



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93236 (13) C2  
(51) МПК  
A61K 39/145 (2011.01)  
A61P 31/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ІНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ, ЯКА МІСТИТЬ ВІРОСОМИ ГРИПУ, УТВОРЕНІ З РЕКОНСТРУЙОВАНИХ ОБОЛОНОК ЗАЗНАЧЕНОГО ВІРУСУ, ЗАСТОСУВАННЯ ЗАЗНАЧЕНИХ ВІРОСОМ, ВАКЦИНА, ЯКА МІСТИТЬ ЗАЗНАЧЕНУ КОМПОЗИЦІЮ, ТА ЗАСІБ ДЛЯ ІНТРАНАЗАЛЬНОГО АБО ІНГАЛЯЦІЙНОГО ВВЕДЕННЯ**

1

(21) а200812366  
(22) 21.03.2007  
(24) 25.01.2011  
(86) РСТ/ЕР2007/052690, 21.03.2007  
(31) 06111534.1  
(32) 22.03.2006  
(33) EP  
(31) 60/784,462  
(32) 22.03.2006  
(33) US  
(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.  
(72) КЕРСТЕН АЛЕКСАНДЕР Й., NL, ГЕРЕЗ ЛІСІЯ, NL, ШОН ПІТЕР Й., NL, НАУТА ЙОЗЕФ Й.П., NL, ВАН РАЙНЕК ЛЮССІУС ДОРІН Х., NL  
(73) ЕББОТ БІОЛОДЖІКАЛЗ Б.В., NL  
(56) GLUCK U ET AL: "Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli Heat-Labile Toxin in adult volunteers" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 73, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 7780-7786  
WO 2004/110486 A 23.12.2004  
(57) 1. Композиція для одноразового інтраназального введення людині, здатна спричинювати системну та/або локальну імунну реакцію проти антигенів грипу - гемаглютиніну та/або нейрамінідази або їх похідних, яка містить віросоми грипу, утворені з реконструйованих оболонок зазначеного вірусу, у якій:  
• оболонки вірусу повністю походять з частинок вірусу грипу,  
• додаток ліпідів із зовнішніх джерел до реконструйованих віросом відсутній,  
• віросоми являють собою гемаглютинін та/або нейрамінідазу грипу або їх похідні,  
• доза гемаглютиніну на штам грипу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 30 мкг,  
яка відрізняється тим, що позбавлена окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів.  
2. Композиція за п. 1, у якій одноразове інтраназальне або інгаляційне введення вакцини також

2

спроможне викликати цитотоксичну реакцію лімфоцитів.  
3. Композиція за п. 1 або 2, у якій імунна реакція відповідає критеріям СНМР для вакцини проти грипу.  
4. Композиція за п. 3, у якій імунна реакція забезпечує принаймні один з показників рівня серозахисту >70 % для дорослих та/або >60 % для літніх, рівня сероконверсії >40 % для дорослих та/або >30 % для літніх, середньої кратності зростання >2,5 для дорослих та/або >2,0 для літніх.  
5. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, у якій доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 25 мкг.  
6. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, у якій доза гемаглютиніну на штам вірусу з одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 20 мкг.  
7. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, у якій доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі менша або дорівнює 15 мкг.  
8. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, у якій доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі менша або дорівнює 10 мкг.  
9. Композиція за будь-яким з пп. 1-4, у якій доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі менша або дорівнює 5 мкг.  
10. Застосування віросом грипу, утворених з реконструйованих оболонок зазначених вірусів, для виготовлення композиції для одноразового інтраназального введення людині, здатної спричинювати системну та/або локальну імунну реакцію проти антигенів грипу - гемаглютиніну та/або нейрамінідази або їх похідних, яка містить віросоми грипу, утворені з реконструйованих оболонок зазначеного вірусу, у якій:  
• оболонки вірусу повністю походять з частинок вірусу грипу,  
• додаток ліпідів із зовнішніх джерел до реконструйованих віросом відсутній,

(19) UA (11) 93236 (13) C2

- віросоми являють собою гемаглютинін та/або нейрамінідазу грипу або їх похідні,
- доза гемаглютиніну на штам грипу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 30 мкг, яка позбавлена окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів.
- 11. Застосування за п. 10, у якому одноразове інтраназальне або інгаляційне введення вакцини також спрможне викликати цитотоксичну реакцію лімфоцитів.
- 12. Застосування за п. 10 або 11, у якому імунна реакція відповідає критеріям CHMP для вакцини проти грипу.
- 13. Застосування за п. 12, у якому імунна реакція забезпечує один або більше з показників рівня серозахисту >70 % для дорослих та/або > 60 % для літніх, рівня сероконверсії > 40 % для дорослих та/або > 30 % для літніх, середньої кратності зростання > 2,5 для дорослих та/або > 2,0 для літніх.
- 14. Застосування за будь-яким з пп. 10-13, у якому доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 25 мкг.
- 15. Застосування за будь-яким з пп. 10-13, у якому доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній

інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 20 мкг.

16. Застосування за будь-яким з пп. 10-13, у якому доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 15 мкг.

17. Застосування за будь-яким з пп. 10-13, у якому доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 10 мкг.

