приблизно 600 мкг, від приблизно 400 мкг до приблизно 500 мкг, від приблизно 500 мкг до приблизно 1,25 мг, від приблизно 500 мкг до приблизно 900 мкг, від приблизно 500 мкг до приблизно 850 мкг, від приблизно 500 мкг до приблизно 800 мкг, від приблизно 500 мкг до приблизно 700 мкг, від приблизно 500 мкг до приблизно 600 мкг, від приблизно 600 мкг до приблизно 1,25 мг, від приблизно 600 мкг до приблизно 1,0 мг, від приблизно 600 мкг до приблизно 900 мкг, від приблизно 600 мкг до приблизно 850 мкг, від приблизно 600 мкг до приблизно 800 мкг або від приблизно 600 мкг до приблизно 700 мкг.

Інші ад'юванти, які можуть використовуватися в поєднанні з композиціями вакцини від вірусу денге відповідно до даного винаходу, включають, але не обмежені ними, ад'юванти, що містять СpG олігонуклеотиди або інші молекули, які діють на toll-подібні рецептори, такі як TLR4 і TLR9 (огляди дані в Daubenberger, C.A., Curr. Opin. Mol. Ther. 9(1):45-52 (2007); Duthie et al., Immunological Reviews 239(1): 178-196 (2011); Hedayat et al., Medicinal Research Reviews 32(2): 294-325 (2012)), включаючи ліпополісахарид, монофосфорилловий ліпід А і 4-фосфати аміноалкілглюкозамініду. Додаткові ад'юванти, що застосовуються в композиціях відповідно до даного винаходу, включають імуностимулюючі олігонуклеотиди (ІМО; см, наприклад, U.S. 7,713,535 і U.S. 7,470,674); Т-хелперні епітопи, ліпід-А і його похідні або варіанти, ліпосоми, фосфат кальцію, цитокіни (наприклад, гранулоцитарний макрофаг-колонієстимулюючий фактор (GM-CSF) IL-2, IFN- $\alpha$ , Flt-3L), CD40, CD28, CD70, IL-12, білок теплового шоку (HSP) 90, CD134 (OX40), CD137, CoVaccine HT, неіонні блокспівполімери, неповний ад'ювант Фрейнда, хемокіни, токсин холери; E. coli термолабільний ентеротоксин; коклюшний токсин; мураміддипептид, аналоги мураміддипептиду, MF59, SAF, імуностимулюючі комплекси, біорозкладані мікросфери, поліфосфазен; синтетичні полінуклеотиди.

Додаткові ад'юванти для застосування з композиціями, описаними тут, є ад'ювантами, які містять сапоніни (наприклад, QS21), окремо або в поєднанні з холестериним і фосфоліпідом в характеристичній формі ISCOM ("імуностимулюючий комплекс", огляд представлений у Barr and Mitchell, Immunology and Cell Biology 74: 8-25 (1996); и Skene and Sutton, Methods 40: 53-59

(2006)). Такі ад'юванти називаються тут "ад'юванти на основі сапоніну". У конкретних варіантах представлених тут композицій мутантні токсини і/або білки токсинів об'єднані з ад'ювантом типу ISCOM або "ISCOM", який є ад'ювантом з матричними частинками ISCOM, таким як ISCOMATRIX™, який виробляють без антигену (ISCOM™ і ISCOMATRIX™ є зареєстрованими торговими марками CSL Limited, Parkville, Australia).

#### 5 Склади

Склади або композиції відповідно до даного винаходу містять живу атенуйовану вакцину від денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус (ЖАХВ), буфер при рН приблизно 6,5-8,5, цукор, гліколь або цукровий спирт і похідне целюлози, вибране з групи, яка складається з карбоксиметилцелюлози, гідроксипропілцелюлози (ГПЦ), гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ), 2-гідроксіетилцелюлози (2-ГЕЦ), кроскармелози і метилцелюлози, або їх фармацевтично прийнятної солі; необов'язково, лужної або лужноземельної солі, і, необов'язково, амінокислоти, вибраної з групи, яка складається з Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro або Glu, або їх поєднання.

У іншому аспекті винаходу склад містить живу атенуйовану вакцину від денге, яка містить щонайменше один живий атенуйований вірус денге (ЖАВ) або щонайменше один живий атенуйований химерний флавівірус у кількості приблизно 20-200000,00 БУО/мл, буфер при рН приблизно 6,5-8,5, цукор у кількості приблизно 150-300 мг/мл, носій, вибраний з групи, яка складається з полівінілпіролідону (ПВП), карбоксиметилцелюлози, гідроксипропілцелюлози (ГПЦ), гідроксипропілметилцелюлози (ГПМЦ), 2-гідроксіетилцелюлози (2-ГЕЦ), кроскармелози, метилцелюлози або їх фармацевтично прийнятної солі, людського сироваткового альбуміну (ЛСА) і желатину; необов'язково лужної солі або лужноземельної солі у кількості приблизно 5-100 мМ; і, необов'язково, амінокислоти Gln, Pro або Glu, або їх поєднання.

У одному варіанті жива атенуйована вакцина від денге має концентрацію 100-1000000 БУО/мл, 100-100000 БУО/мл або 600-20000 БУО/мл у складі. У іншому варіанті жива атенуйована вакцина від денге має концентрацію 200-200000 БУО/мл, 600-200000 БУО/мл або 600-100000 БУО/мл у складі.

У переважних варіантах похідне целюлози є аніонним і утворює сіль, наприклад, натрієву або калієву сіль карбоксиметилцелюлози у кількості приблизно 0,3-10 мг/мл, 1-10 мг/мл, 3-7 мг/мл або 5 мг/мл у складі живої атенуйованої вакцини від денге. Сіль карбоксиметилцелюлози доступна у типі високої в'язкості зі середньою молекулярною масою приблизно 700000; типі середньої в'язкості зі середньою молекулярною масою приблизно 250000; і типі низької в'язкості зі середньою молекулярною масою приблизно 90000. У одному варіанті похідним целюлози є сіль карбоксиметилцелюлози зі середньою молекулярною масою приблизно 700000 у кількості приблизно 0,3-1,5 мг/мл у складі живої атенуйованої вакцини від денге. У іншому варіанті похідним целюлози є сіль карбоксиметилцелюлози зі середньою молекулярною масою приблизно 250,000 у кількості приблизно 1-4 мг/мл. У додатковому варіанті похідним целюлози є сіль карбоксиметилцелюлози зі середньою молекулярною масою приблизно 90000 у кількості приблизно 3-7 або 3-10 мг/мл. У ще одному варіанті похідним целюлози є сіль карбоксиметилцелюлози зі середньою молекулярною масою від приблизно 50000 до 1000000 у кількості приблизно 0,3-10 мг/мл.

У одному варіанті буфер вибирають з групи, яка складається з фосфату, сукцинату, гістидину, TRIS, MES, MOPS, HEPES, ацетату і цитрату у кількості приблизно 5-300 мМ, 5-20 мМ, 10-12 мМ або 11 мМ.

Лужна або лужноземельна сіль може забезпечити стабілізуючу дію і може бути вибрана з групи, яка складається з хлориду магнію, хлориду кальцію, хлориду калію, хлориду натрію або їх поєднання у кількості приблизно 10-150 мМ, 10-100 мМ, 15-75 мМ, 30-90 мМ, 75 мМ, 50 мМ або 30 мМ.

Амінокислота може бути вибрана з групи, яка складається з Val, Ile, Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro або Glu, або їх поєднання у кількості 10-100, 10-75, 10-50, 20-30 або 25 мМ. У іншому варіанті амінокислота може бути вибрана з групи, яка складається з Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro або Glu, або їх поєднання у кількості 10-100, 10-75, 10-50, 20-30 або 25 мМ. У одному варіанті амінокислотою є Lys, Leu або Glu. У іншому варіанті амінокислотами є Leu і Glu. У іншому варіанті амінокислотою є Leu, Lys, Glu або Ala. У іншому варіанті амінокислотою є Leu.

Цукор і гліколь або цукровий спирт може діяти як криопротектор або стабілізуючий ексципієнт. У одному варіанті цукор міститься у концентрації 50-300 мг/мл. У іншому варіанті цукром є трегалоза або сахароза, або їх поєднання, у кількості приблизно 60-120 мг/мл, 90-110 мг/мл або 80-100 мг/мл. У одному варіанті відношення сахарози до трегалози становить 1:1-1:4. В іншому варіанті сахароза становить 90 мг/мл і трегалоза становить 90-200 мг/мл, і,

переважно, 110 мг/мл. У іншому варіанті гліколем є пропіленгліколь, і цукровим спиртом є гліцерин або сорбіт у кількості приблизно 2,5-7,5 мг/мл, 3-7 мг/мл або 5 мг/мл.

5 Композиції відповідно до даного винаходу можуть бути введені суб'єкту одним або кількома способами, відомими фахівцеві в даній галузі, наприклад, парентерально, трансмукозально, трансдермалью, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньонозально, підшкірно, внутрішньочеревинно, і відповідним чином складені.

10 У одному варіанті композиції відповідно до даного винаходу вводять епідермальною ін'єкцією, внутрішньом'язовою ін'єкцією, внутрішньовенною, внутрішньоартеріальною, підшкірною ін'єкцією або ін'єкцією в слизову дихальних шляхів рідкого препарату. Рідкі склади для ін'єкцій включають розчини і подібні. Композиція відповідно до даного винаходу може бути складена у вигляді флаконів з однократною дозою, флаконів із множиною доз або у вигляді попередньо заповнених шприців.

15 У іншому варіанті композиції відповідно до даного винаходу вводять перорально і, таким чином, складають у формі, придатній для перорального введення, тобто у вигляді твердого або рідкого препарату. Тверді пероральні склади включають таблетки, капсули, пілюлі, гранули, пелети і подібні. Рідкі пероральні склади включають розчини, суспензії, дисперсії, емульсії, масла і подібні.

20 У одному аспекті винаходу складом є твердий висушений склад, отриманий ліофілізацією, заморожуванням, сушінням мікрохвилями або утворенням ліосфер. У одному варіанті твердий висушений склад отримують або проводять способом сушіння мікрохвилями, описаним в прикладі 7. Склади можуть зберігатися при  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8^{\circ}\text{C}$  або при кімнатній температурі ( $25$  або  $37^{\circ}\text{C}$ ). Висушені склади можуть бути описані за допомогою маси компонентів у флаконі з однократною дозою, але вони варіюються по різних дозах або розмірах флакона. Альтернативно, висушені склади відповідно до даного винаходу можуть бути описані за допомогою кількості компоненту як відношення маси компоненту до маси лікарської речовини (ЛР) в одному зразку (наприклад, флаконі). Це відношення може бути виражене як процент. Такі відношення відображають внутрішню властивість висушених складів відповідно до даного винаходу, незалежно від розміру флакона, дозування і протоколу відновлення. У інших варіантах, складом є ліосфери.

30 У іншому аспекті винаходу складом є відновлений склад. Висушений твердий склад може бути відновлений в різних концентраціях залежно від клінічних факторів, таких як спосіб введення або дозування. Наприклад, висушений склад може бути відновлений у високій концентрації (тобто в невеликому об'ємі), якщо необхідно для підшкірного введення. Високі концентрації також можуть бути необхідні, якщо дозування потрібне для конкретного суб'єкта, зокрема, при підшкірному введенні, коли об'єм ін'єкції необхідно мінімізувати. Подальше розбавлення водою або ізотонічним буфером може легко використовуватися для розбавлення лікарського продукту до більш низької концентрації. Якщо бажана ізотонічність при низькій концентрації лікарського продукту, висушений порошок може бути відновлений в стандартному низькому об'ємі води і потім додатково розбавлений ізотонічним розріджувачем, таким як 0,9 % хлорид натрію.

40 Відновлення звичайно проводять при температурі приблизно  $25^{\circ}\text{C}$  для повної гідратації, хоча інші температури можуть використовуватися при бажанні. Час, необхідний для відновлення, залежить, наприклад, від типу розріджувача, кількості ексципієнту(ів) і вірусу або білка. Типові розріджувачі включають стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (БВДІ), рН буферований розчин (наприклад буферований фосфатом фізіологічний розчин), стерильний фізіологічний розчин, розчин Рінгера або розчин декстрази. Об'єм відновлення може становити приблизно 0,5-1,0 мл, переважно, 0,5 мл або 0,7 мл. У одному варіанті однократна доза має об'єм 0,5 мл. У іншому аспекті у винаході представлений спосіб отримання рідкого складу, який включає стадії відновлення складів відповідно до даного винаходу розріджувачем, як описано вище.

50 У іншому варіанті винаходу складом є водний розчин, отриманий до ліофілізації, заморожування, сушіння мікрохвилями або отримання ліосфер.

Способи отримання ліосфер

55 Способи отримання ліосфер описані в публікації заявки на патент США US20140294872, опис якої включений сюди як посилання повністю. Спосіб включає поширення щонайменше однієї рідкої краплі, яка має по суті сферичну форму, на твердій і плоскій поверхні (тобто такій, що не містить стінок зразка або порожнин), заморожування краплі на поверхні без контакту краплі з криогенною речовиною і ліофілізацію замороженої краплі з отриманням висушеної опуклості, яка є по суті сферичною за формою. У патенті США № 9,119,794, опис якого 60 включений сюди як посилання повністю, також описані способи отримання ліосфер. Одиничні

об'єми, що містять суміш водного середовища, утворюють на твердому елементі, що містить порожнини. Твердий елемент охолоджують нижче температури замерзання суміші, порожнини заповнюють сумішшю і суміш отверджується, поки знаходиться в порожнині, утворюючи одиничні форми. Одиничні форми сушать у вакуумі з отриманням ліосфер.

5 У інших варіантах ліосфери формують в по суті сферичну форму і отримують заморожуванням крапель рідкої композиції або бажаного біологічного матеріалу на плоскій, твердій поверхні, зокрема, поверхні, яка не має порожнин, з подальшою ліофілізацією одиничних форм. У публікації заявки на патент США № US2014/0294872, опис якої включений сюди як посилання, описані подібні способи отримання ліосфер.

10 Коротко, в деяких варіантах спосіб включає поширення щонайменше однієї рідкої краплі, що має по суті сферичну форму, на твердій і плоскій поверхні (тобто такій, що не містить стінок зразка або порожнин), заморожування краплі на поверхні без контакту краплі з криогенною речовиною і ліофілізацію замороженої краплі з отриманням висушеної опуклості, яка є по суті сферичною за формою. Спосіб може використовуватися в режимі високої продуктивності з отриманням множини висушених опуклостей при безперервному поширенні бажаної кількості крапель на твердій, плоскій поверхні, заморожуючи краплі і ліофілізуючи заморожені краплі. Опуклості, отримані цим способом з рідкого складу, можуть мати високу концентрацію біологічного матеріалу (такого як терапевтичний білок), і може бути об'єднана в сукупність висушених опуклостей.

20 У деяких варіантах твердою плоскою поверхнею є верхня поверхня металевої пластини, яка має нижню поверхню, яка знаходиться у фізичному контакті з тепловідведенням, адаптованим для підтримання температури верхньої поверхні металевої пластини на рівні -90 °C або нижче. Оскільки верхня поверхня металевої пластини знаходиться при температурі нижче точки заморожування рідкого складу, краплі замерзають практично миттєво, як тільки нижня поверхня краплі торкається верхньої поверхні металевої пластини.

25 У інших варіантах тверда плоска поверхня є гідрофобною і містить верхню поверхню з тонкої плівки, яка витримується при приблизно 0 °C під час стадії поширення. Поширена крапля замерзає при охолодженні тонкої плівки до температури нижче температури замерзання складу.

30 Спосіб ліофілізації

Ліофілізовані склади відповідно до даного винаходу отримують ліофілізацією (сушінням виморожування) передліофілізаційного розчину. Сушіння виморожуванням супроводжується заморожуванням складу з подальшою сублімацією води при температурі, придатній для первинного сушіння. У цих умовах температура продукту знаходиться нижче евтектичної точки або температури розкладання складу. Звичайно температура полиці для первинного сушіння становить від приблизно -50 до 25 °C (за умови, що продукт залишається замороженим під час первинного сушіння) при придатному тиску, що варіюється звичайно від приблизно 30 до 250 мТорр. Склад, розмір і тип контейнера, в якому зберігається зразок (наприклад, скляного флакона), і об'єм рідини зумовлюють час, необхідний для сушіння, який може варіюватися від 40 кількох годин до кількох днів (наприклад, 40-60 год.). Стадія вторинного сушіння може проводитися при приблизно 0-40 °C, залежно, насамперед, від типу і розміру контейнера і типу білка, що застосовується. Час вторинного сушіння зумовлюється бажаним рівнем залишкової вологи в продукті, і звичайно становить щонайменше приблизно 5 годин. Звичайно вміст вологи у ліофілізованому складі становить менше приблизно 5 %, і, переважно, менше приблизно 3 %. 45 Тиск може бути таким же, який застосовується під час стадії первинного сушіння. Умови сушіння виморожуванням можуть варіюватися залежно від складу, розміру флакона і лотків для ліофілізації.

У деяких випадках може бути бажано ліофілізувати або сушити мікрохвилями склад у контейнері, в якому буде проводитися відновлення, для того, щоб уникнути стадії перенесення. 50 У цьому випадку контейнером може бути, наприклад, флакон 2, 3, 5, 10 або 20 мл.

Способи застосування

Варіанти даного винаходу також включають одну або більше вакцинних композицій або складів від денге, описаних тут (i) для застосування в, (ii) для застосування як лікарського засобу або композиції для, або (iii) для застосування в приготуванні лікарського засобу для: 55 (a) терапії (наприклад, тіла людини); (b) медицини; (c) інгібування реплікації вірусу денге, включаючи DEN1, DEN2, DEN3 і/або DEN4; (d) виклику імунної реакції або захисної імунної реакції проти одного або більше з DEN1, DEN2, DEN3 і/або DEN4; (e) виклику реакції антитіла, яке нейтралізує вірус, проти одного або більше типів денге; (f) лікування або профілактики зараження вірусом денге; (g) профілактики рецидиву зараження вірусом денге; (h) зниження 60 розвитку, настання або тяжкості патологічних симптомів, пов'язаних із зараженням вірусом

денге і/або зниження імовірності зараження вірусом денге або, (i) лікування, профілактики або затримання настання, тяжкості або розвитку асоційованого з денге захворювання, включаючи, але не обмежуючись ними: гарячку денге, геморагічну гарячку денге і синдром шоку денге. При такому застосуванні вакцинні композиції від денге необов'язково можуть використовуватися в поєднанні з одним або більше ад'ювантами (наприклад, АСГА, фосфатом алюмінію, гідроксидом алюмінію, таким як Alhydrogel®, або іншим ад'ювантом на основі солі алюмінію, ад'ювантом на основі сапоніну, таким як ISCOMATRIX™ (CSL, Ltd.), TLR-агоністом або жировими наночастинками, описаними тут).

Профілактичне лікування може проводитися із застосуванням вакцинної композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу, як описано тут. Композиція відповідно до даного винаходу може вводитися населенню загалом або тим персонам, які схильні до підвищеного ризику зараження денге, наприклад, тим персонам, які живуть або подорожують у ті частини світу, в яких переважають комарі роду *Aedes*.

"Ті, що потребують лікування" включають тих, хто вже заразився денге (наприклад, заражених одним або більше з DEN1, DEN2, DEN3 або DEN4), а також тих, хто схильний до інфекції, або будь-яку людину, для якої бажано знизити імовірність зараження.

Вакцинні композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу можуть бути складені і введені пацієнту із застосуванням методів, добре відомих в даній галузі техніки. Керівництво з фармацевтичного введення, загалом, представлено в, наприклад, *Vaccines Eds. Plotkin and Orenstein, W.B. Sanders Company, 1999; Remington's Pharmaceutical Sciences 20<sup>th</sup> Edition, Ed. Gennaro, Mack Publishing, 2000; и Modern Pharmaceutics 2<sup>nd</sup> Edition, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990.*

Отже, у винаході представлений спосіб виклику захисної імунної реакції у пацієнта проти зараження денге, який включає стадію введення пацієнту імунологічно ефективної кількості будь-якої вакцинної композиції від вірусу денге, описаної тут. У одному варіанті вакцинну композицію від вірусу денге вводять спільно, в поєднанні з іншими вакцинами для лікування або профілактики захворювань від вірусу Зіка, кору-паротиту-краснухи або вітряної віспи.

Також в даному винаході представлений спосіб лікування зараження денге, або лікування будь-якого патологічного стану, асоційованого із зараженням денге, де таке лікування включає профілактику зараження і зниження тяжкості клінічних симптомів, затримку або запобігання розвитку захворювання і/або зниження імовірності зараження або його клінічних симптомів; де спосіб включає стадію введення пацієнту імунологічно ефективної кількості будь-якої з вакцинних композицій, описаних тут.

Додаткові варіанти винаходу включають введення двох або більше композицій відповідно до даного винаходу пацієнту в режимі примування/стимулювання. Отже, винахід стосується способу профілактики або зниження імовірності зараження денге у пацієнта, який потребує такого, що включає стадії:

(a) введення першої вакцинної композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу пацієнту;

(b) очікування протягом певного періоду часу після стадії (a);

(c) введення пацієнту другої вакцинної композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу; і

(d) необов'язково, повторення стадій (b) і (c);

де у пацієнта запобігається зараження денге або знижується імовірність зараження денге.

У варіантах вказаного вище способу вакцинні композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу мають форму замороженої рідини. У альтернативних варіантах вакцинні композиції від вірусу денге ліофілізовані або висушені мікрохвилями і відновлені стерильним розріджувачем до введення пацієнту.

Кількість часу між першою дозою вакцинної композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу і другою дозою вакцинної композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу або будь-якої подальшої дози становить від приблизно 2 тижнів до приблизно 2 років. У переважних варіантах винаходу час, який проходить між множиною введень, становить від 2 місяців до 12 місяців. У альтернативних варіантах цього аспекту винаходу кількість часу між кожним введенням кожної дози вакцинної композиції незалежно вибирають із групи, яка складається з 2 тижнів, 1 місяця, 2 місяців, 3 місяців, 4 місяців, 5 місяців, 6 місяців, 7 місяців, 8 місяців, 9 місяців, 10 місяців, 11 місяців, 12 місяців, 13 місяців, 14 місяців, 15 місяців, 16 місяців, 17 місяців, 18 місяців, 19 місяців, 20 місяців, 21 місяця, 22 місяців, 23 місяців і 24 місяців.

У деяких варіантах винаходу перша і друга вакцинні композиції від вірусу денге є однаковими. У альтернативних варіантах перша і друга вакцинні композиції від вірусу денге є не однаковими.

Вакцинні композиції від вірусу денге відповідно до даного винаходу можуть вводитися різними способами. У переважних варіантах винаходу композиції відповідно до даного винаходу вводять парентерально, наприклад, внутрішньошкірно, підшкірно або внутрішньом'язово. Підшкірне і внутрішньом'язове введення може проводитися із застосуванням, наприклад, голкових або безголкових шприців.

Описані тут композиції можуть вводитися методом, сумісним зі складом, що дозується, і в такій кількості, яка є імунологічно ефективною для лікування і/або зниження імовірності зараження денге. Доза, що вводиться пацієнту в контексті даного винаходу, повинна бути достатньою для виклику позитивної реакції у пацієнта протягом часу, такої як зниження рівня вірусу денге, або для зниження імовірності зараження денге. Кількість вакцин, що вводяться від вірусу денге, може залежати від пацієнта, який лікується, включаючи вік, стать, масу тіла і загальний стан здоров'я. У зв'язку з цим точна кількість вакцини, необхідна для введення, буде базуватися на думці лікуючого лікаря. При визначенні ефективної кількості вакцини, що вводиться при лікуванні або профілактиці зараження денге, терапевт може оцінити рівні в плазмі, розвиток захворювання і утворення антитіл проти денге. У будь-якому випадку придатні дози імуногенних композицій відповідно до даного винаходу можуть бути легко визначені фахівцем в даній галузі техніки.

Придатні режими дозування переважно визначають, беручи до уваги фактори, добре відомі в даній галузі техніки, включаючи вік, масу тіла, стать і медичний стан пацієнта; спосіб введення; бажаний ефект; і конкретну композицію, що застосовується. Час прийому доз залежить від факторів, добре відомих в даній галузі техніки, і можуть варіюватися від 2 тижнів до 24 місяців. Після початкового введення, одна або більше додаткових доз можуть бути введені для підтримки і/або збільшення титрів антитіл.

Винахід також стосується способів профілактики зараження денге або профілактики або полегшення його симптомів, що включають стадії: введення пацієнту, у якого запобігають або полегшують зараження денге або його симптоми, композицій вакцини від вірусу денге. Інші варіанти цього аспекту винаходу включають проходження певної кількості часу між введенням вакцинної композиції від вірусу денге і введенням другої дози вакцинної композиції від вірусу денге.

У описаному вище способі перша вакцина від денге є, переважно, чотиривалентною, і містить DEN1, DEN2, DEN3 і DEN 4 компонент, де кожний компонент містить або живий атенуйований вірус денге, або живий атенуйований химерний флавівірус, як описано тут. У типових варіантах жива атенуйована вакцина денге містить чотири химерні флавівіруси; де кожний з химерних флавівірусів містить rM і E білки одного серотипу вірусу денге і капсидний і неструктурний білки різних флавівірусів, де кожний з химерних флавівірусів послаблений. У певних варіантах капсидний і неструктурний білки чотирьох химерних флавівірусів походять із вірусу жовтої гарячки. У альтернативних варіантах капсидний і неструктурний білки кожного з чотирьох химерних флавівірусів походять з інших серотипів денге, ніж rM і E білки.

У деяких варіантах цього аспекту винаходу другою вакциною від денге є чотиривалентна рекомбінантна субдинична вакцина від денге, яка містить E білки денге або їх фрагменти, з DEN1, DEN2, DEN3 і DEN4. Субдиничні вакцини, що застосовуються в способі відповідно до даного винаходу, описані тут. У переважних варіантах кожний з білків E становить приблизно 80 % довжини дикого типу E з DEN1, DEN2, DEN3 і DEN4, починаючи від залишку амінокислоти 1 на N-кінці.

#### Приклади

Приклади послідовностей живого атенуйованого вірусу денге, що застосовуються в цих дослідженнях, включають rDEN1 - rDEN1 $\Delta$ 30-1545 PMVS (SEQ ID NO: 6); rDEN2 - rDEN2/4 $\Delta$ 30(ME)-1495,7163 PMVS (SEQ ID NO: 7); rDEN3 - rDEN3 $\Delta$ 30/31-7164 PMVS (SEQ ID NO: 8); і rDEN4 - rDEN4 $\Delta$ 30-7132,7163,8308 PMVS (SEQ ID NO: 9).

Таблиця 1

Короткий опис змін послідовності PMVS DENV1

Номер нуклеотиду	Ген	Зміна нуклеотиду		Номер амінокислоти білка	Зміна амінокислоти	
		дт	PMVS		дт	PMVS
1544*	E	A	C	484	Lys	Arg
1545	E	A	G	484	Lys	Arg
1549*	E	A	G	485	Ser	Ser

\*Введений з метою стабілізації і клонування

Таблиця 2

Короткий опис змін послідовності PMVS DENV2

Номер нуклеотиду	Ген	Зміна нуклеотиду		Номер амінокислоти білка	Зміна амінокислоти	
		Оригінальний клон КДНК	PMVS		Оригінальний клон КДНК	PMVS
183	C	T	C	28	Leu	Leu
1490	E	G	A	184	Glu	Glu
1495	E	C	U	186	Ser	Phe
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
7166	NS4b	C	G	113	Val	Val
7169	NS4b	T	C	114	His	His

Таблиця 3

Короткий опис змін послідовності PMVS DENV3

Номер нуклеотиду	Ген	Зміна нуклеотиду		Номер амінокислоти білка	Зміна амінокислоти	
		дт	PMVS		дт	PMVS
1539	E	A	G	202	Lys	Arg
1681	E	A	G	250	Val	Val
2095	E	C	U	388	Ile	Ile
7164	NS4b	T	C	115	Val	Ala
7304	NS4b	T	C	162	Ser	Pro
8082	NS5	A	G	173	Lys	Arg
10533	3'HTP	G	A	N/A	N/A	N/A

Таблиця 4

Короткий опис змін послідовності PMVS DENV4

Номер нуклеотиду	Ген	Зміна нуклеотиду		Номер амінокислоти білка	Зміна амінокислоти	
		Оригінальний клон КДНК	PMVS		Оригінальний клон КДНК	PMVS
2440	NS1	T	C	6	Val	Ala
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7153	NS4b	T>C	U	109	Val>Ala	Val
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
8308	NS5	A>G	G	249	Lys>Arg	Arg

5

DENV1, 2, 3 і 4 дикий тип і оригінальний клон КДНК у вказаних вище таблицях відповідають серотипу вірусу денге, описаному в Whitehead, S. S. et al., J Virol 77:1653-1657 (2003); Blaney, J. E. et al. The American journal of tropical medicine and hygiene 71:811-821 (2004); Blaney, J. E., Jr. et al., BMC Infect Dis 4:39 (2004); Durbin, A. P. et al., The American journal of tropical medicine and

hygiene 65:405-413 (2001).

Вказані вище версії живого атенуйованого вірусу денге позначені як DENV1 або DEN1, DENV2 або DEN2, DENV3 або DEN3 і DENV4 або DEN4 нижче в прикладах. Для прикладів 1-6 склади мають питому активність  $2 \times 10^5$  БУО/мл кожного DENV1, DENV2, DENV3 або DENV4. Для прикладів 7-10 склади мають питому активність  $1,5 \times 10^5$  БУО/мл кожного DEN1, DEN2, DEN3 або DEN4.

Приклад 1

Дія СМС, ПГ і амінокислот (порівняно зі складом Dengvaxia®) на DENV4

Три окремі аналізи провели для дослідження дії різних ексципієнтів на вихід ліофілізації і стабільність DENV4. Склади перераховані в таблиці 5.

Таблиця 5

Композиції складів

Номер складу	Композиція
1	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 30 мМ хлориду натрію рН 7,5
2	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози рН 7,5
3	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію рН 7,5
4	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію рН 7,5
5	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
13	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 25 мг/мл сорбіту, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію рН 7,5
18	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L аргініну рН 7,5
19	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L глутамінової кислоти рН 7,5
20	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L лейцину рН 7,5
21	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L проліну рН 7,5
22	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл гліцерину рН 7,5
25	11 мМ TRIS, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
26	6 мМ TRIS, 37,5 мг/мл сорбіту, 75 мг/мл сахарози, 55 мг/мл трегалози, 2,5 мг/мл сечовини, 15 мг/мл суміші амінокислот <sup>†</sup>
45	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
46	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 30 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
47	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 15 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
50	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду калію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
55	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл гліцерину, 5 мг/мл сечовини рН 7,5
56	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 201 мг/мл середовища Лейбовіца L-15 без фенолового червоного*, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю рН 7,5
57	5,5 мМ TRIS, 5,5 мМ L гістидину, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L лейцину рН 7,5
81	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L лейцину рН 7,5

## Композиції складів

Номер складу	Композиція
98	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L лейцину, 0,01 % полоксамеру 188 рН 7,5
104	11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ хлориду натрію, 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію, 5 мг/мл пропіленгліколю, 25 мМ L лейцину, 25 мМ L глутамінової кислоти, рН 7,5

\* Середовище Лейбовіца L-15 без фенолового червоного є розчином виробництва Nuclone Laboratories, Inc.

Аналіз 1: DENV4 складають у 11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози і 75 мМ NaCl (склад 3) з додаванням 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію (КМЦ натрію) (склад 4) або додаванням 5 мг/мл КМЦ натрію і 5 мг/мл пропіленгліколю (склад 5).

5 Аналіз 2: Склад 5 тестують проти порівнянних складів, які містять або 25 мМ лейцину (склад 20) або 25 мМ проліну (склад 21), а також 11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію і 5 мг/мл пропіленгліколю.

10 Аналіз 3: Склад 20 тестують проти порівнянного складу, який містить 11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію і 5 мг/мл пропіленгліколю і 25 мМ глутамінової кислоти (склад 19) і складу Dengvaxia® (склад 26), який складається з 37,5 мг/мл сорбіту, 75 мг/мл сахарози, 55 мг/мл трегалози, 25 мг/мл сечовини, 6 мМ TRIS, 15 мг/мл суміші амінокислот.

15 Для всіх аналізів зразки заморожують і частину зберігають при -70 °C у вигляді заморожених рідких контролів, а частину ліофілізують. Після ліофілізації деякі зразки зберігають при -70 °C як контроль, і ті, що залишилися, вміщують при 25 °C на 1 тиждень. Після інкубування зразки 25 °C заморожують і тестують в аналізі відносної інфекційності денге (АВІД) разом із замороженими рідкими контролями і замороженими ліофілізованими контролями. Тестують два окремі флакони кожного зразка.

20 АВІД є клітинним аналізом відносно інфекційності, що застосовується для вимірювання інфекційності зразків складу вірусу денге, на основі експресії оболонкового білка. Клітини Vero вміщують в 96-ямокві титрувальні мікропланшети, інкубують протягом 24 годин і потім заражають серійним розбавленням DEN1, DEN2, DEN3 і/або DEN4 посилальний стандартом і позитивним контролем, специфічним для серотипу, що тестується, на доповнення до продуктів, що тестуються. Заражені клітини інкубують протягом 48 годин, і потім фіксують клітини розбавленням розчином формальдегіду. Фіксовані клітини потім пермеабілізують перед додаванням первинного антитіла (кролячого анти-DEN серотип-специфічного mAb) в планшети і інкубуванням протягом ночі. Після промивання планшетів вторинне антитіло (ослячий NL637-кон'югований антикролячий IgG, R&D Systems) додають в ямку й інкубують при кімнатній температурі протягом >2 год. Після промивання планшетів додають ФСБ в ямку у препарат для аналізу зображень із застосуванням рідера для візуалізації MiniMax (Molecular Devices).

30 Відносну активність (% VA) зразків (відносно посилального стандарту) розраховують із застосуванням програми SoftMAX Pro (Molecular Devices) із застосуванням зменшеної 4-параметричної логістичної кривої.

35 Вихід ліофілізованих зразків розраховують діленням результату інфекційності ліофілізованого зразка на результат інфекційності замороженого рідкого контролю. Для розрахунку логістичної функції втрати після зберігання при 25 °C протягом одного тижня значення інфекційності перетворюють в логарифмічну шкалу, і логарифмічний результат для 1 тижня при 25 °C віднімають від результату -70 °C ліофілізованого контролю для кожного складу.

40 Синергетичний ефект спостерігають для поєднання КМЦ натрію і пропіленгліколю, що дає поліпшений вихід ліофілізації і стабільність. Додавання лейцину додатково поліпшує вихід і стабільність. Склади, які містять КМЦ натрію, пропіленгліколь і лейцин або глутамінову кислоту, дають поліпшений вихід ліофілізації порівняно зі складом Dengvaxia. Див. фігури 1-2. Точку стабільності зразків 1 тиждень 25 °C для складу 26 не тестують через руйнування коржика після зберігання при 25 °C.

45

## Приклад 2

Дія цукрового спирту на DENV4:

DENV4 складають в основному складі 11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ NaCl і 5 мг/мл КМЦ натрію рН 7,5 з 5 мг/мл пропіленгліколю (склад 5), 5 мг/мл гліцерину (склад 22) або 25 мг/мл сорбіту (склад 13) як цукрових спиртів.

Зразки заморожують, і частину зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$  у вигляді заморожених рідких контролів, а частину ліофілізують. Після ліофілізації деякі зразки зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$ , і ті, що залишилися, вміщують при  $25^{\circ}\text{C}$  на 1 тиждень. Після інкубування  $25^{\circ}\text{C}$  зразки заморожують і тестують в аналізі відносної інфекційності денге разом із замороженими рідкими контролями і замороженими ліофілізованими контролями. Тестують два окремі флакони кожного зразка.

Вихід ліофілізації розраховують діленням результату інфекційності ліофілізованого зразка на результат інфекційності замороженого рідкого контролю. Для розрахунку логістичної функції втрати після зберігання при  $25^{\circ}\text{C}$  протягом одного тижня значення інфекційності перетворюють у логарифмічну шкалу, і логарифмічний результат для 1 тижня при  $25^{\circ}\text{C}$  віднімають від результату  $-70^{\circ}\text{C}$  ліофілізованого контролю для кожного складу.

Цей приклад демонструє, що і пропіленгліколь, і гліцерин поліпшують вихід ліофілізації і стабільність DENV4 порівняно із сорбітом (див. фігури 3 і 4).

## Приклад 3

Дія рН на DENV4:

DENV4 складають у склад 22 (11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію, 5 мг/мл гліцерину при рН 7,0, 7,5 або 8,0).

Зразки заморожують, і частину зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$  у вигляді заморожених рідких контролів, а частину ліофілізують. Після ліофілізації деякі зразки зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$ , і ті, що залишилися, вміщують при  $25^{\circ}\text{C}$  на 1 тиждень. Після інкубування  $25^{\circ}\text{C}$  зразки заморожують і тестують в аналізі відносної інфекційності денге разом із замороженими рідкими контролями і замороженими ліофілізованими контролями. Тестують два окремі флакони кожного зразка.

Вихід ліофілізації розраховують діленням результату інфекційності ліофілізованого зразка на результат інфекційності замороженого рідкого контролю. Для розрахунку логістичної функції втрати після зберігання при  $25^{\circ}\text{C}$  протягом одного тижня значення інфекційності перетворюють у логарифмічну шкалу, і логарифмічний результат для 1 тижня при  $25^{\circ}\text{C}$  віднімають від результату  $-70^{\circ}\text{C}$  ліофілізованого контролю для кожного складу.

Фігури 5 і 6 демонструють, що DENV4 може бути складений у склад 22 при рН 7,0 до рН 8,0.

## Приклад 4

Дія буферу на DENV4:

У аналізі 1 DENV4 складають в основний склад 90 мг/мл сахарози, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію і 5 мг/мл гліцерину з альтернативними буферними системами, доведеними до рН 7,5. Склад 22 містить 11 мМ фосфату калію і склад 25 містить 11 мМ TRIS на доповнення до основного складу.

У аналізі 2 DENV4 складають в основний склад 90 мг/мл сахарози, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію і 5 мг/мл пропіленгліколю з альтернативними буферними системами, доведеними до рН 7,5. Склад 5 містить 11 мМ фосфату калію і склад 57 містить поєднання 5,5 мМ гістидину і 5,5 мМ TRIS на доповнення до основного складу.

Зразки заморожують, і частину зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$  у вигляді заморожених рідких контролів, а частину ліофілізують. Після ліофілізації деякі зразки зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$ , і ті, що залишилися, вміщують при  $25^{\circ}\text{C}$  на 1 тиждень. Після інкубування  $25^{\circ}\text{C}$  зразки заморожують і тестують в аналізі відносної інфекційності денге разом із замороженими рідкими контролями і замороженими ліофілізованими контролями. Тестують два окремі флакони кожного зразка.

Вихід ліофілізації розраховують діленням результату інфекційності ліофілізованого зразка на результат інфекційності замороженого рідкого контролю. Для розрахунку логістичної функції втрати після зберігання при  $25^{\circ}\text{C}$  протягом одного тижня значення інфекційності перетворюють у логарифмічну шкалу, і логарифмічний результат для 1 тижня при  $25^{\circ}\text{C}$  віднімають від результату  $-70^{\circ}\text{C}$  ліофілізованого контролю для кожного складу.

Фігури 7 і 8 демонструють, що DENV4 може бути складений у множині буферних систем при рН 7,5, включаючи фосфат калію, TRIS або поєднання гістидину і TRIS.

## Приклад 5

Дія NaCl на DENV4:

DENV4 складають у основний склад 11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 5 мг/мл КМЦ натрію і 5 мг/мл пропіленгліколю з інтервалом концентрації NaCl 15-75 мМ.

Зразки заморожують, і частину зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$  у вигляді заморожених рідких контролів, а частину ліофілізують. Після ліофілізації деякі зразки зберігають при  $-70^{\circ}\text{C}$ , і ті, що

залишилися, вміщують при 25 °С на 1 тиждень. Після інкубування 25 °С зразки заморожують і тестують в аналізі відносної інфекційності денге разом із замороженими рідкими контролями і замороженими ліофілізованими контролями. Тестують два окремі флакони кожного зразка.

5 Вихід ліофілізації розраховують діленням результату інфекційності ліофілізованого зразка на результат інфекційності замороженого рідкого контролю. Для розрахунку логістичної функції втрати після зберігання при 25 °С протягом одного тижня значення інфекційності перетворюють у логарифмічну шкалу, і логарифмічний результат для 1 тижня при 25 °С віднімають від результату -70 °С ліофілізованого контролю для кожного складу.

10 Фігури 9 і 10 показали, що вихід ліофілізації і стабільність DENV4 протягом 1 тижня при 25 °С були однаковими при зміні концентрації від 15 до 75 мМ.

Приклад 6

Дія пропіленгліколю і гліцерину на всі серотипи денге:

15 DENV1, DENV2, DENV3 і DENV4 готують у вигляді одновалентних лікарських продуктів у складі 5 (11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ, 5 мг/мл пропіленгліколю), складі 20 (11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 50 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ, 5 мг/мл пропіленгліколю і 25 мМ лейцину) і складі 22 (11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 75 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ, 5 мг/мл гліцерину) при рН 7,5.

20 Зразки заморожують, і частину зберігають при -70 °С у вигляді заморожених рідких контролів, а частину ліофілізують. Після ліофілізації деякі зразки зберігають при -70 °С, і ті, що залишилися, вміщують при 25 °С на 1 тиждень. Після інкубування 25 °С зразки заморожують і тестують в аналізі відносної інфекційності денге разом із замороженими рідкими контролями і замороженими ліофілізованими контролями. Тестують два окремі флакони кожного зразка.

25 Вихід ліофілізації розраховують діленням результату інфекційності ліофілізованого зразка на результат інфекційності замороженого рідкого контролю. Для розрахунку логістичної функції втрати після зберігання при 25 °С протягом одного тижня, значення інфекційності перетворюють у логарифмічну шкалу, і логарифмічний результат для 1 тижня при 25 °С віднімають від результату -70 °С ліофілізованого контролю для кожного складу.

Фігури 11 і 12 показують, що пропіленгліколь і гліцерин стабілізують всі чотири серотипи в поєднанні із сахарозою, NaCl і КМЦ натрію.

30 Приклад 7

СФГ (сахароза, фосфат калію, глютамінова кислота) отримують у вигляді 10X розчину з концентрацією, вказаною нижче в таблиці 6.

Таблиця 6

Сахароза (кристали)	746,2 мг/мл
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> (одноосновний, безводний)	5,17 мг/мл
К <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> (двоосновний, безводний)	12,54 мг/мл
L-глютамінова кислота (мононатрієва сіль, моногідрат)	11,2 мг/мл

35 Також отримують наступні інші розчини: 650 мг/мл сахарози, 650 мг/мл трегалози, дигідрат, 200 мг/мл желатину, 150 мг/мл аргініну і 20 мг/мл людського сироваткового альбуміну (ЛСА).

СФГ, сахарозу, трегалозу, желатин, аргінін і ЛСА фільтрують з ПЕС 0,22 мкм фільтрами Stericup. Розчини, L-15 Лейбовіца і DEN1 об'єднують з отриманням кінцевих складів, показаних нижче:

40

Таблиця 7

Rx#	Склади
1	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глютамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози
2	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глютамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози
4	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глютамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 2,5 мг/мл ЛСА
5	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глютамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 25 мг/мл Желатину
6	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глютамінової кислоти, 150 мг/мл Сахарози
7	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глютамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози

Таблиця 7

Rx#	Склади
9	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози, 40 мг/мл Аргініну
11	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози
12	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 25 мг/мл Желатину
13	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози, 40 мг/мл Аргініну

Склади заповнюють в 2R скляні флакони у кількості 0,5 мл і заморожують при -115 °С протягом 15 хвилин. Після заморожування флакони сушать у мікрохвильовій вакуумній сушарці (МХС). Після сушіння деякі флакони вміщують для тестування стабільності при 25 °С на 1 тиждень. Потім флакони піддають тестуванню активності із застосуванням аналізу відносної інфекційності денге (АВІД).

Спосіб мікрохвильового сушіння

Продукт, який висушується в мікрохвильовій вакуумній сушарці (МХС), заморожують в інтенсивному потоці повітря і завантажують у сушильну камеру. У камері швидко створюють вакуум до нижче 100 мТорр. Після досягнення встановлення вакууму, магнетрони (тобто кількість магнетрона і вихідну потужність) вибирають так, щоб почати сушіння продукту. Мікрохвилі (опромінення використовують у форматі блукаючої хвилі) працюють у режимі сканування з алгоритмом, який циклічно повторює вибрані магнетрони (наприклад, 2 магнетрони із всього 4 магнетронів), вмикаючи і вимикаючи кожні 30 секунд для однорідного розподілу енергії. Більше того: гідродинамічне навантаження у верхній частині пристрою дозволяє однократне проходження мікрохвилі через зразок, що мінімізує будь-яке втручання відбитої мікрохвилі, тим самим дозволяючи контрольовану сублімацію. Енергію збільшують через цикл сушіння для досягнення кінцевої температури 30-45 °С. Після сушіння вакуум руйнують у камері, і продукт герметично запечатують.

Таблиця 8

Rx#	1	2	4	5	6	7	9	11	12	13
Rx	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 2,5 мг/мл ЛСА	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 25 мг/мл Желатину	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 150 мг/мл Сахарози	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози	250 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози, 40 мг/мл Аргініну	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 25 мг/мл Желатину	450 мг/мл L-15, 11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози, 40 мг/мл Аргініну
Вихід З/Р (%)	55	88	142	102	61	69	53	23	98	29
Вихід сушіння (%)	62	59	67	83	64	78	6	167	98	10
Ср. лог. втрати	0,45	0,26	0,23	0,19	0,33	0,35	3,65	0,36	0,27	2,11

Вихід після заморожування/розморожування (З/Р), вихід після сушіння і логістичної функції втрати при 25 °С протягом 1 тижня визначають для всіх складів. Вихід після заморожування/розморожування (З/Р) розраховують діленням заявленої відносної активності на очікувану відносну активність для заморожених контролів при -70 °С. Вихід після сушіння розраховують діленням відносної активності висушеного продукту на відносну активність замороженого контролю. Логістичну функцію втрати розраховують перетворенням відносної активності в момент часу T0 висушеного продукту і продукту після тестування стабільності

протягом 1 тижня при 25 °С в логарифми розрахунком Log10. Після перетворення цифр у логарифм, момент часу стабільності віднімають від моменту часу T0 для визначення логістичної функції втрати при 25 °С протягом 1 тижня.

5 Склади 2, 4, 5 і 12 показали найкраще поєднання виходу З/Р, виходу після сушіння і логістичної функції втрати при 25 °С протягом одного тижня. Всі чотири склади містять  $\geq 25\%$  дисахариду (сахарози і/або трегалози).

Таблиця 9

Перелік інтервалів ексципієнтів складів із таблиці 7

Ексципієнти	Кількість (на дозу 0,5 мл)
Сахароза	37,5 мг - 75 мг
Фосфат калію (одноосновний, безводний)	~0,26 мг
Фосфат калію (двоосновний, безводний)	~0,63 мг
L-глутамінова кислота (мононатрієва сіль, моногідрат)	0,56 мг
Трегалоза	37,5 мг - 87,5 мг
Людський сироватковий альбумін (ЛСА)	1,25 мг
Аргінін	20 мг
Желатин	12,5 мг

Приклад 8

10 СФГ (сахароза, фосфат калію, глутамінова кислота) отримують за прикладом 7.

Також отримують наступні інші розчини: 650 мг/мл сахарози, 650 мг/мл трегалози, 5М хлориду натрію (NaCl) і 10 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію (КМЦ натрію).

Всі розчини фільтрують через ПЕС 0,22 мкм фільтри Stericup. Розчини і вірус денге DEN1 або DEN4 об'єднують з отриманням кінцевих складів, показаних в таблиці з результатами.

15 Склади заповнюють в 2R скляні флакони у кількості 0,5 мл і заморожують при -115 °С протягом 15 хвилин. Після заморожування флакони сушать у мікрохвильовій вакуумній сушарці (МХС). Після сушіння деякі флакони вміщують для тестування стабільності при 25 °С на 1 тиждень. Потім флакони піддають тестуванню активності із застосуванням аналізу відносної інфекційності денге (АВІД).

20

Таблиця 10

Склади	DEN1 Ср. лог. втрати 25 °С 1 тиждень	DEN4 Ср. лог. втрати 25 °С 1 тиждень	Залишкова волога (%)
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози	0,55	0,55	5,65±0,75
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 30 мМ NaCl	0,46	0,54	5,61±0,40
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 175 мг/мл Трегалози, 30 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію	0,60	0,59	4,58±0,33
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози	1,12	0,95	3,71±0,22
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози, 30 мМ NaCl	0,96	0,51	4,75±0,54
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Сахарози, 75 мг/мл Трегалози, 30 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ натрію	1,07	0,65	3,98±0,01
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Трегалози	0,83	1,82	2,20±0,12
11 мМ Фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 75 мг/мл Трегалози, 30 мМ NaCl	1,18	1,33	3,43±0,19

Логістичну функцію втрати розраховують перетворенням відносної активності у момент часу T0 висушеного продукту і продукту після тестування стабільності протягом 1 тижня при 25 °С в

логарифми розрахунком Log10. Після перетворення цифр в логарифм момент часу стабільності віднімають від моменту часу T0 для визначення логістичної функції втрати при 25 °С протягом 1 тижня.

Результати показали, що для складів DEN1, що містять  $\geq 25\%$  дисахаридів, спостерігається найменша логістична функція втрати при 25 °С протягом одного тижня. Склади DEN4 з  $\geq 15\%$  дисахаридів і 30 мМ солі мали найменшу логістичну функцію втрати при 25 °С протягом одного тижня. Для складів, що містять  $\geq 15\%$  дисахаридів і сіль, додавання КМЦ натрію допомогло знизити залишкову вологу.

Таблиця 11

Перелік інтервалів ексципієнтів складів із таблиці 10

Ексципієнти	Кількість (на 0,5 мл дози)
Сахароза	0 мг - 37,5 мг
Фосфат калію (одноосновний, безводний)	~0,26 мг
Фосфат калію (двоосновний, безводний)	~0,63 мг
L-глутамінова кислота (мононатрієва сіль, моногідрат)	0,56 мг
Трегалоза	37,5 мг - 87,5 мг
Карбоксиметилцелюлоза натрію	2,5 мг
Хлорид натрію	0,88 мг

ПРИКЛАД 9

Склади 1x СФГ (11 мМ фосфату калію, 6 мМ L-глутамінової кислоти, 0,22 М сахарози) з кількостями, що змінюються, L-15 (90 %, 45 % і 25 %) і DEN1, DEN2, DEN3 або DEN4. Основним компонентом в L-15 Лейбовіца є NaCl (137,39 мМ). Тому 90 % L-15 дорівнює 123,65 мМ NaCl, 45 % L-15 дорівнює 61,83 мМ NaCl і 25 % L-15 дорівнює 34,35 мМ NaCl.

Склади заповнюють у 2R скляні флакони у кількості 0,5 мл і заморожують при -115 °С протягом 15 хвилин. Після заморожування флакони сушать у мікрохвильовій вакуумній сушарці (МХС). Потім флакони піддають тестуванню активності із застосуванням аналізу відносної інфекційності денге (АВІД).

Склади, швидко висушені у МХС, були більш стабільними, ніжклади, висушені ліофілізацією (див. фігури 13-16). У вказаному вище складі виявилось, що концентрація солі  $\geq 61,83$  мМ NaCl поліпшує стабільність DEN4 під час сушіння, що не спостерігається для інших трьох типів (DEN1, DEN2 і DEN3).

Приклад 10

Також роблять наступні розчини: 500 мг/мл сахарози, 250 мг/мл трегалози, 1М хлориду натрію (NaCl) і 10 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію (КМЦ натрію), 100 мг/мл полівінілпіролідону (ПВП), 100 мМ фосфату калію, 500 мг/мл пропіленгліколю і стерильна вода.

Всі розчини фільтрують через ПЕС 0,22 мкм фільтри Stericup. Розчини і вірус денге (DEN1) об'єднують з отриманням наступних складів: 11 мМ фосфату калію, 90 мг/мл сахарози, 5 мг/мл КМЦ натрію, 5 мг/мл ПГ; 11 мМ фосфату калію, 200 мг/мл сахарози, 50 мг/мл ПВП К12; 11 мМ фосфату калію, 75 мг/мл сахарози, 175 мг/мл трегалози, 30 мМ NaCl, 5 мг/мл КМЦ.

Склади заповнюють у 2R скляні флакони у кількості 0,5 мл і заморожують при -115 °С протягом 15 хвилин. Після заморожування флакони сушать у мікрохвильовій вакуумній сушарці (МХС). Потім флакони піддають тестуванню активності із застосуванням аналізу відносної інфекційності денге (АВІД).

Фігура 17 показує, що відносна активність флаконів для складів, висушених в мікрохвильовій вакуумній сушарці, більше або дорівнює тим, які висушені в ліофілізаторі.

Перелік інтервалів ексципієнтів складів із фігури 17

Ексципієнти	Кількість (на 0,5 мл дози)
Сахароза	37,5 мг - 100 мг
Фосфат калію (одноосновний, безводний)	~0,26 мг
Фосфат калію (двоосновний, безводний)	~0,63 мг
Трегалоза	87,5 мг
Карбоксиметилцелюлоза натрію	2,5 мг
Хлорид натрію	0,88 мг
ПВП К12	25 мг
Пропіленгліколь	2,5 мг

Приклад 11

Чотиривалентні складі (склад 20) DENV1, DENV2, DENV3 і DENV4 ліофілізують і зберігають при 37 °С протягом одного тижня (фігура 18А), 25 °С протягом одного місяця (фігура 18В) і 2-8 °С протягом 18 місяців (фігури 19А-Д). Активність аналізують аналізом бляшкоутворення (як описано раніше в тексті) в кожний момент часу. Контрольний зразок, що зберігається при -70 °С, тестують в аналізі бляшкоутворення в тому ж прогоні аналізу, як і кожний момент часу перевірки стабільності. Логістичну функцію втрати для кожного моменту часу розраховують відніманням логарифмічного результату стабільності зразка від -70 °С контрольного зразка. Фігури 18А-В і 19А-Д показують логістичну функцію втрати протягом часу для кожного із серотипів у чотиривалентному складі 20. Стопчик помилки означають дві стандартні помилки середньої логістичної функції втрати, розрахованої в кожний момент часу. Склад 20 забезпечує термічну стабільність для всіх чотирьох серотипів денге у чотиривалентній вакцині при 37 °С, 25 °С і 2-8 °С, що підтверджується мінімальною втратою активності, що спостерігається через 1 тиждень, 1 місяць і 18 місяців, відповідно.

Приклад 12

Аналіз бляшкоутворення з високою пропускнуою спроможністю

Аналіз бляшкоутворення з високою пропускнуою спроможністю, аналіз "мікробляшки (мкБ)" є автоматизованим, мініатюризованим аналізом бляшкоутворення денге, що проводиться в 96-ячковому мікропланшеті. Коротко, клітини Vero висівають у планшети для культивування тканин з чорними стінками і прозорим дном в БСС OptiPro з 2 % L-глутаміном у кількості 40000 клітин на ямку. Клітини залишають з'єднуватися протягом ночі при 37 °С, 5 % рCO<sub>2</sub>, >90 % ВВ. Вірус попередньо розбавляють у відновленому сироватковому середовищі OptiMEM і потім серійно розбавляють 1:2 у середовищі в ультранизких планшетах для сполуки. Рослинне середовище видаляють із клітинних планшетів, застосовуючи обережне відсмоктування, і 25 мкл/ямку інокуляту переносять з планшета для серійного розбавлення в клітинний планшет. Адсорбція вірусу проходить протягом 4 годин при 37 °С, 5 % рCO<sub>2</sub>, >90 % ВВ. Після інкубування адсорбції 175 мкл/ямку двофазного поживного середовища додають у кожну ямку для інгібування вірусної секреції і поширення. Залежно від серотипу, зараження проходить протягом 2 або 3 днів у вказаних вище умовах інкубації.

Підраховані бляшки

БУО

Після інкубації зараження двофазне поживне середовище забирають, і клітини фіксують 3,7 % формальдегідом у ФСБ. Планшети пермеабілізують 0,5 % Triton X-100 в ФСБ, потім блокують 1 % АБС у ФСБ. Типоспецифічні кролячі моноклональні антитіла, потім антикролячі AlexaFluor488 використовують для флуоресцентного забарвлення вірусних бляшок. Планшети візуалізують із застосуванням Perkin Elmer EnSight, і флуоресцентні бляшки рахують із застосуванням алгоритму автоматизованого підрахунку. Титр визначають із застосуванням рівняння нижче з ямок, які містять імпульси дійсного об'єкта, які потрапляють у критерії підрахунку (типозалежні). Підраховані бляшки

$$\text{Вірусний титр} \left( \frac{\text{Бляшки}}{\text{мл}} \right) = \frac{\text{Підраховані бляшки}}{\text{Об'єм інокуляту (мл)}} \times \text{загальне розбавлення}$$

Проводять два дослідження, в яких чотиривалентні складі DENV1, DENV2, DENV3 і DENV4 ліофілізують у складах, описаних в таблиці 13, і зберігають при 25 °С протягом одного тижня. Кожний склад містить 9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu при рН 7,5 і

5 різні кількості КМЦ або ПГ. Активність аналізують аналізом бляшкоутворення з високою пропускною спроможністю, описаним вище, в кожний момент часу. Контрольний зразок, що зберігається при -70 °С, також тестують в аналізі. Логістичну функцію втрати для кожного моменту часу розраховують відніманням логарифмічного результату стабільності зразка з -70 °С контрольного зразка. У таблицях 14a і 14b показані логістичні функції втрати протягом часу для кожного із серотипів у різних чотиривалентних складах. Концентрації 0,2 %-1 % КМЦ або ПГ у різних поєднаннях показують однакову стабільність один для одного і підвищену стабільність для складів без поєднання.

Таблиця 13.

Чотиривалентні склади

Повний склад	Зміна складу	Номер складу
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	Без КМЦ або ПГ	140
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,5 % КМЦ, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	Тільки КМЦ	141
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,2 % КМЦ, 0,2 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,2 % КМЦ, 0,2 % ПГ	142
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,3 % КМЦ, 0,3 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,3 % КМЦ, 0,3 % ПГ	143
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,5 % КМЦ, 0,5 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,5 % КМЦ, 0,5 % ПГ	20
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,8 % КМЦ, 0,8 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,8 % КМЦ, 0,8 % ПГ	144
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,9 % КМЦ, 0,9 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,9 % КМЦ, 0,9 % ПГ	145
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,8 % КМЦ, 0,5 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,8 % КМЦ, 0,5 % ПГ	138
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,5 % КМЦ, 0,8 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,5 % КМЦ, 0,8 % ПГ	139
9 % сахарози, 11 мМ фосфату калію, 0,3 % КМЦ, 0,5 % пропіленгліколю, 50 мМ NaCl, 25 мМ Leu, pH 7,5	0,3 % КМЦ, 0,5 % ПГ	123

10

Таблиця 14a

Дія концентрації КМЦ і ПГ на стабільності при 25 °С

Склад	Номер складу	DENV1 лог. втрати, 1 тиждень, 25 °С	DENV2 лог. втрати, 1 тиждень, 25 °С	DENV3 лог. втрати, 1 тиждень, 25 °С	DENV4 лог. втрати, 1 тиждень, 25 °С
Без КМЦ або ПГ	140	0,41	0,38	0,42	0,43
Тільки КМЦ	141	0,47	0,40	0,52	0,31
0,2 % КМЦ, 0,2 % ПГ	143	0,23	0,20	0,27	0,10
0,3 % КМЦ, 0,3 % ПГ	20	0,27	0,18	0,15	0,04
0,5 % КМЦ, 0,5 % ПГ	144	0,18	0,16	0,23	0,04
0,8 % КМЦ, 0,8 % ПГ	145	0,22	0,17	0,09	0,22
0,9 % КМЦ, 0,9 % ПГ	138	0,16	0,12	0,03	0,16
0,8 % КМЦ, 0,5 % ПГ	139	0,15	0,07	0,21	-0,01
0,5 % КМЦ, 0,8 % ПГ	123	0,20	0,12	0,18	0,04
0,3 % КМЦ, 0,5 % ПГ	143	0,22	-,13	0,10	0,08

## Дія концентрації КМЦ і ПГ на стабільність при 25 °С

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

Всі публікації, згадані в даному документі, включені як посилання з метою опису і розкриття методологій і матеріалів, які можуть бути використані в зв'язку з даним винаходом.

- 5 Описавши тут різні варіанти винаходу з посиланням на прикладені креслення, потрібно розуміти, що винахід не обмежений цими точними варіантами, і що в нього можуть бути внесені різні зміни і модифікації фахівцем в даній галузі техніки без відступу від обсягу або суті винаходу, визначеного в прикладеній формулі винаходу.

## 10 ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Merck Sharp & Dohme Corp.  
 Ryan, Michael S.  
 Martin, Sherrie-Ann P.  
 15 Jones, Morrisa C.  
 Stanbro, Justin  
 Bhambhani, Akhilesh  
 Blue, Jeffrey Thomas  
 Pixley, Heidi Joanne  
 20 Green-Trexler, Erin, J.  
 Isopi, Lynne Anne

25 <120> СКЛАДИ ВАКЦИННИХ КОМПОЗИЦІЙ ВІД ВІРУСУ ДЕНГЕ

<130> 24547-WO-PCT

<160> 9

30 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 395

35 <212> білок

<213> денге 1

<400> 1

40 Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Ser Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr



UA 129245 C2

5 Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys  
 275 280 285  
 10 Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly  
 290 295 300  
 15 Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val  
 305 310 315 320  
 20 Phe Ser Thr Gln Asp Glu Arg Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile  
 340 345 350  
 25 Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu  
 355 360 365  
 30 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu  
 370 375 380  
 35 <210> 2  
 <211> 395  
 <212> білок  
 <213> денге 2  
 40 <400> 2  
 45 Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser  
 1 5 10 15  
 50 Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr  
 20 25 30  
 55 Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr  
 35 40 45  
 60 Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys  
 50 55 60  
 65 Leu Thr Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro  
 65 70 75 80

UA 129245 C2

Thr Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met  
 85 90 95  
 5 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly  
 100 105 110  
 10 Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Thr Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys  
 115 120 125  
 15 Ile Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Ile Thr Pro His  
 130 135 140  
 Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys  
 145 150 155 160  
 20 Glu Val Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr  
 165 170 175  
 25 Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp  
 180 185 190  
 30 Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Lys Asp Lys Ala Trp Leu Val  
 195 200 205  
 35 His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala  
 210 215 220  
 Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe  
 225 230 235 240  
 40 Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln  
 245 250 255  
 45 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met  
 260 265 270  
 50 Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg  
 275 280 285  
 55 Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly  
 290 295 300  
 60 Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile  
 305 310 315 320  
 Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro



UA 129245 C2

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Gln Gly Val Thr Ala  
 145 150 155 160  
 5  
 Glu Ile Thr Pro Gln Ala Ser Thr Val Glu Ala Ile Leu Pro Glu Tyr  
 165 170 175  
 10  
 Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn  
 180 185 190  
 15  
 Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys Ala Trp Met Val His Arg  
 195 200 205  
 20  
 Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Thr Thr  
 210 215 220  
 25  
 Glu Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu Leu Val Thr Phe Lys Asn  
 225 230 235 240  
 30  
 Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly  
 245 250 255  
 35  
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Asn Ser Gly  
 260 265 270  
 40  
 Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp  
 275 280 285  
 45  
 Lys Leu Glu Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe  
 290 295 300  
 50  
 Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile  
 305 310 315 320  
 55  
 Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser  
 325 330 335  
 60  
 Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala  
 340 345 350  
 Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu  
 355 360 365  
 Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala  
 370 375 380

Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Lys Lys Gly  
385 390

5 <210> 4  
<211> 395  
<212> білок  
<213> денге 4

10 <400> 4

Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser  
1 5 10 15

15 Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr  
20 25 30

20 Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr  
35 40 45

25 Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr Tyr Cys Ile Glu Ala Ser  
50 55 60

30 Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro  
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr Ile Cys Arg Arg Asp Val  
85 90 95

35 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly  
100 105 110

40 Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser Gly Lys Ile Thr Gly Asn  
115 120 125

45 Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Val Thr Val His  
130 135 140

50 Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp Thr Ser Asn His Gly Val  
145 150 155 160

Thr Ala Thr Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser Val Glu Val Lys Leu Pro  
165 170 175

55 Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp  
180 185 190

60 Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys Lys Lys Thr Trp Leu Val  
195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Ala Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 5  
 Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys Glu Arg Met Val Thr Phe  
 225 230 235 240  
 10  
 Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln  
 245 250 255  
 15  
 Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser  
 260 265 270  
 20  
 Gly Asp Gly Asn His Met Tyr Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg  
 275 280 285  
 25  
 Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly  
 290 295 300  
 30  
 Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr  
 305 310 315 320  
 35  
 Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro  
 325 330 335  
 40  
 Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile  
 340 345 350  
 45  
 Ser Ser Thr Pro Phe Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu  
 355 360 365  
 50  
 Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp  
 370 375 380  
 55  
 Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly  
 385 390 395  
 60  
 <210> 5  
 <211> 451  
 <212> білок  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> DEN4-80EZip  
 <400> 5  
 Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser

UA 129245 C2

	1			5					10				15			
5	Gly	Gly	Ala	Trp	Val	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	His	Gly	Gly	Cys	Val	Thr
				20					25					30		
10	Thr	Met	Ala	Gln	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Ile	Lys	Thr
			35					40					45			
15	Thr	Ala	Lys	Glu	Val	Ala	Leu	Leu	Arg	Thr	Tyr	Cys	Ile	Glu	Ala	Ser
		50					55					60				
20	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	Thr	Ala	Thr	Arg	Cys	Pro	Thr	Gln	Gly	Glu	Pro
	65					70					75					80
25	Tyr	Leu	Lys	Glu	Glu	Gln	Asp	Gln	Gln	Tyr	Ile	Cys	Arg	Arg	Asp	Val
				85						90					95	
30	Val	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu	Phe	Gly	Lys	Gly	Gly
				100					105					110		
35	Val	Val	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Ser	Cys	Ser	Gly	Lys	Ile	Thr	Gly	Asn
			115					120					125			
40	Leu	Val	Gln	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Tyr	Thr	Val	Val	Val	Thr	Val	His
		130					135					140				
45	Asn	Gly	Asp	Thr	His	Ala	Val	Gly	Asn	Asp	Thr	Ser	Asn	His	Gly	Val
	145					150					155					160
50	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Val	Glu	Val	Lys	Leu	Pro
					165						170				175	
55	Asp	Tyr	Gly	Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Cys	Glu	Pro	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp
			180						185					190		
60	Phe	Asn	Glu	Met	Ile	Leu	Met	Lys	Met	Lys	Lys	Lys	Thr	Trp	Leu	Val
			195					200					205			
65	His	Lys	Gln	Trp	Phe	Leu	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Trp	Ala	Ala	Gly	Ala
		210					215					220				
70	Asp	Thr	Ser	Glu	Val	His	Trp	Asn	Tyr	Lys	Glu	Arg	Met	Val	Thr	Phe
	225					230					235					240
75	Lys	Val	Pro	His	Ala	Lys	Arg	Gln	Asp	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ser	Gln
				245						250					255	



<400> 6  
 aguuguuagu cuacguggac cgacaagaac aguuucgaau cggaagcuug cuuaacguag 60  
 5 uucuaacagu uuuuuuuuag agagcagauc ucugaugaac aaccaacgga aaaagacggg 120  
 ucgaccgucu uucaauaugc ugaaacgcgc gagaaaccgc gugucaacug uuucacaguu 180  
 10 ggcgaagaga uucucaaaag gauugcuuuc aggccaaagga cccaugaaaau uggugauggc 240  
 uuuuuuagca uuccuaagau uucuagccau accuccaaca gcaggaauuu uggcuagaug 300  
 gggcucauuc aagaagaug gagcgaucaa aguguuacgg gguuucaaga aagaaaucuc 360  
 15 aaacauguug aacauaauga acaggaggaa aagaucugug accaugcucc ucaugcugcu 420  
 gccacagcc cuggcguucc aucugaccac ccgaggggga gagccgcaca ugauaguug 480  
 20 caagcaggaa agaggaaaau cacuuuuguu uaagaccucu gcagguguca acaugugcac 540  
 ccuuauugca auggauuug gagaguuuug ugaggacaca augaccuaca aaugcccccg 600  
 gaucacugag acggaaccag augacguuga cuguuggugc aaugccacgg agacaugggu 660  
 25 gaccuaugga acauguucuc aaacugguga acaccgacga gacaaacguu ccgucgcacu 720  
 ggcaccacac guagggcuug gucuagaaac aagaaccgaa acguggaugu ccucugaagg 780  
 30 cgcuuggaaa caaaucacaa aaguggagac cugggcucug agacaccag gauucacggu 840  
 gauagcccuu uuucugcac augccauagg aacaucacac acccagaaaag ggaucauuuu 900  
 uauuuugcug augcugguaa cuccaucac ggccaugcgg ugcgugggaa uaggcaacag 960  
 35 agacuucgug gaaggacugu caggagcuac guggguggau gugguacugg agcauggaag 1020  
 uugcugacu accauggcaa aagacaaacc aacacuggac auugaacucu ugaagacgga 1080  
 40 ggucacaaac ccugccgucc ugcgcaaacu gugcauugaa gcuaaaauau caaacaccac 1140  
 caccgauucg agauguccaa cacaaggaga agccacgcug guggaagaac aggacacgaa 1200  
 cuuugugugu cgacgaacgu ucguggacag aggcuggggc aaugguugug ggcuaucgg 1260  
 45 aaaagguagc uuaauaacgu gugcuaaguu uaagugugug acaaacugg aaggaaagau 1320  
 aguccaaauu gaaaacuuaa aauauucagu gauagucacc guacacacug gagaccagca 1380  
 50 ccaaguugga aaugagacca cagaacaugg aacaacugca accauaacac cucaagcucc 1440  
 cacgucggaa auacagcuga cagacuacgg agcucuaaca uuggauuguu caccuagaac 1500  
 agggcuagac uuuaugaga ugguguuguu gacauggaa aaacgaucgu ggcucgucca 1560  
 55 caaacaugg uuucugacu uaccacugcc uuggaccucg ggggcuuca caucccaaga 1620  
 gacuuggaau agacaagacu ugcuggucac auuuuagaca gcucaugcaa aaaagcagga 1680  
 aguagucgua cuaggaucac aagaaggagc aaugcacacu gcguugacug gagcgacaga 1740  
 60 aaucxaaacg ucuggaacga caacaauuuu ugcaggacac cugaaaugca gacuaaaaau 1800

UA 129245 C2

ggauaaacug acuuuaaaag ggaugucaua uguaaugugc acagggucou ucaaguuaga 1860  
 5 gaaggaagug gcugagaccc agcauggaac uguucuagug cagguuaaaau acgaaggaac 1920  
 agaugcacca ugcaagaucc ccuucucguc ccaagaugag aagggaguaa cccagaaugg 1980  
 gagauugaua acagccaacc ccuagucac ugacaaagaa aaaccaguca acauugaagc 2040  
 10 ggagccaccu uuuggugaga gcuacauugu gguaggagca ggugaaaaag cuuugaaacu 2100  
 aagcugguuc aagaagggaa gcaguauagg gaaaauguuu gaagcaacug cccguggagc 2160  
 15 acgaaggaug gccauccugg gagacacugc augggacuuc gguucuaauag gagggguguu 2220  
 cacgucugug ggaaaacuga uacaccagau uuuggggacu gcguauggag uuuguucag 2280  
 cgguguuuuc uggaccauga agauaggaau agggauucug cugacauggc uaggauuaaa 2340  
 20 cucaaggagc acgucccuu caaugacgug uaucgcaguu ggcaugguca cacuguaccu 2400  
 aggagucaug guucaggcgg acucgggaug uguaaucaac uggaaaggca gagaacucua 2460  
 auguggaagc ggcauuuuug ucaccaauga aguccacacc uggacagagc aauuaaaauu 2520  
 25 ccaggccgac uccccuaaga gacuaucagc ggccauuggg aaggcauggg aggagggugu 2580  
 guguggaauu cgaucagcca cucgucucga gaacaucaug uggaagcaaa uaucaaauga 2640  
 30 auuaaaccac aucuuacuug aaaaugacau gaaauuuaca guggucguag gagacguuag 2700  
 uggaaucuug gcccaaggaa agaaaaugau uaggccacaa cccauggaac acaaaucuc 2760  
 guggaaaagc uggggaaaag ccaaaaucou agggagcagau guacagaaua ccaccuucou 2820  
 35 caucgacggc ccaaacaccc cagaaugcc ugaauaccaa agagcaugga acuuuggga 2880  
 aguugaagac uauggauuug gaauuuucac gacaaacaua ugguugaaau ugcgugacuc 2940  
 40 cuacacucua gugugugacc accggcuaau gucagcugcc aucaaggaua gcaaagcagu 3000  
 ccaugcugac augggguacu ggauagaaag ugaagaagc gagacuugga aguuggcaag 3060  
 agccuccuuc auagaaguua agacaugcau cuggccaaaa ucccacacuc uauaggagca 3120  
 45 uggaguccug gaaagugaga ugauaaucc aaagauauu ggaggaccaa uaucucagca 3180  
 caacuacaga ccaggauuu ucacacaaac agcagggccg uggcacuugg gcaaguuaga 3240  
 50 acuagauuuu gauuuauug aagguaccac uguuguugug gaugaacauu guggaaaucg 3300  
 aggaccauc cuuagaacca caacagucac aggaaagaca auccaugaau ggugcuguag 3360  
 aucuugcacg uuaccccc uacguuucua aggagaagac gggugcuggu acggcaugga 3420  
 55 aaucagacca gucaaggaga aggaagagaa ccuaguuuag ucaauuggucu cugcaggguc 3480  
 aggagaagug gacaguuuuu cacuaggacu gcuauagcau ucaauuauga ucgaagaggu 3540  
 60 aaugagaucc agauggagca gaaaaaugcu gaugacugga acauuggcug uguuccuccu 3600

UA 129245 C2

	ucucacaaug	ggacaauga	cauggaauga	ucugaucagg	cuauguauca	ugguuggagc	3660
	caacgcuuca	gacaagaugg	ggaugggaac	aacguaccua	gcuuugaugg	ccacuuucag	3720
5	aaugagacca	auguucgcag	ucgggcuacu	guuucgcaga	uuacaucua	gagaaguucu	3780
	ucuucuuaca	guuggauuga	gucugguggc	aucuguagaa	cuaccaaauu	ccuuagagga	3840
10	gcuaggggau	ggacuugcaa	ugggcaucau	gauguugaaa	uuacugacug	auuuucaguc	3900
	acaucagcua	ugggcuaccu	ugcugucuuu	aacauuuguc	aaaacaacuu	uuucauugca	3960
	cuaugcaugg	aagacaaugg	cuaugauacu	gucaauugua	ucucucuucc	cuuuaugccu	4020
15	guccacgacu	ucucaaaaaa	caacauggcu	uccgguguug	cugggaucuc	uuggaugcaa	4080
	accacuaacc	auguuucuaa	uaacagaaaa	caaaucugg	ggaaggaaaa	gcuggccucu	4140
20	caugaagga	auuauggcug	uuggaaugu	uagcauucuu	cuaaguucac	uucucaagaa	4200
	ugaugugcca	cuagcuggcc	cacuaauagc	uggaggcaug	cuaauagcau	guuauugcau	4260
	aucuggaagc	ucggccgauu	uaucaucugga	gaaagcggcu	gaggucuccu	gggaagaaga	4320
25	agcagaacac	ucuggugccu	cacacaacau	acuaguggag	guccaagaug	auggaaccou	4380
	gaaaauaaag	gaugaagaga	gagaugacac	acucaccauu	cuccucuaag	caacucugcu	4440
30	agcaaucuca	gggguaauacc	caaugucaau	accggcgacc	cucuugugu	gguauuuuug	4500
	gcagaaaaag	aaacagagau	caggagugcu	augggacaca	cccagcccuc	cagaagugga	4560
	aagagcaguc	cuugaugaug	gcuuuuauag	aaucuccaa	agaggauugu	ugggcagguc	4620
35	ucaaguagga	guaggaguuu	uucaagaagg	cguguuccac	acaauugggc	acgucaccag	4680
	gggagcuguc	cucauguacc	aagggaagag	acuggaacca	aguugggcca	gugucaaaaa	4740
40	agacuugauc	ucauauaggag	gagguuggag	guuucuaagga	uccuggaacg	cgggagaaga	4800
	agugcaggug	auugcuguug	aaccggggaa	gaacccaaa	aauguacaga	cagcgccggg	4860
	uaccuucaag	accccugaag	gcgaaguugg	agccauagcu	cuagacuuua	aacccggcac	4920
45	aucuggaucu	ccuaucguga	acagagaggg	aaaaauagua	ggucuuuau	gaaauaggau	4980
	ggugacaaca	agugguaccu	acgucagugc	cauagcucaa	gcuaaagcau	cacaagaagg	5040
50	gccucuacca	gagauugagg	acgagguguu	uaggaaaaga	aacuuacaa	uaauaggaccu	5100
	acauccagga	ucgggaaaaa	caagaagaua	ccuuccagcc	auaguccgug	aggccauaaa	5160
	aagaaagcug	cgcacgcuag	ucuuagcucc	cacaagaguu	gucgcuucug	aaauggcaga	5220
55	ggcgcucaag	ggaaugccaa	uaagguauca	gacaacagca	gugaagagug	aacacacggg	5280
	aaaggagaua	guugaccuaa	ugugucacgc	cacuuucacu	augcgucucc	ugucuccugu	5340
60	gagaguuccc	aauuuaaaua	ugauuaucau	ggaugaagca	cauuucaccg	auccagccag	5400
	cauagcagcc	agagguaua	ucucaacccg	aguggguaug	ggugaagcag	cugcgauuuu	5460

UA 129245 C2

caugacagcc acuccecccg gaucggugga ggccuuucca cagagcaaug caguuaacca 5520  
 5 agaugaggaa agagacauuc cugaaagauc auggaacuca ggcuaugacu ggaucaacuga 5580  
 uuucccaggu aaaacagucu gguuuguucc aagcaucaa ucaggaaaug acauugccaa 5640  
 cuguuuuaga aagaauggga aacggguggu ccaauugagc agaaaaacuu uugacacuga 5700  
 10 guaccagaaa acaaaaaua acgacuggga cuauguuguc acaacagaca uaucggaaau 5760  
 gggagcaaac uuccgagccg acaggguaau agaccgagc cggugccuga aaccgguaau 5820  
 acuaaaagau ggcccagagc gugucauucu agccggaccg augccaguga cuguggcuag 5880  
 15 cgccgcccag aggagaggaa gaauuggaag gaaccaaaau aaggaaggcg aucaguauau 5940  
 uuacauggga cagccucuaa aaaaugauga ggaccacgcc cauuggacag aagcaaaaau 6000  
 20 gcuccuugac aacauaaaca caccagaagg gauuauccea gccucuuug agccggagag 6060  
 agaaaagagu gcagcaauag acggggaaua cagacuacgg ggugaagcga ggaaaacguu 6120  
 cguggagcuc augagaagag gagaucuacc ugucuggcua uccuacaaag uugccucaga 6180  
 25 aggcuccag uacuccgaca gaagguggug cuuugauggg gaaaggaaca accagguguu 6240  
 ggaggagaac auggacgugg agaucuggac aaaagaagga gaaagaaaga aacuacgacc 6300  
 30 ccgcuggcug gaugccagaa cauacucuga cccacuggcu cugcgcgaau ucaaagaguu 6360  
 cgcagcagga agaagaagcg ucucagguga ccuaauauua gaaauagggg aacuuccaca 6420  
 acauuuuacg caaagggccc agaacgccuu ggacaauucg guuauguugc acaacucuga 6480  
 35 acaaggagga aaagccuaua gacacgccau ggaagaacua ccagacacca uagaaacguu 6540  
 aaugcuccua gcuuugauag cugugcugac ugguggagug acguuguucu uccuaucagg 6600  
 40 aaggggucua ggaaaaacau ccuauggccu acucugcgug auugccucaa gugcacuguu 6660  
 auggauggcc aguguggaac cccauuggau agcggccucu aucuacugg aguucuuucu 6720  
 gaugguguug cuuauuccag agccggacag acagcgacu ccacaagaca accagcuagc 6780  
 45 auacguggug auaggucugu uauucaugau auugacagug gcagccaug agauuggauu 6840  
 acuggaaacc acaaagaagg accuggggau uggucaugca gcugcugaaa accaccauca 6900  
 50 ugcugcaaug cuggacguag accuacauc agcuucagcc uggacucucu augcaguggc 6960  
 cacaacaauu aucacucca ugaugagaca cacaauugaa aacacaacgg caaaauuuuc 7020  
 ccugacagcu auugcaaacc aggcagcuau auugauggga cuugacaagg gauggccaau 7080  
 55 aucaaagau gacauaggag uuccacuucu cgccuugggg ugcuaauucuc aggugaacct 7140  
 gcugacgcug acagcggcgg uauuuuugcu aguggcucuu uaugccaaua uuggaccggg 7200  
 60 acugcaagca aaagcuacua gagaagcuca aaaaaggaca gcagccggaa uaugaaaaa 7260

UA 129245 C2

cccaacuguc gacgggaucg uugcaauaga uuuggacccu gugguuuacg augcaaaaau 7320  
 ugaaaaacag cuaggccaaa uaanguuguu gauacuuugc acaucacaga uccuccugau 7380  
 5 ggggaccaca ugggccuugu gugaauccau cacacuagcc acuggaccuc ugaccacgcu 7440  
 uugggagggga ucuccaggaa aaucucggaa caccacgaua gcgugugucca uggcaaacau 7500  
 10 uuuuagggga aguuaucuag caggagcagg ucuggccuuu ucauuuauga aaucucuagg 7560  
 aggagguagg agaggcacgg gagcccaagg ggaaacacug ggagaaaaau ggaaaagaca 7620  
 gcuaaaccaa uugagcaagu cagaauucaa cacuuacaaa aggaguggga uuauagaggu 7680  
 15 ggauagaucu gaagccaaag agggguuuaa aagaggagaa acgacuaaac acgcaguguc 7740  
 gagaggaacg gccaaacuga ggugguuugu ggagaggaac cuugugaaac cagaagggaa 7800  
 agucauagac cucgguugug gaagaggugg cuggucauau uauugcgug ggcugaagaa 7860  
 20 agucacagaa gugaaaggau acacgaaagg aggaccugga caugaggaac caaucccaau 7920  
 ggcaaccuau ggauggaacc uaguaaagcu auacuccggg aaagauguau ucuuuacacc 7980  
 25 accugagaaa ugugacacc ucuuguguga uauuggugag uccucuccga acccaacuau 8040  
 agaagaagga agaacguuac guguucuaaa gaugguggaa ccauggcuca gaggaaacca 8100  
 auuuugcaua aaaaucuaa aucccauau gccgagugug guagaaacuu uggagcaauu 8160  
 30 gcaaagaaaa cauggaggaa ugcugugcg aaauccacuc ucaagaaacu ccacucauga 8220  
 aauguacugg guuucaugug gaacaggaaa cauuguguca gcaguaaaca ugacaucuag 8280  
 35 aaugcugcua aaucgauca cauggcuca caggaagcca acauugaaa gagacgugga 8340  
 cuuaggcgcu ggaacaagac auguggcagu agaaccagag guggccaacc uagauaucu 8400  
 uggccagagg auagagaaua uaaaaauga acacaaauca acauggcauu augaugagga 8460  
 40 cauccauac aaaacauggg ccuaucaugg aucauaugag gucaagccau caggauacgc 8520  
 cucauccaug gucaauggug uggugagacu gcuaaccaa ccaugggaug ucauucccau 8580  
 45 ggucacacaa auagccauga cugacaccac acccuugga caacagaggg uguuuuaaga 8640  
 gaaaguugac acgcuacac caaaagcgaa acgaggcaca gcacaaaua uggaggugac 8700  
 agccaggugg uuaugggguu uucucucuag aaacaaaaa cccagaaucu gcacaagaga 8760  
 50 ggaguucaca agaaaaguca ggucaaacgc agcuauugga gcaguguucg uugaugaaaa 8820  
 ucaauggaac ucagcaaaag aggcagugga agaugaacgg uucugggacc uugugcacag 8880  
 55 agagagggag cuucauaaac aaggaaaug ugccacgugu gucuacaaca ugaugggaaa 8940  
 gagagagaaa aaauaggag aguucggaaa ggcaaaagga agucgcgcaa uaugguacau 9000  
 gugguuggga gcgcgcuuuu uagaguuga agcccuuggu uucaugaug aagaucacug 9060  
 60 guucagcaga gagaauucac ucaguggagu ggaaggagaa ggacuccaca aacuuggaua 9120

	cauacucaga gacauaucaa agauuccagg gggaaauaug uaugcagaug acacagccgg	9180
5	augggacaca agaauaacag aggaugaucu ucagaauagag gccaaaauca cugacaucau	9240
	ggaaccugaa caugcccuau uggccacguc aaucuuuaag cuaaccuacc aaaacaaggu	9300
	aguaagggug cagagaccag cgaaaaaugg aaccgugaug gaugucauau ccagacguga	9360
10	ccagagagga aguggacagg uuggaaccua uggcuuaaac accuucacca acauggaggc	9420
	ccaacuaaua agacaaaugg agucugaggg aaucuuuua cccagcgaau uggaaacccc	9480
15	aaaucuagcc gaaagagucc ucgacugguu gaaaaaacau ggcaccgaga ggcugaaaag	9540
	aauggcaauc aguggagaug acuguguggu gaaaccaauu gaugacagau uugcaacagc	9600
	cuaaacagcu uugaaugaca ugggaaaggu aagaaaagac auaccgcaau gggaaaccuuc	9660
20	aaaaggaugg aaugauuggc aacaagugcc uuucuguuca caccauuucc accagcugau	9720
	uauagaaggau gggagggaga uaguggugcc augccgcaac caagaugaac uuguagguag	9780
25	ggccagagua ucacaaggcg ccggauggag cuugagagaa acugcaugcc uaggcaaguc	9840
	auaugcacia auguggcagc ugauguacuu ccacaggaga gacuugagau uagcggcuaa	9900
	ugcuaucugu ucagccguuc caguugauug ggucccaacc agccguacca ccuggucgau	9960
30	ccaugcccac caucaaugga ugacaacaga agacauguug ucagugugga auaggguuug	10020
	gauagaggaa aacccaugga uggaggacaa gacucaugug uccaguuggg aagacguucc	10080
35	auaccuagga aaaagggag aucaauggug uggaucccua auagggcuua cagcacgagc	10140
	caccuggggc accaacauc aaguggccau aaaccaagug agaaggcuca uugggaauga	10200
	gaauuauca gacuucauga caucaaugaa gagauucaa aacgagagug aucccgaagg	10260
40	ggcacucugg uaagccaacu cauucacaaa auaaaggaaa auaaaaaac aaacaaggca	10320
	agaagucagg ccggaauaag ccuagcacg guaagagcua ugcugccugu gagccccguc	10380
45	caaggacgua aaaugaaguc aggccgaaag ccacgguucg agcaagccgu gcugccugua	10440
	gcuccaucgu ggggauguaa aaaccggga ggcugcaaac cauggaagcu guacgcaugg	10500
	gguagcagac uagugguuag aggagacccc ucccagaca caacgcagca gcggggccca	10560
50	agacuagagg uuagaggaga cccccgcac aacaacaac agcauuuga cgcugggaga	10620
	gaccagagau ccugcugucu cuacagcauc auuccaggca cagaucggaa gaaauggaa	10680
55	uggugcuguu gaaucaacag guucu	10705
	<210> 7	
	<211> 10618	
	<212> РНК	
60	<213> штучна послідовність	

<220>

<223> DENV2

<400> 7

5 aguuguuagu cuguguggac cgacaaggac aguuccaaau cggaagcuug cuuaacacag 60  
uucuaacagu uuguuugaau agagagcaga ucucuggaaa aaugaaccaa cgaaaaaagg 120  
10 ugguuagacc accuuucaau augcugaaac gcgagagaaa cgcgguauca accccucaag 180  
ggcuggugaa gagauucua accggacuua uuucugggaa aggaccuua cggauggugc 240  
uagcauucan cacguuuuug cgaguccuuu ccaucccacc aacagcaggg auucugaaga 300  
15 gauggggaca guugaagaaa aauaaggcca ucaagauacu gauuggauuc aggaaggaga 360  
uaggccgcau gcugaacauc uugaacggga gaaaaagguc ugcaggcaug aucauuugc 420  
20 ugauuccaac agugauggcg uuccauuuua ccacacguaa cggagaacca cacaugaucg 480  
ucaguagaca agagaaaggg aaaagucuuc uguuuuuuac agaggauggu gugaacaugu 540  
guaccucan ggccauggac cuuggugaau ugugugaaga uacaucacg uacaaguguc 600  
25 cucuucucag gcagaaugaa ccagaagaca uagauuguug gugcaacucu acguccacau 660  
ggguaacuua ugggacgugu accaccacag gagaacacag aagagaaaaa agaucagugg 720  
30 cacucguucc acauguggga augggacugg agacacgaac ugaaacaugg augucaucag 780  
aaggggcccug gaaacaugcc cagagaauug aaacuuggau cuugagacau ccaggcuua 840  
ccauaauggc agcaaucug gcuaacacca uaggaacgac acuuuuccaa agagcccuga 900  
35 uuuucaucuu acugacagcu gucgcuccuu caugacaau gcguugcaua ggaauaucaa 960  
auagagacuu uguagaaggg guuucaggag gaagcugggu ugacauaguc uuagaacaug 1020  
40 gaagcugugu gacgacgaug gcaaaaaaca aaccaacauu ggauuuugaa cugauaaaaa 1080  
cagaagccaa acaaccugcc acucuaagga aguacuguau agaggcaaag cugaccaaca 1140  
caacaacaga aucucgcugc ccaacacaag gagaaccuag ccuaaaugaa gagcaggaca 1200  
45 aaagguucgu cugcaaacac uccauggugg acagaggauug gggaaaugga uguggauuau 1260  
uuggaaaagg aggcauugug accugugcua uguucacaug caaaaagaac auggaaggaa 1320  
50 aagucgugca accagaaaac uuggaaauaca ccuugugau aacaccucac ucaggggaag 1380  
agcaugcagu cggaaaugac acaggaaaac auggcaagga aaucaaaaua acaccacaga 1440  
guuccaucac agaagcagag uugacaggcu auggcacugu cacgauggaa ugcuuuccga 1500  
55 gaacgggccu cgacuucan gagauggugu ugcugcaauu ggaaaauaaa gcuuggcugg 1560  
ugcacaggca augguuccua gaccugccgu ugccauggcu gcccggagcg gacacacaag 1620  
60 gaucaaaug gauacagaaa gagacauugg ucacuuuca aaaucccac gccaagaaac 1680  
aggauguugu uguuuuggga uccaagaag gggccaugca cacagcacuc acaggggcca 1740

UA 129245 C2

	cagaaaacca	gaugucauca	ggaacuuc	uguucacag	acaucucaag	ugcaggcuga	1800
5	ggauggacaa	acuacagcuc	aaaggaaugu	cauacucuau	gugcacagga	aaguuuaaag	1860
	uugugaagga	aauagcagaa	acacaacaug	gaacaauagu	uauagagua	caauaugaag	1920
	gggacgguuc	uccauguaag	aucuuuuug	agauaaugga	uuuggaaaaa	agacauguuu	1980
10	uaggucgccu	gauuacaguc	aacccaaucg	uaacagaaaa	agauagccca	gucaacauag	2040
	aagcagaacc	uccauucgga	gacagcuaca	ucaucauagg	aguagagccg	ggacaauuga	2100
	agcucaacug	guuaaagaaa	ggaaguucua	ucggccaaau	guuugagaca	acaaugaggg	2160
15	gagcgaagag	aauggccaau	uuaggugaca	cagcuuggga	uuuuggaucc	cugggaggag	2220
	uguuuacauc	uauaggaag	gcucuccacc	aaguuuucgg	agcaaucuau	ggggcugccu	2280
20	ucaguggggu	cucauggacu	augaaaaucc	ucauaggagu	cauuaucaca	uggauaggaa	2340
	ugaacucgag	gaacacuca	auggcuauga	cgugcauagc	uguuggagga	aucacucugu	2400
	uucugggcuu	cacaguucua	gcagacaugg	guuguguggc	gucauggagu	gggaaagaau	2460
25	ugaagugugg	aagcggaau	uuugugguug	acaacgugca	cacuuggaca	gaacaguaca	2520
	aauuucaacc	agagucccca	gagagacuag	cgucugcaau	auuaaagcc	cacaagaug	2580
30	gggucugugg	aaauagauc	accacgaggc	uggaaaaugu	cauguggaag	caauaacca	2640
	acgagcuaaa	cuauguucuc	ugggaaggag	gacaugaccu	cacuguagug	gcuggggau	2700
	ugaagggggu	guugaccaa	ggcaagagag	cacucacacc	cccagugagu	gaucugaaau	2760
35	auucauggaa	gacaugggga	aaagcaaaaa	ucuucacccc	agaagcaaga	aauagcacau	2820
	uuuaauaga	cggaccagac	accucugaau	gccccaauga	acgaagagca	uggaacucuc	2880
40	uugaggugga	agacuauuga	uuuggcaugu	ucacgaccaa	cauauuggau	aaauuccgag	2940
	aaggaaguuc	agaagugugu	gaccacaggu	uaaugucagc	ugcauuuaaa	gaucagaaag	3000
	cugugcaugc	ugacaugggu	uauuggauag	agagcucaaa	aaaccagacc	uggcagauag	3060
45	agaaagcauc	ucuuauugaa	gugaaaacau	gucuguggcc	caagaccac	acacugugga	3120
	gcaauaggagu	gcuggaaagc	cagaugcuca	uuccaaaauc	auaugcgggc	ccuuuuucac	3180
50	agcacaauua	ccgccagggc	uauuccacgc	aaaccguggg	cccuggcac	uuaggcaau	3240
	uagagauaga	cuuuggagaa	ugccccggaa	caacagucac	aaucaggag	gauugugacc	3300
	auagaggccc	aucuuugagg	accaccacug	caucuggaaa	acuagucacg	caauggugcu	3360
55	gccgcuccug	cacgaugccu	cccuuaaggu	ucuugggaga	agaugggugc	ugguauugga	3420
	uggagauuag	gccccuagau	gaaaaagaag	agaacauggu	caauacacag	gugacggccg	3480
60	gacagggcac	aucagaaacu	uuuucuaugg	gucuguugug	ccugaccuug	uuuguggaag	3540

UA 129245 C2

	aaugcuugag	gagaagaguc	acuaggaaac	acaugauauu	aguuguggug	aucacucuuu	3600
	gugcuaucou	ccugggaggc	cucacaugga	uggacuuacu	acgagcccuc	aucauguugg	3660
5	gggacacuau	gucugguaga	auaggaggac	agauccaccu	agccaucaug	gcaguguuca	3720
	agaugucacc	aggauacgug	cugggugugu	uuuuaggaa	acucacuuca	agagagacag	3780
10	cacuaauggu	aauggaau	gccaugaca	cgugucuuu	aauccacau	gaccuuau	3840
	aacucauuga	uggaauauca	cugggacuaa	uuuugcuaaa	aauguaaca	caguugaca	3900
	acaccaagu	gggaaccua	gcucuuccu	ugacuuuacu	aagaucaaca	augccauugg	3960
15	ucauggcuug	gaggaccuu	auggcugugu	uguuuguggu	cacacucuu	ccuuugugca	4020
	ggacaagcug	ucuucaaaa	cagucucuu	ggguagaaau	aacagcacuc	auccuaggag	4080
20	ccaagcucu	gccaguguac	cuaaugacuc	uuugaaagg	agccucaaga	agaucuuagg	4140
	cucuaacga	gggcauaau	gcuguggguu	ugguuagucu	cuuaggaagc	gcucuuuuaa	4200
	agaugaugu	ccuuuagcu	ggcccauug	uggcaggagg	cuuacuucug	gcgguuacg	4260
25	ugaugagugg	uagcucagca	gaucugucac	uagagaaggc	cgccaacgug	cagugggaug	4320
	aauggcaga	caaacaggc	ucaagccca	ucauagaagu	gaagcaggau	gaagauggcu	4380
30	cuuucuccau	acgggagcuc	gaggaaacca	auaugauaac	ccuuuuggug	aaucuggcac	4440
	ugauaacagu	gucaggucuc	uaccccuugg	caauccagu	cacaaugacc	uuauuguaa	4500
	uguggcaagu	gaaaacaca	agaucaggag	cccuguggga	cgucuccuca	cccugucca	4560
35	cuaaaaaagc	cgcacugucu	gaaggagugu	acaggaucau	gcaaagaggg	uuauucggga	4620
	aaacucaggu	uggaguaggg	auacacaugg	aagguguauu	ucacacaau	uggcauguaa	4680
40	caagaggau	agugaucugc	cacgagacug	ggagauugga	gccaucuu	gcugacguca	4740
	ggaaugacau	gauaucuac	gguggggggu	ggaggcuugg	agacaaaugg	gacaaagaag	4800
	aagacguuca	gguccucgcc	auagaaccag	gaaaaaucc	uaaacauguc	caaacgaaac	4860
45	cuggccuuuu	caagaccua	acuggagaaa	uuggagcagu	aacauuagau	uucaaacccg	4920
	gaacgucugg	uucuccauc	aucaacagga	aaggaaaagu	caucggacuc	uauggaaaug	4980
50	gaguaguua	caauccaggu	gauuacguca	gugccauaac	gcaagccgaa	agaauuggag	5040
	agccagauua	ugaaguggau	gaggacuuu	uucgaaagaa	aagauuaacu	auaugggacu	5100
	uacaccccg	agcuggaaag	acaaaaagaa	uucuuuccauc	aaugugaga	gaagccuuua	5160
55	aaaggaggcu	acgaacuuug	auuuuagcuc	ccacgagagu	gguggcggcc	gagauggaag	5220
	aggccuacg	uggacugcca	aucgguuac	agacccagc	ugugaaauca	gaacacacag	5280
60	gaagagagau	uguagaccuc	augugucaug	caaccuucac	aacaagacuu	uugucaucaa	5340
	ccaggguucc	aaauacaac	cuuauaguga	uggaugaagc	acauuucc	gaucuuucua	5400

UA 129245 C2

gugucgcggc uagaggauac aucucgacca ggguggaaaau gggagaggca gcagccaucu 5460  
 ucaugaccgc aaccccuccc ggagcgacag aucccuucc ccagagcaac agcccaauag 5520  
 5 aagacaucga gagggaaaau ccggaaaggu cauggaacac aggguucgac uggauaacag 5580  
 acuaccaagg gaaaacugug ugguuuguuc ccagcauaaa agcuggaaaau gacauugcaa 5640  
 10 auuguuugag aaagucggga aagaaaguua uccaguugag uaggaaaacc uuugauacag 5700  
 aguauccaaa aacgaaacuc acggacuggg acuuuguggu cacuacagac auaucugaaa 5760  
 uggggggccaa uuuuagagcc gggagaguga uagaccuag aagaugccuc aagccaguua 5820  
 15 uccuaccaga uggggccagag agagucauuu uagcaggucc uauuccagug acuccagcaa 5880  
 gcgcugcuca gagaagaggg cgaauaggaa ggaaccagc acaagaagac gaccaauacg 5940  
 20 uuuucuccgg agaccacua aaaaugaug aagaucaugc ccacuggaca gaagcaaaga 6000  
 ugcugcuuga caauaucuac accccagaag ggaucauucc aacauuguuu gguccggaaa 6060  
 gggaaaaaac ccaagccauu gauggagagu uucgccucag aggggaacaa aggaagacuu 6120  
 25 uuguggaaa uaugaggaga ggagaccuuc cgguguggcu gagcuuaaag guagcuucug 6180  
 cuggcauuuc uuacaaagau cgggaauggu gcuucacagg ggaagaaaau aaccaaauuu 6240  
 30 uagaagaaaa cauggagguu gaaauuugga cuagagaggg agaaaagaaa aagcuaaggc 6300  
 caagaugguu aaugcacgu guauacgcug accccauggc uuugaaggau uucaaggagu 6360  
 uugccagugg aaggaagagu auaacucug acauccuaac agagauugcc aguuugccaa 6420  
 35 cuuaccuuuc cucuagggcc aagcucgccc uugauaacau agucaugcuc cacacaacag 6480  
 aaagaggagg gagggccuau caacacgccc ugaacgaacu uccggaguca cuggaaacac 6540  
 40 ucaugcuugu agcuuuacua ggugcuauga cagcaggcau cuuccuguuu uucaugcaag 6600  
 ggaaaggaau agggaaaauug ucaauggguu ugauaaccau ugcgguggcu aguggcuugc 6660  
 ucuggguagc agaaaaucaa ccccagugga uagcggccuc aaucuaucia gaguuuuuuc 6720  
 45 ucaugguacu guugauaccg gaaccagaaa aacaaaggac cccacaagac aaucaauga 6780  
 ucuacgucau auugaccau cucaccauca uuggucuaau agcagccaac gagauggggc 6840  
 50 ugauugaaaa aacaaaaacg gauuuugggu uuaccaggu aaaaacagaa accaccaucc 6900  
 ucgaugugga cuugagacca gcuucagcau ggacgcucua ugcaguagcc accacaauuc 6960  
 ugacucccau gcugagacac accauagaaa acacgucggc caaccuaucu cuagcagcca 7020  
 55 uugccaacca ggcagccguc cuaauggggc uuggaaaagg auggccgcuc cacagaaugg 7080  
 accucggugu gccgcuguua gcaaugggau gcuauucuca agugaacca auaaccuuga 7140  
 60 cagcauccuu agucaugcuu uucgugcacu augcauaau aggccagga uugcaggcaa 7200

UA 129245 C2

	aagccacaag	agaggcccag	aaaaggacag	cugcugggau	caugaaaaau	cccacagugg	7260
	acgggauaac	aguaauagau	cuagaaccaa	uauccuauga	cccaaaaauu	gaaaagcaau	7320
5	uagggcaggu	caugcuacua	gucuugugug	cuggacaacu	acucuugaug	agaacaacau	7380
	gggcuuucug	ugaagucuug	acuuuggcca	caggaccaau	cuugaccuug	ugggagggca	7440
10	acccgggaag	guuuuggaac	acgaccuag	ccguauccac	cgccaacauu	uucaggggaa	7500
	guuacuuggc	gggagcugga	cuggcuuuuu	cacucauaaa	gaaugcacia	accccuagga	7560
	ggggaacugg	gaccacagga	gagacacugg	gagagaagug	gaagagacag	cuaaacucau	7620
15	uagacagaaa	agaguuuuga	gaguauaaaa	gaaguggaau	acuagaagug	gacaggacug	7680
	aagccaaguc	ugcccugaaa	gaugggucua	aaaucaagca	ugcaguauca	agagggucca	7740
20	guaagaucag	auggauuguu	gagagagggg	ugguaaagcc	aaaagggaaa	guuguagauc	7800
	uuggcugugg	gagaggagga	uggucuuaau	acauggcgac	acucaagaac	gugacugaag	7860
	ugaaagggua	uacaaaagga	gguccaggac	augaagaacc	gauucccaug	gcuacuuaug	7920
25	guuggaauuu	ggucaaacuc	cauucagggg	uugacguguu	cuacaaaccc	acagagcaag	7980
	uggacaccu	gcucugugau	auuggggagu	caucuucuaa	uccaacaaua	gaggaaggaa	8040
30	gaacauuaag	aguuuugaag	augguggagc	cauggcucuc	uucaaaaccu	gaauucugca	8100
	ucaaguccu	uaacccuac	augccaacag	ucauagaaga	gcuggagaaa	cugcagagaa	8160
	aacauggugg	gaaccuuguc	agaugcccg	uguccaggaa	cuccaccuau	gagauguauu	8220
35	gggugucagg	agcgucggga	aacauguga	gcucugugaa	cacaacauca	aagauguugu	8280
	ugaacagguu	cacaacaagg	cauaggaaac	ccacuuauga	gaaggacgua	gaucuugggg	8340
40	caggaacgag	aagugucucc	acugaaacag	aaaaaccaga	caugacaauc	auugggagaa	8400
	ggcuucagcg	auugcaagaa	gagcaciaag	aaaccuggca	uuauaucag	gaaaaccuau	8460
	acagaaccug	ggcguaucuu	ggaagcuau	aagcuccuuc	gacaggcucu	gcauccucca	8520
45	uggugaacgg	ggugguaaaa	cugcuaacia	aaccugggga	ugugauucca	auggugacuc	8580
	aguuaagccau	gacagauaca	acccuuuuug	ggcaaciaag	aguguuacia	gagaaggugg	8640
50	auaccagaac	accaciaacca	aaaccggua	cacgaauggu	uaugaccacg	acagccauu	8700
	ggcugugggc	ccuccuugga	agaagaaaa	aucccagacu	gugcaciaag	gaagaguuca	8760
	ucuaaaaagu	uagaucaaac	gcagccauag	gcgcagucuu	ucaggaagaa	cagggauugga	8820
55	caucagccag	ugaagcugug	aaugacagcc	gguuuuggga	acugguugac	aaagaaaggg	8880
	cccuacacca	ggaagggaaa	ugugaaucgu	gugucuaaaa	caugauggga	aaacgugaga	8940
60	aaaaguuaag	agaguuuugg	agagccaagg	gaagccgagc	aaucugguac	auguggcugg	9000
	gagcgcgguu	ucuggaauuu	gaagcccugg	guuuuuuga	ugaagaucac	ugguuuggca	9060

UA 129245 C2

	gagaaaauuc	auggagugga	guggaagggg	aaggucugca	cagauuggga	uauauccugg	9120
5	aggagauaga	caagaaggau	ggagaccuaa	uguaugcuga	ugacacagca	ggcugggaca	9180
	caagaaucac	ugaggaugac	cuucaaaaug	aggaacugau	cacggaacag	auggcucccc	9240
	accacaagau	ccuagccaaa	gccauuuuca	aacuaaccua	ucaaaaacaaa	guggugaaaag	9300
10	uccucagacc	cacaccgcg	ggagcgguga	uggauaucau	auccaggaaa	gaccaaagag	9360
	guaguggaca	aguuggaaca	uauuguuuga	acacauucac	caacauggaa	guucaacuca	9420
	uccgccaaa	ggaagcugaa	ggagucauca	cacaagauga	caugcagaac	ccaaaagggu	9480
15	ugaaagaaa	aguugagaaa	uggcugaaa	aguguggugu	cgacagguua	aagaggaugg	9540
	caaucagugg	agacgauugc	guggugaagc	cccuagauga	gagguuuggc	acuucccucc	9600
20	ucuucuugaa	cgacauggga	aaggugagga	aagacauucc	gcagugggaa	ccaucuaagg	9660
	gauggaaaa	cuggcaagag	guuccuuuu	gcuccacca	cuucacaag	aucuuuauga	9720
	aggauggccg	cucacuaguu	guuccaugua	gaaaccagga	ugaacugaua	gggagagcca	9780
25	gaaucucgca	gggagcugga	uggagcuuaa	gagaaacagc	cugccugggc	aaagcuuacg	9840
	cccagaugug	gucgcuuaug	uacuuccaca	gaagggaucu	gcguuuagcc	uccauggcca	9900
30	uaugcucagc	aguuccaacg	gaaugguuuc	caacaagcag	aacaacaugg	ucaauccacg	9960
	cucaucacca	guggaugacc	acugaagaua	ugcucaaagu	guggaacaga	guguggauag	10020
	aagacaaccc	uaauaugacu	gacaagacuc	caguccauuc	gugggaagau	auaccuuacc	10080
35	uagggaaaag	agaggauuug	ugguguggau	cccugauugg	acuuccuucc	agagccaccu	10140
	gggcgaagaa	cauucacacg	gccauaaccc	aggucaggaa	ccugaucgga	aaagaggaau	10200
40	acguggauua	caugccagua	augaaaagau	acagugcucc	uucagagagu	gaaggaguuc	10260
	uguauuuacc	aacaacaaac	accaaaggcu	auugaaguca	ggccacuugu	gccacgguuu	10320
	gagcaaaccg	ugcugccugu	agcuccgcca	auaauuggag	gcguaauau	ccccagggag	10380
45	gccaugcgcc	acggaagcug	uacgcguggc	auauuggacu	agcgguuaga	ggagaccccu	10440
	cccaucacug	acaaaacgca	gcaaaaaggg	gcccaagacu	agagguuaga	ggagaccccc	10500
50	ccaacacaaa	aacagcauau	ugacgcuggg	aaagaccaga	gauccugcug	ucucugcaac	10560
	aucaauccag	gcacagagcg	ccgcaagaug	gauugguguu	guugaucsa	cagguucu	10618
55	<210>	8					
	<211>	10645					
	<212>	PHK					
	<213>	штучна послідовність					
60	<220>						
	<223>	DENV3					

	<400> 8					
	aguuguuagu	cuacguggac	cgacaagaac	aguuucgacu	cggaagcuug	cuuaacguag 60
5	uacugacagu	uuuuuauuag	agagcagauc	ucugaugaac	aaccaacgga	aaaagacggg 120
	aaaaccgucu	aucaauaugc	ugaaacgcgu	gagaaaccgu	gugucaacug	gaucacaguu 180
10	ggcgaagaga	uucucaagag	gacugcugaa	cggccaagga	ccaugaaaau	ugguuauggc 240
	guucauagcu	uuccucagau	uucuagccau	uccaccgaca	gcaggagucu	uggcuagaug 300
	gggaaccuuu	aagaagucgg	gggcuauuaa	gguccugaga	ggcuucaaga	aggagaucuc 360
15	aaacaugcug	agcauuauca	acagacggaa	aaagacaucg	cucugucuca	ugaugauguu 420
	accagcaaca	cuugcuuucc	acuugacuuc	acgagaugga	gagccgcgca	ugauuguggg 480
20	gaagaaugaa	agaggaaaau	cccuacuuuu	uaagacagcc	ucuggaauca	acaugugcac 540
	acucauagcc	auggauuugg	gagagaugug	ugaugacacg	gucaccuaca	aaugccccc 600
	cauuacugaa	guggagccug	aagacauuga	cugcuggugc	aaccuuacau	cgacaugggu 660
25	gaccuacgga	acgugcaauc	aagcuggaga	gcacagacgc	gacaaaagau	cgguggcggu 720
	agcuccccau	gucggcaugg	gacuggacac	acgcacccaa	accuggaugu	cggcugaagg 780
30	agcuuggaga	caggucgaga	agguagagac	augggccuuu	aggcacccag	gguucacaau 840
	acuagcccua	uuucuugccc	auuacauagg	cacuuccuug	accagaaaag	ugguuuuuuu 900
	cauacuacua	augcugguca	ccccauccau	gacaauugaga	ugcguggggag	uaggaaacag 960
35	agauuuugug	gaaggccuau	caggagcuac	guggguugac	guggugcucg	agcacggugg 1020
	gugugugacu	accauggcua	agaacaagcc	cacgcuggau	auagagcucc	agaagaccga 1080
40	ggccacccaa	cuggcgaccc	uaaggaaacu	auguauugag	ggaaaaauua	ccaacguaac 1140
	aaccgacuca	aggugcccca	ccaagggga	agcgauuuua	ccugaggagc	aggaccagaa 1200
	ccacgugugc	aagcacacau	acguggacag	aggcugggga	aacgguugug	guuuguuugg 1260
45	caagggagc	cugguaacau	gcgcgaaaau	ucaauguuug	gaaucaauag	agggaaaagu 1320
	ggugcagcau	gagaaccuca	aaucacccgu	caucaucaca	gugcacacag	gagaucaaca 1380
50	ccagguggga	aaugaaacgc	agggagucac	ggcugagaua	acaccccagg	caucaaccgu 1440
	ugaagccauc	uuaccugaau	auggaaccu	ugggcuagaa	ugcucaccac	ggacagguuu 1500
	agauuucaau	gaaaugauuu	uguugacaau	gaagaacaga	gcauggaugg	uacauagaca 1560
55	augguuuuuu	gaccuaccuu	uaccauggac	aucaggagcu	acaacagaaa	caccaaccug 1620
	gaauaagaaa	gagcuucuug	ugacauucaa	aaacgcacau	gcaaaaaagc	aagaaguagu 1680
60	gguccuugga	ucgcaagagg	gagcaaugca	cacagcacug	acaggagcua	cagagaacca 1740
	aaccucagga	ggcacaagua	uuuuugcggg	gcacuuaaaa	uguagacuca	agauggacaa 1800

UA 129245 C2

	auuggaacuc aaggggauga gcuaugcaau gugcuugaau gccuuugugu ugaagaaaga	1860
5	agucuccgaa acgcaacaug ggacaauacu caucaagguu gaguacaaag ggggaagaugc	1920
	accuugcaag auuccuuucu ccacggagga uggacaaggg aaagcccaca auggcagacu	1980
	gaucacagcu aaccagugg ugaccaagaa ggaggagccu gucaauauug aggcagaacc	2040
10	uccuuuuggg gaaagcaaua uaguaauugg aauggagac aaagccuuga aaauaacug	2100
	guacaagaag ggaagcucga uugggaagau guucgaggcc acugccagag gugcaaggcg	2160
15	cauggccauc uugggagaca cagccuggga cuuuggauca guagguggug uuuuaaauc	2220
	auuaggaaaa auggugcacc aaauuuugg aagugcuuac acagcccuau uuaguggagu	2280
	cuccuggaua augaaaaug gaauaggugu ccuuuaacc uggauagggg ugaaucaaa	2340
20	aaacacuagu augagcuua gcugcauugu gauaggauc auuacacucu aucugggagc	2400
	cguggugcaa gcugacaugg ggugugucau aaacuggaaa ggcaaagaac ucaaaugugg	2460
25	aaguggaauu uucgucacua augaggucca caccuggaca gagcaauaca aauiucaagc	2520
	agacuccccc aaaagacugg cgacagccau ugcaggcgcu ugggagaug gagugugcgg	2580
	aaucaggucg acaaccagaa uggagaaccu cuuguggaag caaaugcca augaacugaa	2640
30	cuacauauua ugggaaaaca acaucaaau aacgguguu gugggugaua uauuuggggu	2700
	cuuagagcaa gggaaaagaa cacuaacacc acaaccaug gaacuaaaa auucauggaa	2760
35	aaaugggga aagcggaaga uagugacagc ugaaacacaa aaauccucu ucauaauaga	2820
	ugggccaaac acaccagagu guccaagugc cucaagagca uggaaugugu gggaggugga	2880
	agauuacggg uucggagucu ucacaacuaa cauauggcug aaacuccgag agauguacac	2940
40	ccaacuaugu gaccacaggc uaaugucggc agccguuaag gaugagaggg ccguacacgc	3000
	cgacaugggc uauuggauag aaagccaaaa gaauggaagu uggaagcuag aaaaggcauc	3060
45	ccucauagag guaaaaaccu gcacauggcc aaaaucacac acucuugga gcaauggugu	3120
	gcuagagagu gacaugauca ucccaaagag ucuggcuggu cccauucgc aacacaacua	3180
	caggcccgga uaccacacc aaacggcagg acccuggcac uuaggaaaau uggagcugga	3240
50	cuucaacuau ugugaaggaa caacaguugu caucacagaa aaugguggga caagaggccc	3300
	aucacugaga acaacaacag ugucaggga guugauacac gaugguguu gccgcucgug	3360
55	uacacuuccu cccugcgau acaugggaga agacggcugc ugguauaggca uggaaaauag	3420
	acccauuauu gagaaagaag agaacauggu aaagucuuaa gucucagcag ggaguggaaa	3480
	gguggauaac uucacaugg gugucuugug uuuggcauc cuuuugaag aggugaugag	3540
60	aggaaaauuu gggaaaaagc acaugauugc agggguucuc uucacguug uacuccuucu	3600

UA 129245 C2

	cucagggcaa	auaacaugga	gagacauggc	gcacacacuc	auaaugauug	gguccaacgc	3660
	cucugacaga	augggaaugg	gcgucacuua	ccuagcauug	auugcaacau	uuaaaauua	3720
5	gccauuuuug	gcuuugggau	ucuuccugag	gaaacugaca	ucuagagaaa	auuuauuguu	3780
	gggaguuggg	uuggccaugg	caacaacguu	acaacugcca	gaggacauug	aacaaauggc	3840
10	gaauggaaua	gcuuuagggc	ucauggcucu	uaaaauaaua	acacaauuug	aaacauacca	3900
	acuauggacg	gcuuuagucu	cccuaaugug	uucaaaauca	auuuucacgu	ugacuguugc	3960
	cuggagaaca	gccaccuga	uuuuggccgg	aauuucucuu	uugccagugu	gccagucuuu	4020
15	gagcaugagg	aaaacagauu	ggcucccaau	ggcuguggca	gcuauggggag	uuccaccccu	4080
	accacuuuuu	auuuucaguu	ugaaagauac	gcucaaaagg	agaagcuggc	cacugaauga	4140
20	gggggugaug	gcuguuggac	uugugaguau	ucuagcuagu	ucucuccuua	ggaaugacgu	4200
	gcccauggcu	ggaccuuuag	uggcuggggg	cuugcugaua	gcgugcuacg	ucauaacugg	4260
	cacgucagca	gaccucacug	uagaaaaagc	agcagaugug	acaugggagg	aagaggcuga	4320
25	gcaaacagga	gugucccaca	auuuuauugau	cacaguugau	gacgauggaa	caaugagaau	4380
	aaaagaugau	gagacugaga	acaucuuuac	agugcuuuug	aaaacagcau	uacuaauagu	4440
30	gucaggcauu	uuuccauacu	ccauaccggc	aacacuguug	gucuggcaca	cuuggcaaaa	4500
	gcaaacccaa	agaucgggug	uccuauggga	cguucccagc	ccccagaga	cacagaaagc	4560
	agaacuggaa	gaagggguuu	auaggaucaa	gcagcaagga	auuuuuggga	aaacccaagu	4620
35	ggggguugga	guacaaaaag	aaggaguuuu	ccacaccaug	uggcacguca	caagaggagc	4680
	aguguugaca	cacaauugga	aaagacugga	accaaacugg	gcuagcguga	aaaaagaucu	4740
40	gauuucauac	ggaggaggau	ggaaaauugag	ugcacaauug	caaaaaggag	aggaggugca	4800
	gguuauugcc	guagagccug	ggaagaacc	aaagaacuuu	caaaccaugc	caggcauuuu	4860
	ccagacaaca	acaggggaga	uaggagcgau	ugcacuggac	uucaagccug	gaacuucagg	4920
45	aucucccauc	auaaacagag	agggaaaggu	acugggauug	uauggcaaug	gaguggucac	4980
	aaagaauuggu	ggcuauugca	guggaaauagc	acaaacaaau	gcagaaccag	acggaccgac	5040
50	accagaguug	gaagaagaga	uguucaaaaa	gcgaaaucua	accuuuauug	aucuccaucc	5100
	cgggucagga	aagacgcgga	aaauucuuuc	agcuauuguu	agagaggcaa	ucaagagacg	5160
	cuaaaggacu	cuaauuuugg	caccaacaag	gguauguuca	gcugagaugg	aagaagcauu	5220
55	gaaagggcuc	ccaauaaggu	aucaaacaac	ugcaacaaaa	ucugaacaca	cagggagaga	5280
	gauuguugau	cuaaugugcc	acgcaacguu	cacaauugcu	uugcugucac	cagucagggg	5340
60	uccaaacuac	aacuugauaa	uaauggauga	ggcucauuuc	acagaccag	ccaguauagc	5400
	ggcuagaggg	uacauaucaa	cucguguagg	aaugggagag	gcagccgcaa	uuuucaugac	5460

	agccacaccc	ccuggaacag	cugaugccuu	uccucagagc	aacgcuccaa	uucaagauga	5520
5	agaaagagac	auaccagaac	gcucauggaa	uucaggcaau	gaauggauua	ccgacuuugc	5580
	cggaagacg	gugugguuug	ucccuagcau	caaagcugga	aaugacauag	caaacugcuu	5640
	gcggaaaaau	ggaaaaaagg	ucauucaacu	uaguaggaag	acuuuugaca	cagaauauca	5700
10	aaagacuaaa	cuaaaugauu	gggacuuugu	ggugacaaca	gacauuucag	aaaugggagc	5760
	cauuuucaaa	gcagacagag	ugaucgaccc	aagaagaugu	cucaagccag	ugauuuugac	5820
15	agacggaccc	gagcgcguga	uccuggcggg	accaaugcca	gucaccguag	cgagcgcugc	5880
	gcaaaggaga	gggagaguug	gcaggaaccc	acaaaaagaa	aaugaccaau	acauauucau	5940
	gggccagccc	cucaauaaug	augaagacca	ugcucacugg	acagaagcaa	aaaugcugcu	6000
20	agacaacauc	aacacaccag	aagggaucau	accagcucuc	uuugaaccag	aaagggagaa	6060
	gucagccgcc	auagacggcg	aauaccgccu	gaagggugag	uccaggaaga	ccuucgugga	6120
25	acucaugagg	aggggugacc	ucccaguuuug	gcuagcccau	aaaguagcau	cagaagggau	6180
	caauauuaca	gauagaaagu	gguguuuuga	uggagaacgc	aacaaucaaa	uuuuagagga	6240
	gaauauggau	guggaaaucu	ggacaaagga	aggagaaaag	aaaaaauga	gaccuaggug	6300
30	gcuugaugcc	cgcacuuauu	cagaucuccu	agcgcucaag	gaauucaagg	acuuugcggc	6360
	ugguagaaag	ucaauugccc	uugaucuugu	gacagaaaua	ggaagagugc	cuucacacuu	6420
35	agcucacaga	acgagaaacg	cccuggacaa	ucuggugaug	uugcacacgu	cagaacaugg	6480
	cgggagggcc	uacaggcaug	caguggagga	acuaccagaa	acaauaggaa	cacucuuauc	6540
	ccugggacuc	augauccugu	uaacaggugg	agcaaugcuu	uucuugauau	cagguaaagg	6600
40	gauuggaaag	acuucaauag	gacucauuug	uguagcugcu	uccagcggua	uguuauaggau	6660
	ggcugauguc	ccacuccaau	ggaucgcguc	ugccauaguc	cuggaguuuu	uuauaugguu	6720
45	guuacuuaa	ccagaaccag	aaaagcagag	aacuccecaa	gacaaucaac	ucgcatauugu	6780
	cgugauaggc	auacucacac	uggcugcaau	aguagcagcc	aaugaaaugg	gacuguugga	6840
	aaccacaaag	agagauuuag	gaauguccaa	agaaccaggu	guuguuucuc	caaccagcua	6900
50	uuuggaugug	gacuugcacc	cagcaucagc	cuggacauug	uacgcugugg	ccacaacagu	6960
	aauaacacca	auguugagac	auaccauaga	gaauuccaca	gcaaaugugu	cccuggcagc	7020
55	uauagccaac	caggcagugg	uccugauggg	uuuagacaaa	ggauggccga	uaucgaaaau	7080
	ggacuuaggc	gugccacuau	uggcacuggg	uuguuuauca	caagugaacc	cacuaacucu	7140
	cacagcggca	guucuccugc	uagccacgca	uuauugcuau	auagguccag	gauugcaggc	7200
60	aaaagccacu	cgugaagcuc	aaaaaaggac	agcugcugga	auaauagaaga	auccaacggu	7260

	ggaugggaua	augacaauag	accuagaucc	uguaauauac	gauccaaaau	uugaaaagca	7320
	acuaggacag	guuaugcucc	ugguucugug	ugcaguuca	cuuuuguuaa	ugagaacauc	7380
5	augggcuuuu	ugugaagcuc	uaacccuagc	cacaggacca	auaacaacac	ucugggaagg	7440
	aucaccuggg	aaguucugga	acaccacgau	agcuguuucc	auggcgaaca	ucuuuagagg	7500
10	gagcuauuuu	gcaggagcug	ggcuugcuuu	uucuaucaug	aaucaguug	gaacaggaaa	7560
	gagagggaca	gggucacagg	gugaaaccuu	gggagaaaag	uggaaaaaga	aaaugaauca	7620
	auuaccccgg	aaagaguuu	accuuuacaa	gaaauccgga	aucacugaag	uggauagaac	7680
15	agaagccaaa	gaagggguu	aaagaggaga	aauaacacac	caugccgugu	ccagaggcag	7740
	cgcaaaacuu	caaugguucg	uggagagaaa	cauggucauc	cccgaaggaa	gagucauaga	7800
20	cuuaggcugu	ggaagaggag	gcuggucaua	uuauugugca	ggacugaaaa	aaguuacaga	7860
	agugcgagga	uacacaaaag	gcggccagg	acaugaagaa	ccaguaccua	ugucuacaua	7920
	cggauggaac	auagucaagu	uaaugagugg	aaaggaugug	uuuuaucuuc	caccugaaaa	7980
25	gugugauacu	cuauugugug	acauuggaga	aucuucacca	agcccaacag	uggaagaaag	8040
	cagaaccaua	agagucuuga	agaugguuga	accauggcua	agaaaauacc	aguuuugcau	8100
30	uaaaguauug	aaccuuaca	ugccaacugu	gauugagcac	cuagaaagac	uacaaaggaa	8160
	acauggagga	augcuuguga	gaaauccacu	cucacgaaac	uccacgcacg	aaauguacug	8220
	gauaucuaau	ggcacaggca	auaucguuuc	uucagucaac	augguaucca	gauugcuacu	8280
35	uaacagauuc	acaaugacac	auaggagacc	caccauagag	aaagaugugg	auuuaggagc	8340
	ggggacccga	caugucaaug	cggaaccaga	aacaccaac	auggauguca	uuggggaaag	8400
40	aauaagaagg	aucaaggagg	agcauaguuc	aacauggcac	uaugaugaug	aaaauccuua	8460
	uaaaacgugg	gcuuaccaug	gauccuauga	aguuaaggcc	acaggcucag	ccuccuccau	8520
	gauaaaugga	gucgugaaac	uccucacgaa	accaugggau	guggugccca	uggugacaca	8580
45	gauggcaaug	acggauacaa	ccccauucgg	ccagcaaagg	guuuuuuaag	agaaagugga	8640
	caccaggaca	cccagaccua	ugccagggaac	aagaaagguu	auggagauca	cagcggaaug	8700
50	gcuuuggaga	accuugggaa	ggaacaaaag	accagauua	uguacgagag	aggaguucac	8760
	aaaaaagguc	agaaccaacg	cagcuauugg	cgccguuuuu	acagaggaga	accaauugga	8820
	cagugcuaga	gcugcuguug	aggaugaaga	auucuggaaa	cucguggaca	gagaacguga	8880
55	acuccacaaa	uugggcaagu	guggaagcug	cguuuacaac	augaugggca	agagagagaa	8940
	gaaacuugga	gaguuggca	aagcaaaagg	caguagagcc	auaugguaca	ugugguuggg	9000
60	agccagauac	cuugaguucg	aagcacucgg	auucuuuuuu	gaagaccuu	gguucucgcg	9060
	ugaaaacucu	uacaguggag	uagaaggaga	aggacugcac	aagcugggau	acaucuuuag	9120

UA 129245 C2

	agacauuucc aagauacccg gaggagcuau gnaugcugau gacacagcug guugggacac	9180
5	aagaauaaca gaagaugacc ugcacaauga ggaaaaaauac acacagcaaa uggaccucuga	9240
	acacagggcag uuagcaaacg cuauauucaa gcucacauac caaaacaaag uggucuaagu	9300
	ucaacgacca acuccaaag gacgguaau ggacaucuaa ucuaggaaag accaaagagg	9360
10	caguggacag gugggaacuu auggucugaa uacauucacc aacauggaag cccaguuauu	9420
	cagacaaaug gaaggagaag guguguuguc gaaggcagac cucgagaacc cucaucugcu	9480
15	agagaagaaa guuacacaau gguuggaaac aaaaggagug gagagguaaa aaagaauggc	9540
	caucagcggg gaugauugcg uggugaaacc aaugaugac agguucgcca augcccugcu	9600
	ugcccugaau gacaugggaa aaguuaggaa ggacauaccu caauggcagc caucaaaagg	9660
20	auggcaugau uggcaacagg ucccuucug cucccaccac uucaugaau ugaucaugaa	9720
	agauggaaga aaguugguag uucccugcag accucaggau gaauuaaucg ggagagcgag	9780
25	aaucucucuaa ggagcaggau ggagccuuag agaaacugca ugccuagggg aagccuacgc	9840
	ccaaaugugg acucucaugu acuuucacag aagagaucuu agacuagcau ccaacgccau	9900
	auguucagca guaccagucc auuggguccc cacaagcaga acgacguggu cuauucaugc	9960
30	ucaccaucag uggaugacua cagaagacau gcuuacuguu uggaacaggg uguggauaga	10020
	ggauaaucua uggauggaag acaaaacucc agucaaaacc uggaagaug uuccauaucu	10080
35	agggaaagaga gaagaccaau ggugcggauc acucauuggu cucacuucca gagcaaccug	10140
	ggcccagaac auacuucgg caauccaaca ggugagaagc cuuauaggca augaagaguu	10200
	ucuggacuac augccuucga ugaagagauu caggaaggag gaggagucag agggagccau	10260
40	uugguaaacg uaggaaguga aaaagaggca aacugucagg ccaccuaag ccacaguacg	10320
	gaagaagcug ugcagccugu gagccccguc caaggacguu aaaagaagaa gucagggcca	10380
45	aaagccacgg uuugagcaaa ccgugcugcc uguggcuccg ucguggggac guaaaaccug	10440
	ggaggcugcg acuagcgguu agaggagacc ccucccguga cacaacgcag cagcggggcc	10500
	caagacuaga gguuagagga gacccccgc aaauaaaaac agcauuuuga cgcugggaga	10560
50	gaccagagau ccugcugucu ccucagcauc auuccaggca cagaacgccca gaaaauaggaa	10620
	uggugcuguu gaaucaacag guucu	10645
55	<210> 9	
	<211> 10618	
	<212> PHK	
	<213> штучна послідовність	
60	<220>	
	<223> DENV4	

	<400> 9					
	aguuguuagu	cuguguggac	cgacaaggac	aguuccaaau	cggaagcuug	cuaaacacag 60
5	uucuaacagu	uuguuugaau	agagagcaga	ucucuggaaa	aaugaaccaa	cgaaaaaagg 120
	ugguuagacc	accuuucaau	augcugaaac	gcgagagaaa	ccgcguauca	accccucaag 180
	gguuggugaa	gagauucuca	accggacuuu	uuucugggaa	aggacccuua	cggauggguc 240
10	uagcauucan	cacguuuuug	cgaguccuuu	ccaucaccac	aacagcaggg	auucugaaga 300
	gauggggaca	guugaagaaa	aaauaggcca	ucaagauacu	gauuggauuc	aggaaggaga 360
15	uaggccgcnu	gcugaacauc	uugaacggga	gaaaaagguc	aacgauaaca	uugcugugcu 420
	ugauucccac	cguaauggcg	uuuucccuca	gcacaagaga	uggcgaaccc	cucaugauag 480
	uggcaaaaca	ugaaaggggg	agaccucucu	uguuuuagac	aacagagggg	aucaacaaau 540
20	gcacucucan	ugccauggac	uugggugaaa	ugugugagga	cacugucacg	uauaaaugcc 600
	cccuacuggu	cauacccgaa	ccugaagaca	uugauugcug	gugcaaccuc	acgucuaccu 660
25	gggucaugua	ugggacaugc	acccagagcg	gagaacggag	acgagagaag	cgucucaguag 720
	cuuuaacacc	acauucagga	augggauugg	aaacaagagc	ugagacaugg	augucaucgg 780
	aaggggcuug	gaagcaugcu	cagagaguag	agagcuggau	acucagaaac	ccaggauucg 840
30	cgucucuggc	aggauuuuug	gcuuauauga	uugggcaaac	aggaauccag	cgaacugucu 900
	ucuuuguccu	aaugaugcug	gucgccccau	ccuacggauu	gcgaugcgua	ggaguaggaa 960
35	acagagacuu	uguggaagga	gucucaggug	gagcaugggu	cgaccuggug	cuagaacaug 1020
	gaggaugcgu	cacaaccaug	gcccagggaa	aaccaaccuu	ggauuuugaa	cugacuaaga 1080
	caacagccaa	ggaaguggcu	cuguaaagaa	ccuauugcau	ugaagccuca	auaucaaaaca 1140
40	uaacuacggc	aacaagaugu	ccaacgcaag	gagagccuua	ucugaaagag	gaacaggacc 1200
	aacaguacau	uugccggaga	gaugugguag	acagagggug	gggcaauggc	uguggcuugu 1260
45	uuggaaaagg	aggaguugug	acaugugcga	aguuuucan	uucggggaag	auaacaggca 1320
	auuuggucca	aaugagaaac	cuugaauaca	cagugguugu	aacaguccac	aauggagaca 1380
	cccaugcagu	aggaaaugac	acauccaauc	auuggaguuc	agccaugaua	acucccaggu 1440
50	caccaucggu	ggaagucaaa	uugccggacu	auuggagaacu	aacacucgau	ugugaaccca 1500
	ggucuggaa	ugacuuuaau	gagaugauuc	ugaugaaaau	gaaaaagaaa	acauggcucg 1560
55	ugcauaagca	auugguuuuug	gaucugccuc	uuccauggac	agcaggagca	gacacaucag 1620
	agguucacug	gaauuacaaa	gagagaauug	ugacauuuua	ggauccucau	gccaagagac 1680
	aggaugugac	agugcuggga	ucucaggaag	gagccaugca	uucugcccuc	gcuggagcca 1740
60	cagaagugga	cuccggugau	ggaaaucaca	uguuugcagg	acaucuuuag	ugcaaagucc 1800

UA 129245 C2

	guauggagaa	auugagaauc	aagggaaugu	cauacacgau	guguucagga	aaguuucaa	1860
5	uugacaaaga	gauggcagaa	acacagcaug	ggacaacagu	ggugaaaguc	aaguaugaag	1920
	gugcuggagc	uccguguaaa	gucuccauag	agauaagaga	uguaaacaag	gaaaaagugg	1980
	uugggcguau	caucucaucc	acccuuugg	cugagaauac	caacagugua	accaacauag	2040
10	aaauagaacc	cccuuuggg	gacagcuaca	uagugauagg	uguuggaaac	agcgcauuua	2100
	cacuccauug	guucaggaaa	gggaguucca	uuggcaagau	guuugagucc	acauacagag	2160
15	gugcaaaacg	aauggccaau	cuaggugaaa	cagcuuggga	uuuugguucc	guugguggac	2220
	uguucacauc	auugggaaag	gcugugcacc	agguuuuugg	aaguguguau	acaaccaugu	2280
	uuggaggagu	cucauggaug	auuagaaucc	uaauuggguu	cuuaguguug	uggauuggca	2340
20	cgaacucgag	gaacacuuca	auggcuauga	cgugcauagc	uguuggagga	aucacucugu	2400
	uucugggcuu	cacaguucaa	gcagacaugg	guuguguggc	gucauggagu	gggaaagaau	2460
25	ugaagugugg	aagcggaauu	uuugugguug	acaacgugca	cacuuggaca	gaacaguaca	2520
	aauuucaacc	agagucccca	gcgagacuag	cgucugcaau	auuaaaugcc	cacaaagaug	2580
	gggucugugg	aaauagauca	accacgaggc	uggaaaaugu	cauguggaag	caaauaacca	2640
30	acgagcuaaa	cuanguucuc	ugggaaggag	gacaugaccu	cacuguagug	gcuggggaug	2700
	ugaaggggggu	guugaccaa	ggcaagagag	cacucacacc	cccagugagu	gaucugaaau	2760
35	auucauggaa	gacaugggga	aaagcaaaaa	ucuucacccc	agaagcaaga	aauagcacau	2820
	uuuuauaga	cggaccagac	accucugaau	gccccaauga	acgaagagca	uggaacucuc	2880
	uugaggugga	agacuauuga	uuuggcaugu	ucacgaccaa	cauauuggaug	aaauuccgag	2940
40	aaggaaguuc	agaagugugu	gaccacaggu	uaaugucagc	ugcaauuaaa	gaucagaaag	3000
	cugugcaugc	ugacaugggu	uaugggauag	agagcucaaa	aaaccagacc	uggcagauag	3060
45	agaaagcauc	ucuuauugaa	gugaaaacau	gucuguggcc	caagaccac	acacugugga	3120
	gcaauuggagu	gcuggaaagc	cagaugcuca	uuccaaaauc	auaugcgggc	ccuuuuucac	3180
	agcacaauua	ccgccagggc	uaugccagc	aaaccguggg	ccauggcac	uuaggcaauu	3240
50	uagagauaga	cuuuggagaa	ugccccggaa	caacagucac	aaucaggag	gauugugacc	3300
	auagaggccc	aucuuugagg	accaccacug	caucuggaaa	acuagucacg	cauggugcu	3360
55	gccgcuccug	cacgaugccu	cccuuaaggu	ucuugggaga	agaugggugc	ugguauugga	3420
	uggagauuag	gcccuugagu	gaaaaagaag	agaacauggu	caaaucacag	gugacggccg	3480
	gacagggcac	aucagaaacu	uuuucuaugg	gucuguugug	ccugaccuug	uuuguggaag	3540
60	aaugcuugag	gagaagaguc	acuaggaaac	acaugauuu	aguuguggug	aucacucuuu	3600

	gugcuauc	ccugggaggc	cucacaugga	uggacuuacu	acgagcccuc	aucauguugg	3660
	gggacacuau	gucugguaga	auaggaggac	agauccaccu	agccaucaug	gcaguguuca	3720
5	agaugucacc	aggauacgug	cugggugugu	uuuuaggaa	acucacuuca	agagagacag	3780
	cacuaauggu	aauaggaug	gccaugacia	cggugcuuuc	aauuccacau	gaccuuauug	3840
10	aacucauuga	uggaauauca	cugggacuaa	uuuugcuaaa	aauaguaaca	caguuuugaca	3900
	acaccaagu	gggaaccua	gcucuuccu	ugacuuucau	aagaucaca	augccaauug	3960
	ucauggcuug	gaggaccau	auggcugugu	uguuuguggu	cacacucau	ccuuugugca	4020
15	ggacaagcug	ucuucaaaaa	cagucucau	ggguagaaau	aacagcacuc	auccuaggag	4080
	ccaagcucu	gccaguguac	cuaaugacuc	uuauagaaag	agccucaaga	agaucuuuggc	4140
20	cucuaacga	gggcauaaug	gcuguggguu	ugguuagucu	cuuaggaagc	gcucuuuuaa	4200
	agaaugaugu	ccuuuagcu	ggcccaaug	uggcaggagg	cuuacuucug	gcggcuuacg	4260
	ugaugagugg	uagcucagca	gaucugucac	uagagaaggc	cgccaacgug	cagugggaug	4320
25	aaauggcaga	cauaacaggc	ucaagccca	ucauagaagu	gaagcaggau	gaagauggcu	4380
	cuuucuccau	acgggacguc	gaggaaacca	auaugauaac	ccuuuuggug	aaacuggcac	4440
30	ugauaacagu	gucaggucuc	uaccccuugg	caauuccagu	cacaauagacc	uuauugguaca	4500
	uguggcaagu	gaaaacacaa	agaucaggag	cccuguggga	cgucuccuca	cccgcugcca	4560
	cuaaaaaagc	cgcacugucu	gaaggagugu	acaggaucau	gcaaagaggg	uuauucggga	4620
35	aaacucaggu	uggaguagg	auacacaugg	aagguguauu	ucacacaau	uggcauguaa	4680
	caagaggau	agugaucugc	cacgagacug	ggagauugga	gccaucuugg	gcugacguca	4740
40	ggaugacau	gauaucuac	gguggggggu	ggaggcuugg	agacaaaugg	gacaaagaag	4800
	aagacguuca	gguccucgcc	auagaaccag	gaaaaaucc	uaaacauguc	caaacgaaac	4860
	cuggccuuuu	caagaccua	acuggagaaa	uuggagcagu	aacauuagau	uucaaaccgg	4920
45	gaacgucug	uucuccauc	aucaacagga	aaggaaaagu	caucggacuc	uauggaaaug	4980
	gaguaguua	caauacaggu	gauuacguca	gugccauaac	gcaagccgaa	agaauuggag	5040
50	agccagauua	ugaaguggau	gaggacauuu	uucgaaagaa	aagauuaacu	auaauggacu	5100
	uacacccgg	agcuggaaa	acaaaaagaa	uucuuuccauc	aaauagugaga	gaagccuuaa	5160
	aaaggaggcu	acgaacuug	auuuuagcuc	ccacgagagu	gguggcggcc	gagauggaag	5220
55	aggccuacg	uggacugcca	auccguuau	agacccagc	ugugaaauca	gaacacacag	5280
	gaagagagau	uguagaccuc	augugucaug	caaccuucac	aacaagacuu	uugucaucaa	5340
60	ccaggguucc	aaauuacaac	cuuauaguga	uggaugaagc	acauuucacc	gaucuuucua	5400
	gugucgccc	uagaggauac	aucucgacca	ggguggaaa	gggagaggca	gcagccaucu	5460

UA 129245 C2

ucaugaccgc aaccccuccc ggagcgacag aucccuucc ccagagcaac agcccaauag 5520

5 aagacaucga gagggaaauu ccggaaggu cauggaacac agguucgac uggauaacag 5580

acuaccaagg gaaaacugug ugguuuguuc ccagcauaaa agcuggaaa gacauugcaa 5640

auuguuugag aaagucggga aagaaaguua uccaguugag uaggaaaacc uuugauacag 5700

10 aguauccaaa aacgaaacuc acggacuggg acuuuguggu cacuacagac auaucugaaa 5760

ugggggcca uuuuagagcc gggagaguga uagaccuag aagaugccuc aagccaguua 5820

15 uccuaccaga ugggccagag agagucauuu uagcaggucc uauuccagug acuccagcaa 5880

gcgugcuca gagaagaggg cgaauaggaa ggaaccagc acaagaagac gaccaauacg 5940

uuuucuccgg agaccacua aaaaugaug aagaucaugc ccacuggaca gaagcaaaga 6000

20 ugcugcuuga caauaucuac accccagaag ggaucauucc acauuguuu gguccggaaa 6060

gggaaaaaac ccaagccauu gauggagagu uucgccucag aggggaacaa aggaagacuu 6120

25 uuguggaaau aaugaggaga ggagaccuuc cgguguggcu gagcuuaag guagcuucug 6180

cuggcauuuc uuacaaagau cgggauggu gcuucacag ggaagaaa uaccaaaauu 6240

uagaagaaaa cauggaggu gaaauugga cuagagaggg agaaaagaaa aagcuaaggc 6300

30 caagaugguu agaugcacgu guauacgcug accccauggc uuugaaggau uucaaggagu 6360

uugccagugg aaggaagagu auaacucug acauccuaac agagauugcc aguuugccaa 6420

35 cuuaccuuuc cucuagggcc aagcucgcc uugauaacau agucaugcuc cacacaacag 6480

aaagaggagg gagggccuau caacacgcc ugaacgaacu uccggaguca cuggaaacac 6540

ucaugcuugu agcuuuacua ggugcuauga cagcaggcau cuuccuguuu uucaugcaag 6600

40 ggaaaggaau agggaaauug ucaauggguu ugauaaccau ugcgguggcu aguggcuugc 6660

ucuggguagc agaaaucaa ccccagugga uagcggccuc aaucuaacua gaguuuuuuc 6720

ucaugguacu guugauaccg gaaccagaaa acaaaggac cccacaagac aaucuuuga 6780

45 ucuacgucau auugaccau cucaccau uuggucuaau agcagccaac gagauugggc 6840

ugauugaaaa acaaaaacg gauuuugggu uuaccaggu aaaaacagaa accaccaucc 6900

50 ucgaugugga cuugagacca gcuucagcau ggacgcucua ugcaguagcc accacaauuc 6960

ugacucccau gcugagacac accauagaaa acacgucggc caaccuaucu cuagcagcca 7020

uugccaacca ggcagccguc cuaauggggc uuggaaaagg auggccgcuc cacagaauug 7080

55 accucggugu gccgcuguua gcaaugggau gcuauucua agugaacca auaaccuuga 7140

cagcauccuu agucaugcuu uucguccau augcauaau aggccagga uugcaggcaa 7200

60 aagccacaag agaggcccag aaaaggacag cugcugggau caugaaaau cccacagugg 7260

UA 129245 C2

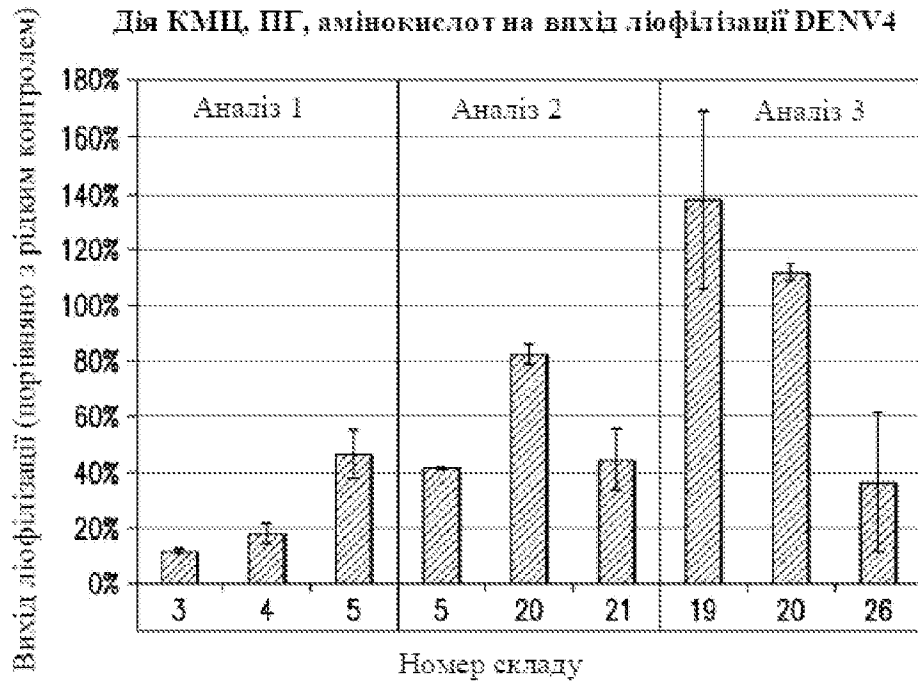
acgggauaac aguaauagau cuagaaccaa uauccuauga cccaaaauuu gaaaagcaau 7320  
 uagggcaggu caugcuacia gucuugugug cuggacaacu acucuugaug agaacaacau 7380  
 5 gggcuuucug ugaagucuug acuuuggcca caggaccaau cuugaccuug ugggagggca 7440  
 acccggaag guuuuggaac acgaccuag ccguauccac cgccaacauu uucaggggaa 7500  
 10 guuacuuggc gggagcugga cuggcuuuuu cacucauaaa gaaugcacia accccuagga 7560  
 ggggaacugg gaccacagga gagacacugg gagagaagug gaagagacag cuaaacucau 7620  
 uagacagaaa agaguugaa gaguaaaaa gaaguggaau acuagaagug gacaggacug 7680  
 15 aagccaaguc ugcccugaaa gaugggucua aaaucaagca ugcaguauca agagggucca 7740  
 guaagaucag auggauuguu gagagagga ugguaaagcc aaaagggaaa guuguagauc 7800  
 uuggcugugg gagaggagga uggucuauu acauggcgac acucaagaac gugacugaag 7860  
 20 ugaaagggua uacaaaagga gguccaggac augaagaacc gauuccaug gcuacuuaug 7920  
 guuggaauuu ggucaaacuc caucagggg uugacguguu cuacaaacc acagagcaag 7980  
 25 uggacaccu gcucugugau auuggggagu caucuucuaa uccaacaaua gaggaaggaa 8040  
 gaacauuaag aguuugaag augguggagc cauggcucuc uucaaacu gaauucugca 8100  
 ucaaaguccu uaacccuac augccaacag ucauagaaga gcuggagaaa cugcagagaa 8160  
 30 aacauggugg gaaccuuguc agauggccgc uguccaggaa cuccaccuau gagauguauu 8220  
 gggugucagg agcgucggga acauuguga gcucugugaa cacaacauca aagauguugu 8280  
 35 ugaacagguu cacaacaagg cauaggagac ccacuuauga gaaggacgua gaucuugggg 8340  
 caggaacgag aagugucucc acugaaacag aaaaaccaga caugacauc auugggagaa 8400  
 ggcucagcg auugcaagaa gagcaciaag aaaccuggca uuaugaucag gaaaaccuau 8460  
 40 acagaaccug ggcguaucau ggaagcuau aagcuccuuc gacaggcucu gcauccucca 8520  
 uggugaacgg ggugguaaaa cugcuaaaa aaccuggga ugugauucca auggugacuc 8580  
 45 aguuagccau gacagauaca accccuuug ggcaacaag aguguucaa gagaaggugg 8640  
 auaccagaac accacaacca aaaccggua cacgaauggu uaugaccag acagccaauu 8700  
 ggcugugggc ccuccuugga aagaagaaaa auccagacu gugcacaagg gaagaguuca 8760  
 50 ucuaaaaagu uagaucaaac gcagccauag ggcagucuu ucaggaagaa cagggauuga 8820  
 caucagccag ugaagcugug aaugacagcc gguuuugga acugguugac aaagaaagg 8880  
 55 ccuacacca ggaagggaaa ugugaaucgu gugucuaua caugaugga aaacgugaga 8940  
 aaaaguagg agaguuggc agagccaagg gaagccgagc aaucugguac auguggcugg 9000  
 gagcgcgguu ucuggaauuu gaagcccugg guuuuuugaa ugaagaucac ugguuuggca 9060  
 60 gagaaaauc auggagugga guggaaggg aaggucugca cagauggga uauaucugg 9120

	aggagauaga caagaaggau ggagaccuaa uguaugcuga ugacacagca ggcugggaca	9180
5	caagaaucac ugaggaugac cuucaaaaug aggaacugau cacggaacag auggcucccc	9240
	accacaagau ccuagccaaa gccauuuuca aacuaaccua ucaaaaacaaa guggugaaag	9300
	uccucagacc cacaccgctg ggagctgguga uggauaucau auccaggaaa gaccsaaagag	9360
10	guaguggaca aguuggaaca uaugguuuga acacauucac caacauggaa guucaacuca	9420
	uccgccaaau ggaagcugaa ggagucauca cacaauga caugcagaac ccaaaagggu	9480
15	ugaaagaaag aguugagaaa uggcugaaaag aguguggugu cfacagguaa aagaggauyg	9540
	caaucagugg agacgauugc guggugaagc cccuagauga gagguuuygc acuucccucc	9600
	ucuucuuuga cfacauyggg aaggugagga aagacauucc gcaguyggaa ccaucuaayg	9660
20	gauggaaaaa cuygcaagag guuccuuuuu gcucccaccs cuucacaaag auuuuuuga	9720
	aggauyggcg cucacuaguu guuccauyua gaaaccagga ugaacugaua gggagaygcca	9780
25	gaaucucgca gggagcuyga uggagcuuaa gagaaacagc cugccuyggc aaagcuuayg	9840
	cccagaugug gucgcuuaug uacuuccaca gaayggaucu gcguuuaygc uccauyggcca	9900
	uaugcucagc aguuccaayg gaaugguuuc caacaaygag aacaacauyg ucaauccayg	9960
30	cucaucacca guggauyacc acugaagaua ugcucaaagu guggaacaga guguyggauag	10020
	aagacaaccs uaauaugacu gacaagacuc caguccauuc gugggaagau auaccuuacc	10080
35	uayggaaaaa agaygauuyg ugguyggau cccugauuyg acuuucuuucc ayagccaccu	10140
	ggcgaaagaa cauucacayg gccauaaccc aggucaygga ccugaucgga aaagayggaau	10200
	ayguygauua caugccagua augaaaagau acayugcucc uucayagayg gaaygayguuc	10260
40	uguaauuacc aacaacaaac accaaaygcu auugaayuca gggcacuuyg gccaygguuu	10320
	gagcaaaccg ugcuygcuuyg agcuccgcca auauyggag gcguauuaau ccccayggag	10380
45	gccauygcgc acggaaygug uacgcyggc auauyggacu agcgguuaga ggagaccscc	10440
	cccaucayg acaaaaygca gcaaaayggg gcccaayacu ayagguuaga ggagaccscc	10500
	ccaacacaaa aacaygcauu ugcayguygg aaagaccaga gaucuyguyg ucucuygcaac	10560
50	aucaauccay gcacayagcg ccgcaayug gauuygguyg guugaucsaay cagguucuu	10618

**ФОРМУЛА ВИНАХОДУ**

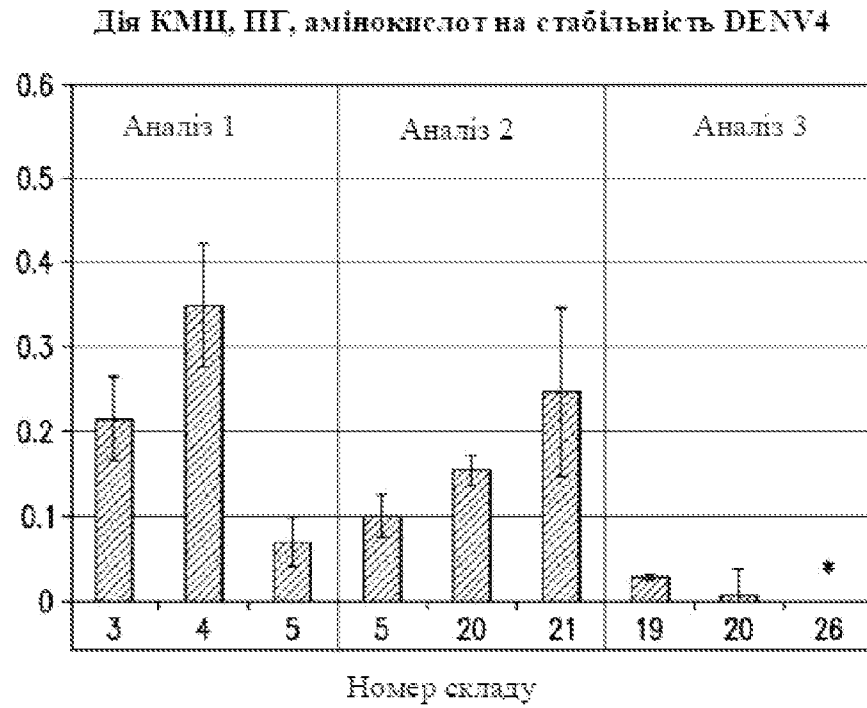
1. Склад, який містить такі компоненти:
- 55 а) жива атенуйована чотиривалентна вакцина денге, яка містить: i) 100-10000000 БУО/мл вірусу rDEN1Δ30, ii) 100-10000000 БУО/мл вірусу rDEN2/4Δ30, iii) 100-10000000 БУО/мл вірусу rDEN3Δ30/31, i iv) 100-10000000 БУО/мл вірусу rDEN4Δ30;
- б) 11 мМ буфера на основі фосфату калію за рН 7,0-8,0,
- с) 90 мг/мл сахарози,
- 60 д) 5 мг/мл пропіленгліколю,
- е) 5 мг/мл карбоксиметилцелюлози натрію,

- f) 50 мМ NaCl і  
 g) 25 мМ Leu.  
 2. Склад за п. 1, в якому буфер на основі фосфату калію має рН 7,5.  
 3. Склад за п. 1, в якому вакцина включає: і) 200-200000 БУО/мл вірусу гDEN1Δ30, іі) 200-200000 БУО/мл вірусу гDEN2/4Δ30, ііі) 200-200000 БУО/мл вірусу гDEN3Δ30/31, і іv) 200-200000 БУО/мл вірусу гDEN4Δ30.  
 5 4. Склад за п. 1, в якому гDEN1Δ30 являє собою гDEN1Δ30-1545; гDEN2/4Δ30 являє собою гDEN2/4Δ30 (ME)-1495,7163; гDEN3Δ30/31 являє собою гDEN3Δ30/31-7164; і гDEN4Δ30 являє собою гDEN4Δ30-7132,7163,8308.



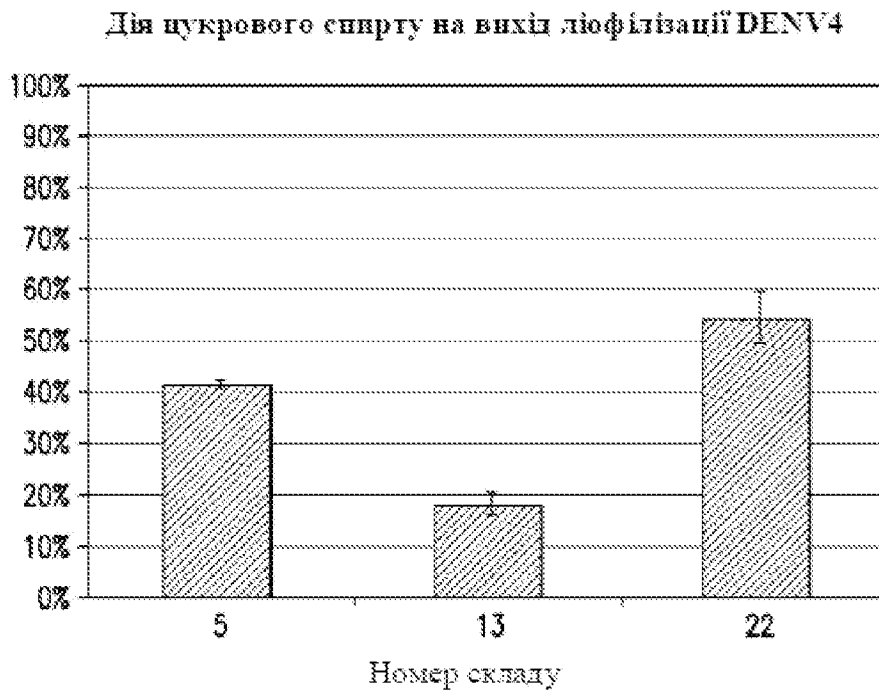
Фіг. 1

Логістична функція втрати через 1 тиждень при 25°C

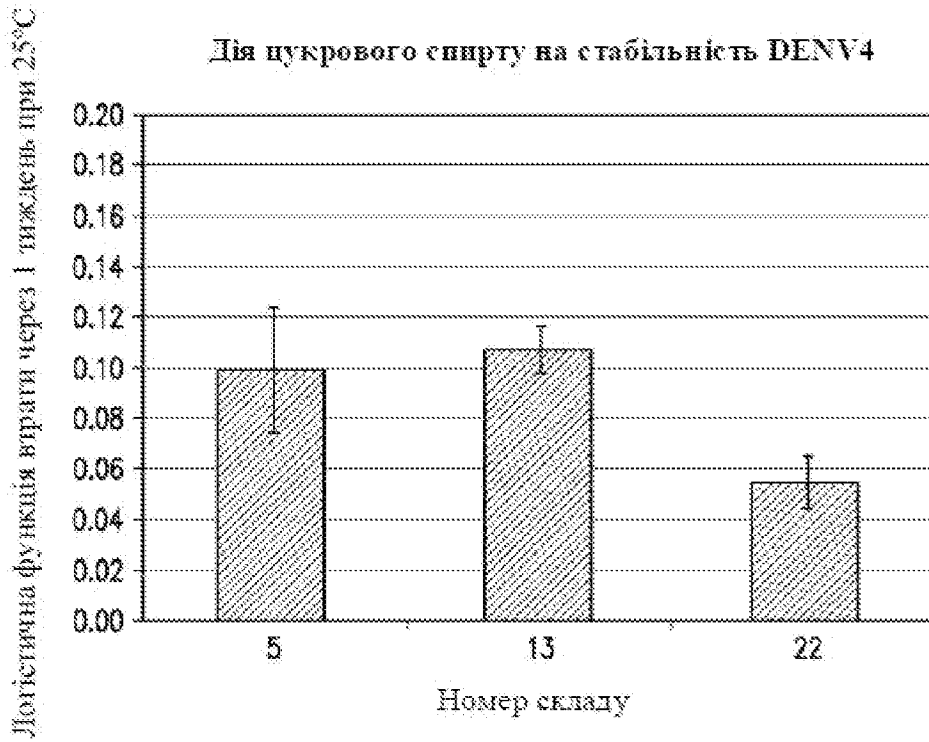


Фіг. 2

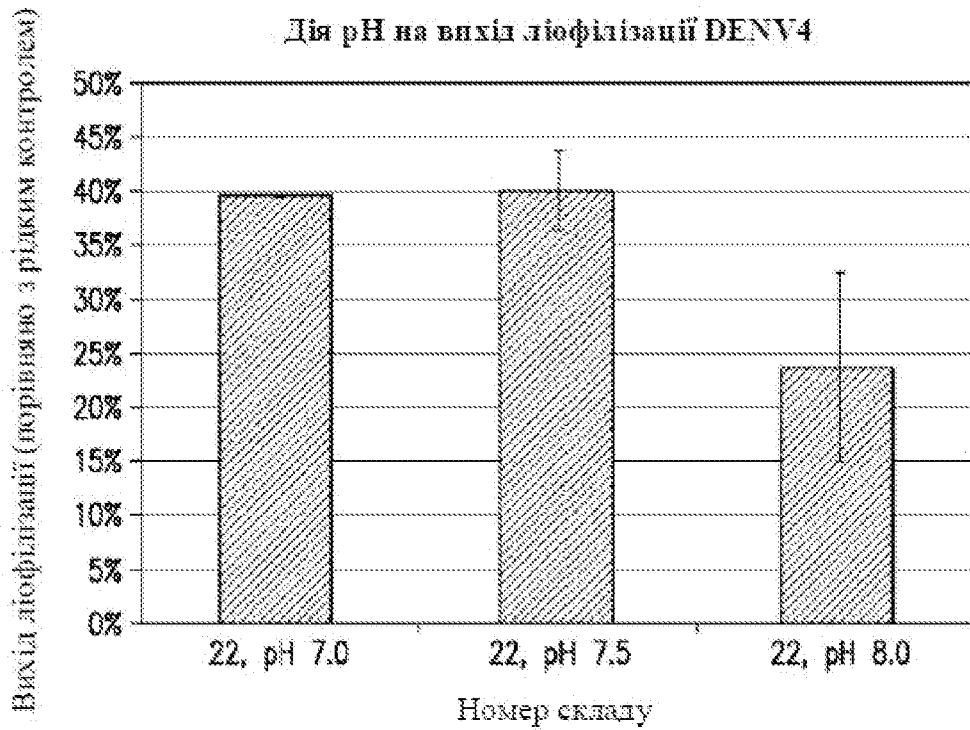
Вихід ліофілізації (порівняно з рідким контролем)



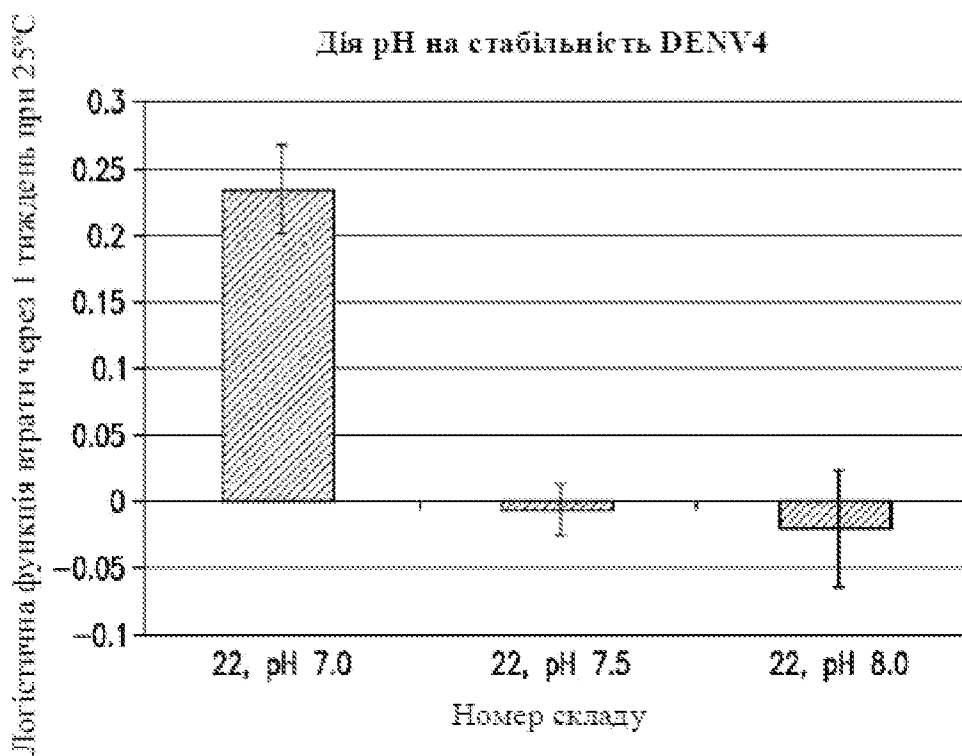
Фіг. 3



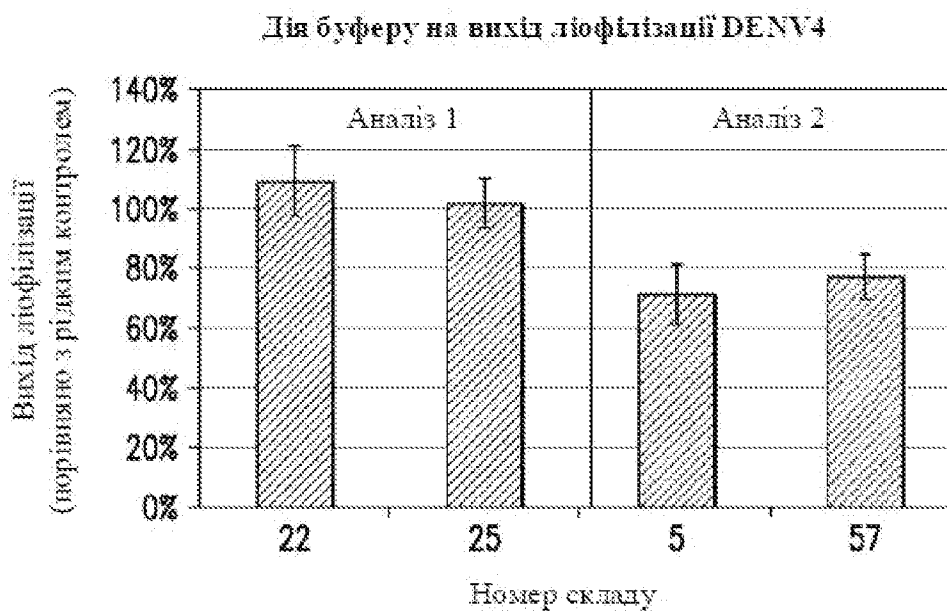
Фиг. 4



Фиг. 5

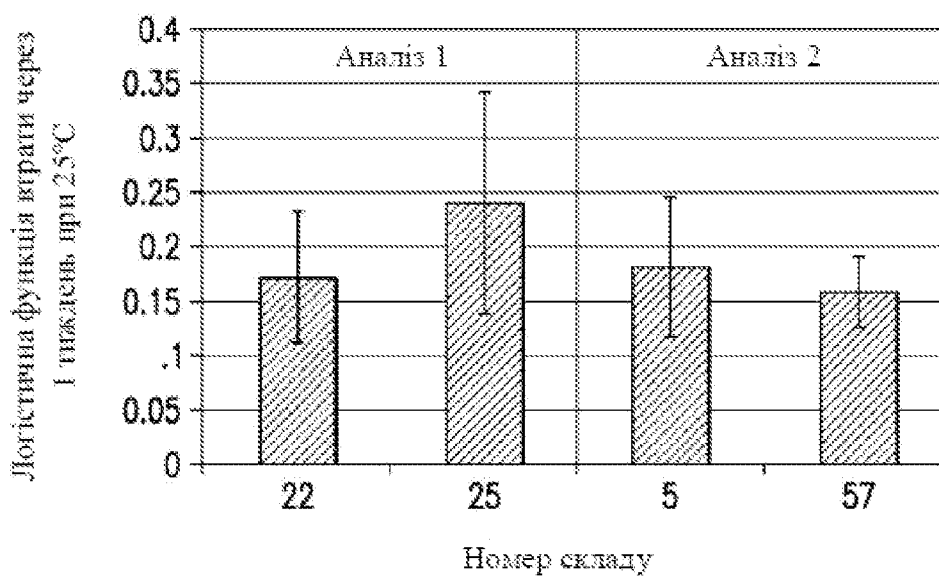


Фіг. 6



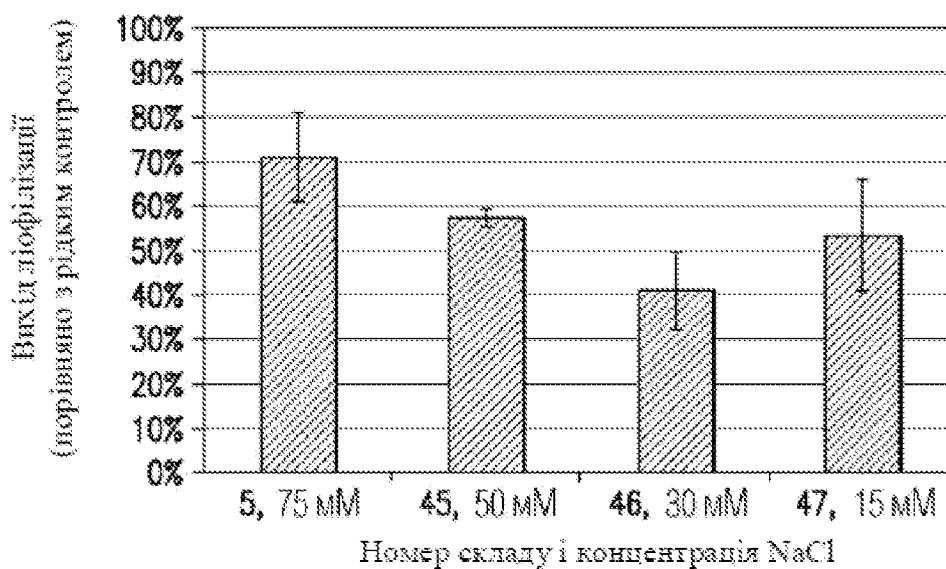
Фіг. 7

Дія буферу на стабільність DENV4



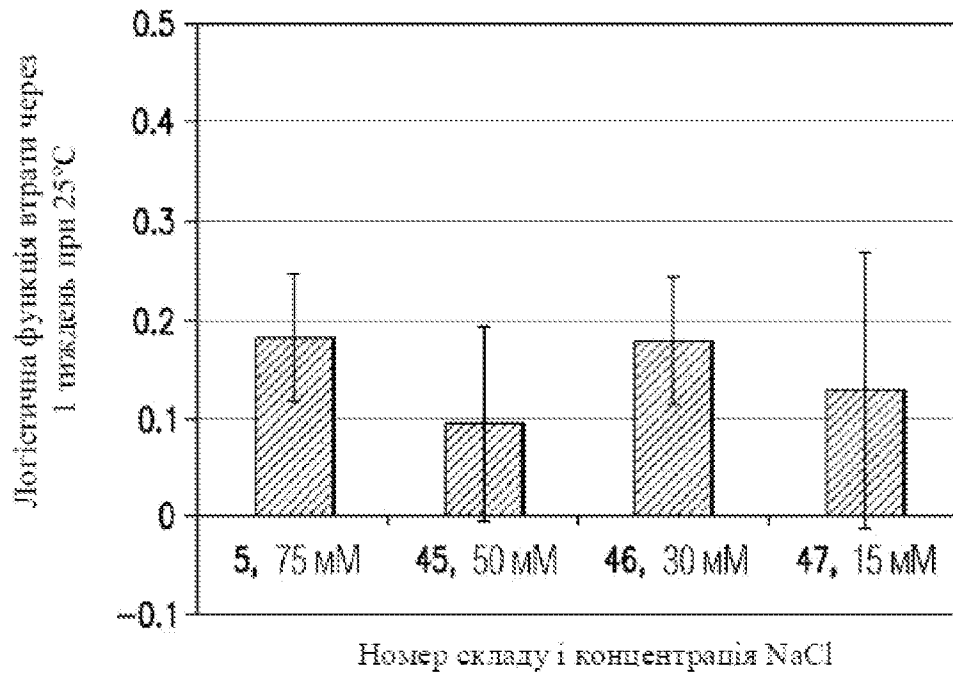
Фіг. 8

Дія концентрації NaCl на вихід ліофілізації DENV4



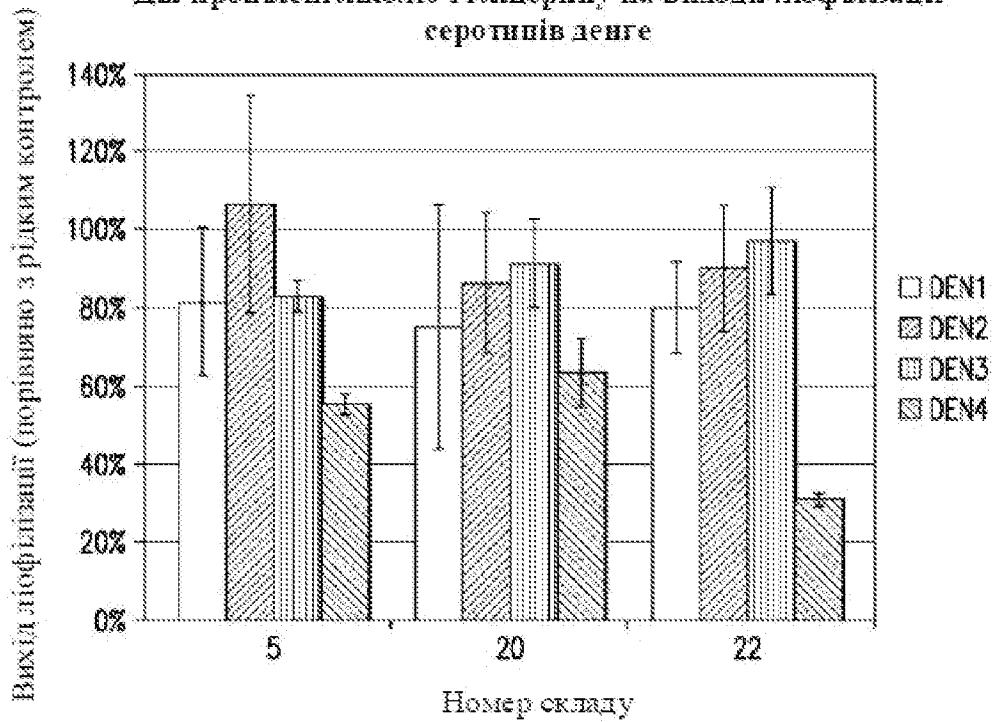
Фіг. 9

Дія концентрацій NaCl на стабільність DENV4



Фіг. 10

Дія пропіленгліколю і гліцерину на вихід ліофілізації серотипів денге

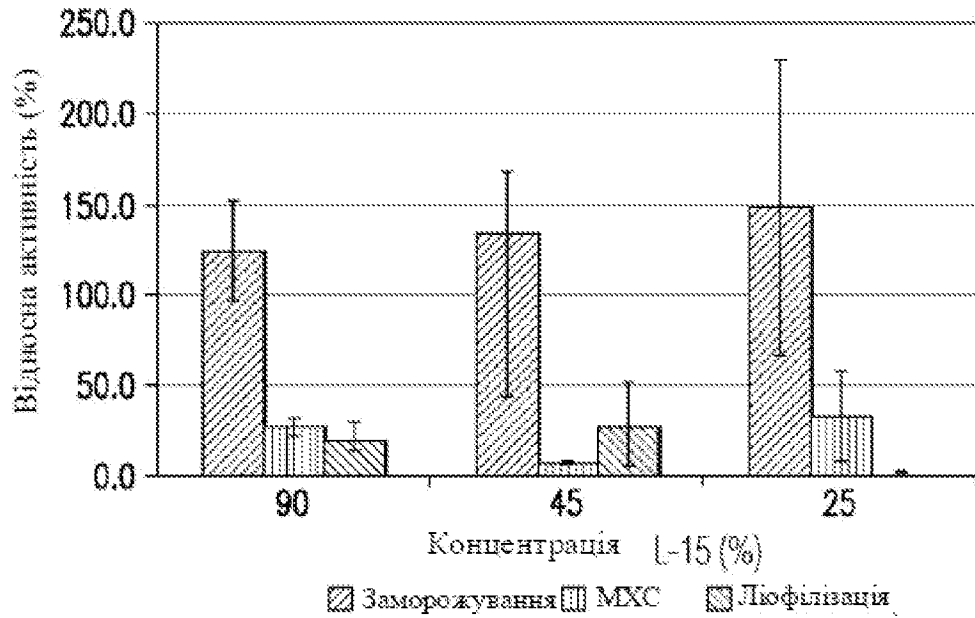


Фіг. 11



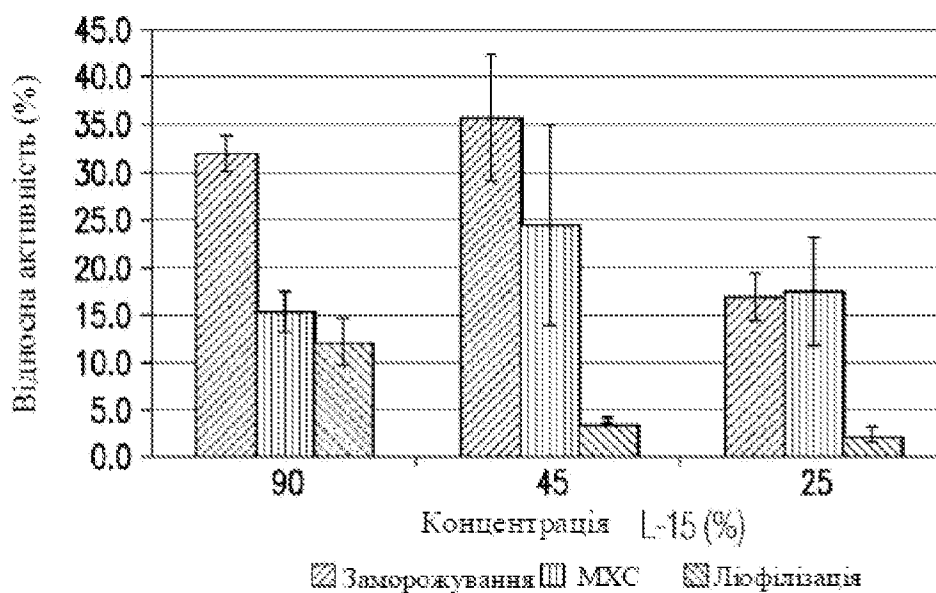
Фіг. 12

**L-15 титрування: DEN1**



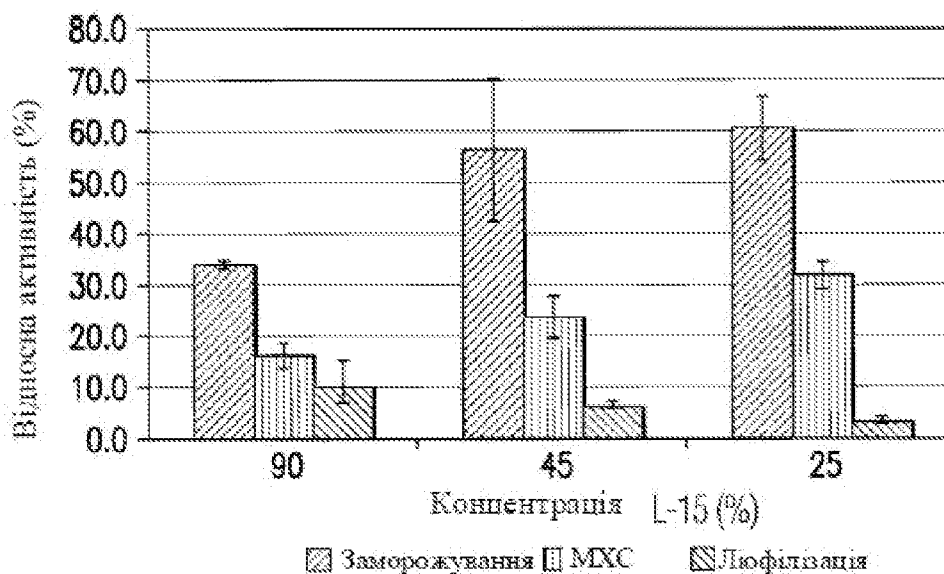
Фіг. 13

L-15 титрування: DEN2



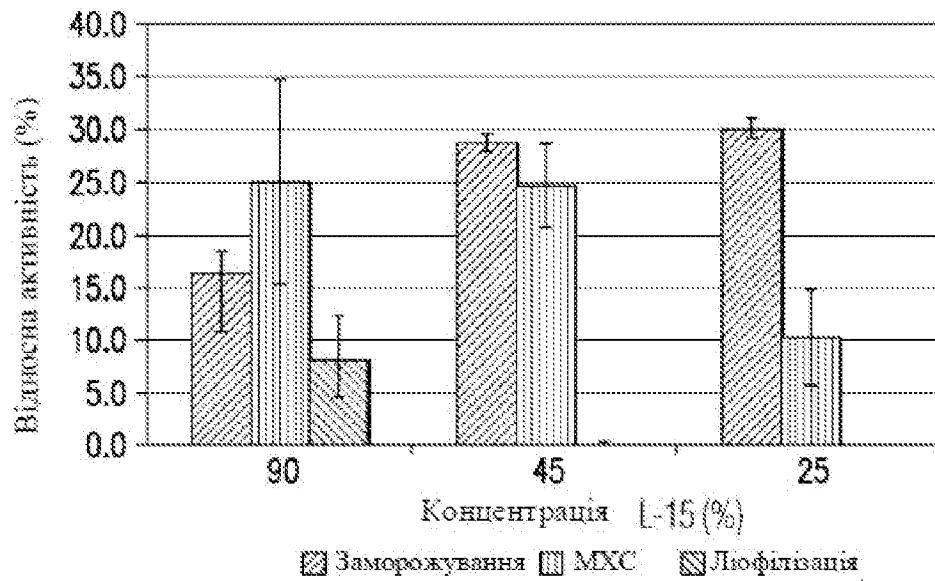
Фіг. 14

L-15 титрування: DEN3



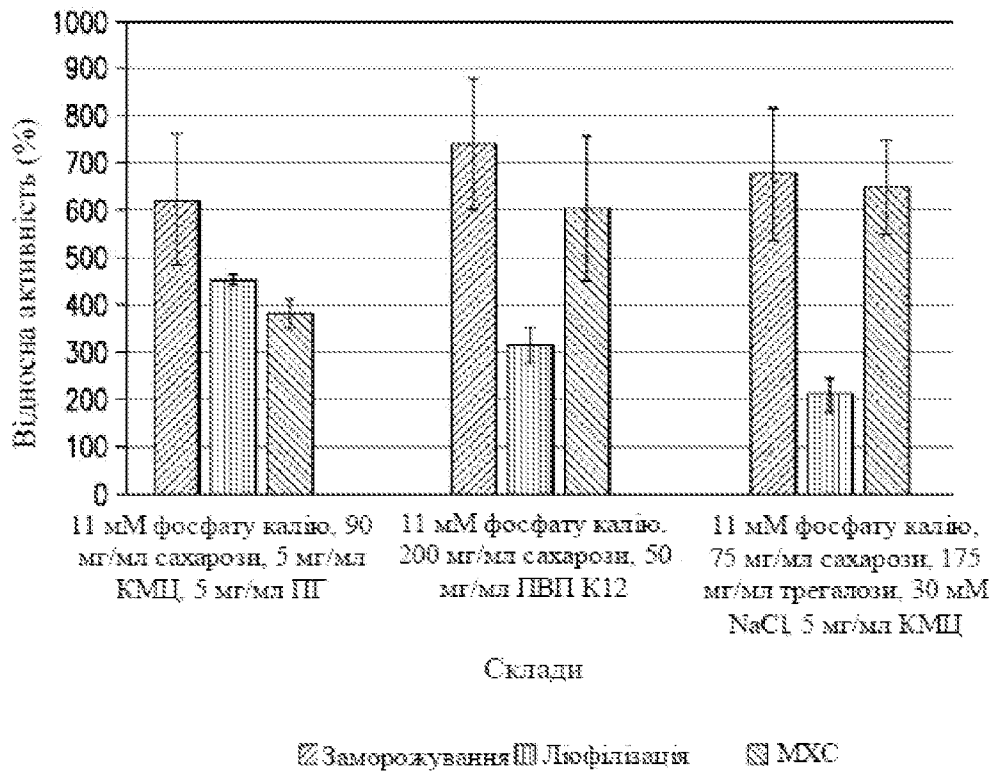
Фіг. 15

L-15 титрування: DEN4

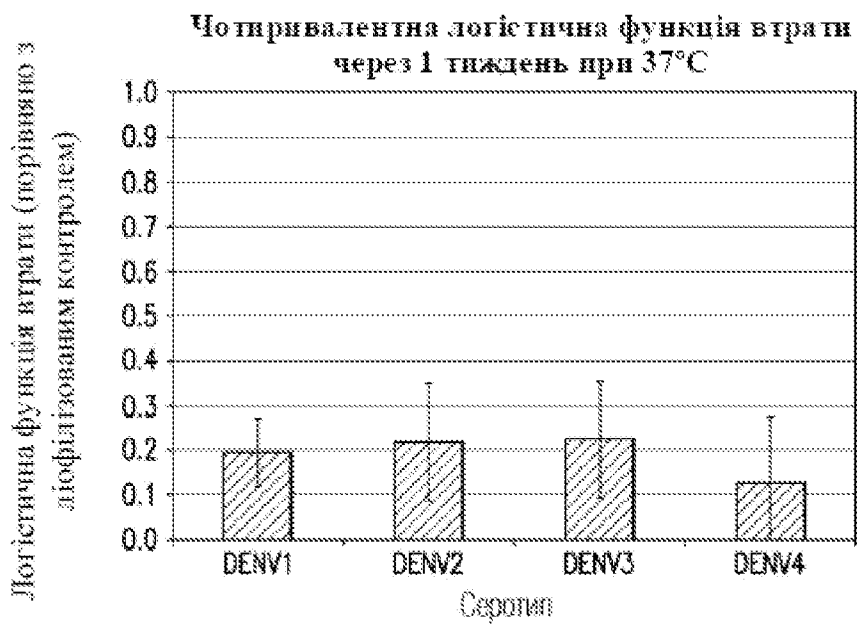


Фіг. 16

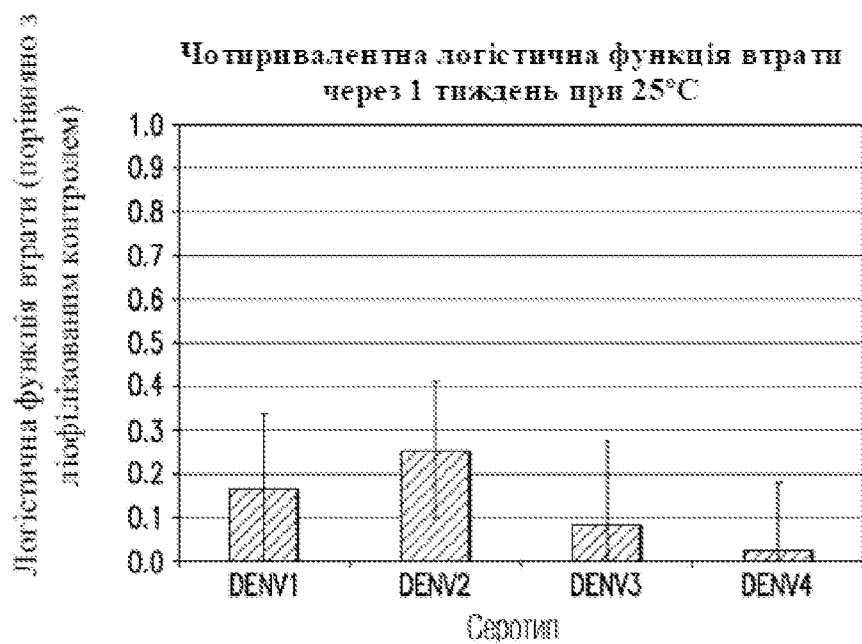
Склади: ліо до MXC



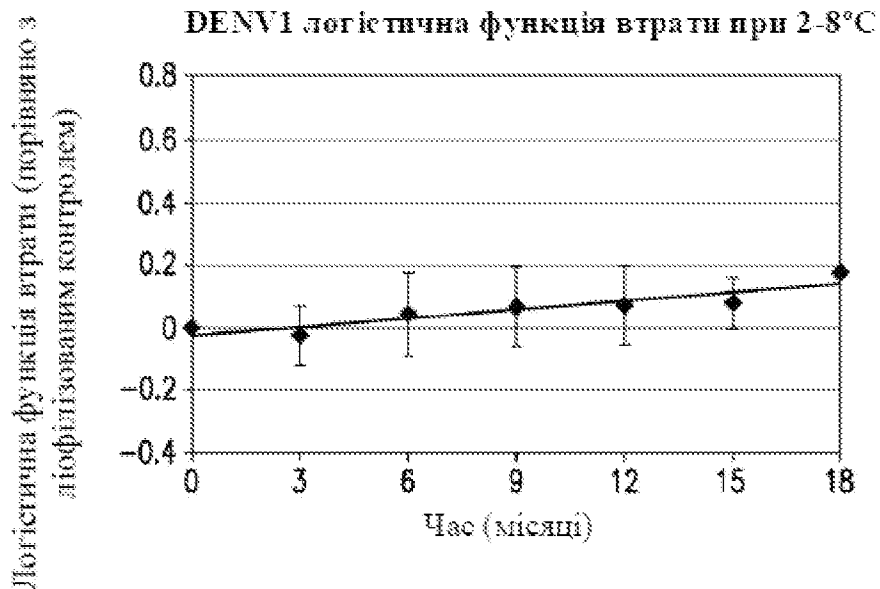
Фіг. 17



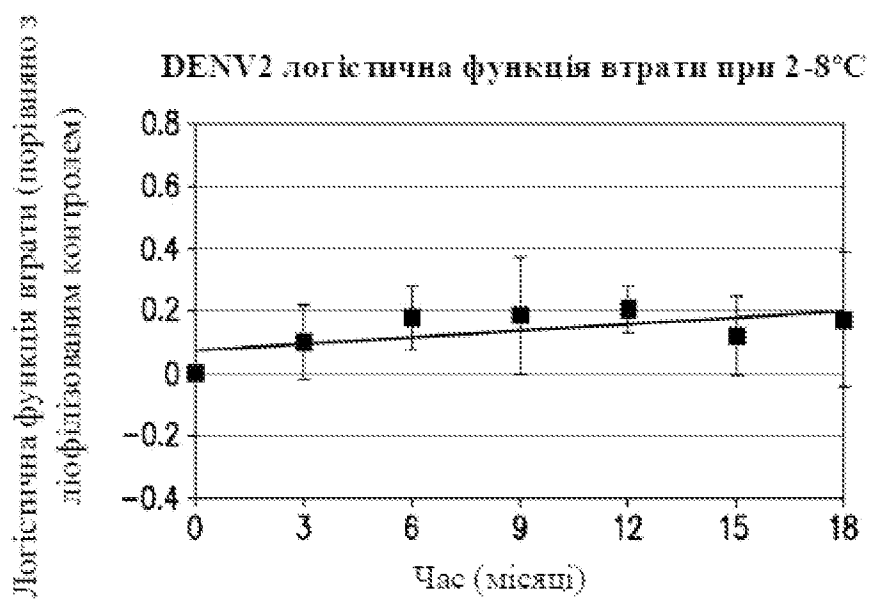
Фіг. 18А



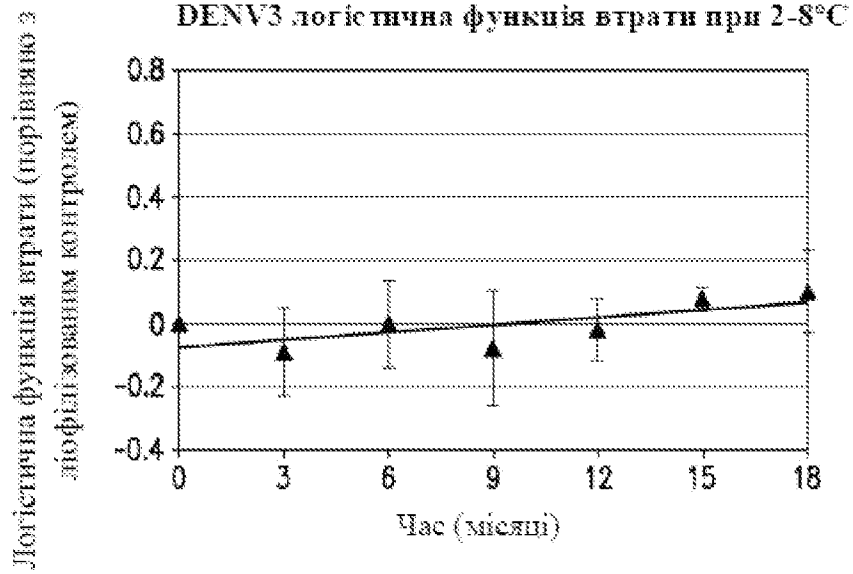
Фіг. 18В



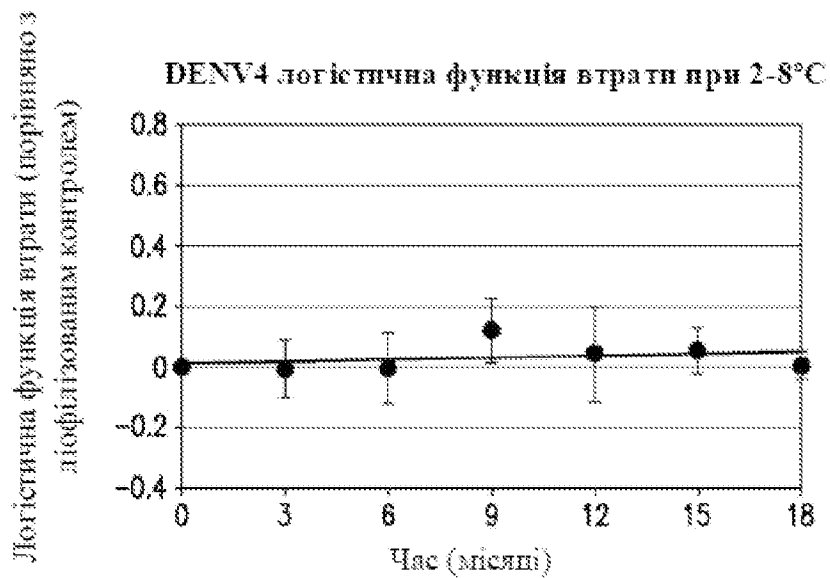
Фіг. 19А



Фіг. 19В



Фіг. 19С



Фіг. 19D