18. Застосування за будь-яким з пп. 10-13, у якому доза гемаглютиніну на штам вірусу в одиничній інтраназальній або інгаляційній дозі дорівнює або менша 5 мкг.

19. Застосування за будь-яким з пп. 10-18, у якому виготовлена композиція являє собою вакцину.

20. Вакцина, яка містить композицію за будь-яким з пп. 1-9.

21. Засіб для інтраназального або інгаляційного введення, який містить вакцину за п. 20 та механізм для приведення вакцини у форму аерозолу.

22. Засіб за п. 21, який містить дозу вакцини для одиничного інтраназального або інгаляційного введення.

23. Засіб за будь-яким з пп. 21, 22, який є одноразовим.

Цей винахід стосується, наприклад, композицій для інактивованих вакцин проти грипу та шляхів введення, де одинична інтраназальна або інгаляційна введена доза спричинює системну імунну реакцію, яка позитивно корелює з клінічним захистом.

Випробувалися різні варіанти імунізації проти грипу назальним або орофарінгальним шляхом з використанням інактивованого антигену грипу як альтернатива підшкірній або внутрішньом'язовій імунізації шляхом уколу. Експериментальні моделі на тваринах свідчать на користь безукольних підходів. Концепції з використанням інактивованого антигену грипу (наприклад, хімічно інактивованих цілих частинок вірусу або підданих подальшій обробці компонентів вірусу - розщепленого вірусу або очищених поверхневих антигенів гемаглютиніну (HA) та/або нейрамінідази (NA) для імунізації інтраназальним шляхом, випробувані на тваринах, передбачають або застосування ад'юванта чи імуностимулятора у сполученні з інактивованим антигеном грипу, або багаторазову вакцинацію. Ад'ювант - це будь-яка речовина, яка у суміші з антигенами підсилює їх імуногенність. Що стосується людей, відомості про успішну імунізацію проти грипу інтраназальним шляхом є дуже нечисленні; (а) живі (адаптовані на холодну штамми) вакцини проти грипу (FluMist™ фірми MedImmune Vaccines Inc) (джерела 1, 2, 3), (b) вірус-ліпосомні вакцини проти грипу з ад'ювантом - термолабільна/токсинами E.coli (NasalFlu фірми Berna Biotech Ltd) (джерело 4) або (c) введення великих доз антигену з повторною вакцинацією (джерела 5, 10, 11). Хоча живі вакцини здатні викликати належну імунну реакцію, їх специфічна особливість - наяв-

ність живого вірусу - робить сумнівною їх безпечність і може спричинювати небажані бічні ефекти внаслідок неминучої реплікації вірусів у верхніх дихальних шляхах. Крім того, жорсткі вимоги до умов зберігання обмежують поширення цих продуктів. Безсумнівний зв'язок між інтраназальним введенням вакцини проти грипу з ад'ювантом термолабільним токсином E.coli та паралічем обличчя (периферічним паралічем лицьового нерву) вимушив відмовитися від вірус-ліпосомної вакцини проти грипу з ад'ювантом - термолабільним токсином (джерело 6).

Ефективність вакцин проти грипу у даній популяції можна оцінювати, визначаючи параметри імуногенності на фоні кількості антитіл проти грипу, що виробляються після вакцинації. Ці параметри імуногенності, так звані критерії CHMP, використовуються при щорічному ліцензуванні інактивованих вакцин проти грипу (джерело 7). Станом на сьогодні немає даних про будь-яку успішну імунізацію людей проти грипу з дотриманням цих імунологічних вимог або критеріїв CHMP (джерело 7) при одноразовому інтраназальному введенні інактивованої вакцини без додання ад'юванта, тобто додаткового компоненту вакцини, який не одержаний з інфекційного агента, проти якого вакцина спрямована, а введений до її складу з метою підсилення імунної реакції на антиген. Отже, існує потреба у створенні композиції інактивованої вакцини проти грипу, здатної викликати задовільну системну реакцію після одноразового інтраназального введення, без вмісту ад'юванта та такої, що відповідала б критеріям CHMP (джерело 7) після такого одноразового введення.

Зазначені критерії СНМР визначаються наступним чином. У документі СНМР (Комітету з медичних продуктів для людського вжитку) Вказівки про узгодження вимог до вакцин проти грипу наводяться наступні серологічні параметри для оцінки імуногенності інактивованих вакцин проти грипу:

- рівень серозахисту, який визначається як титр інгібування гемаглютинації (HI)  $\geq 40$ ,
- рівень сероконверсії, де сероконверсія визначається як стан, коли титр HI до вакцинації був  $< 10$ , а після вакцинації становить  $\geq 40$ , або титр HI до вакцинації був  $\geq 10$ , а після неї збільшився принаймні у 4 рази,
- середня кратність зростання, тобто геометричне середнє індивідуальних зростань (титр HI після вакцинації / титр HI до вакцинації).

Вимога СНМР до імуногенності вакцин проти грипу полягає в тому, що з кожних трьох штамів вірусу у вакцині принаймні один відповідав наступним критеріям:

| критерій                     | дорослі  | літні    |
|------------------------------|----------|----------|
| рівень серозахисту:          | $> 70\%$ | $> 60\%$ |
| рівень сероконверсії:        | $> 40\%$ | $> 30\%$ |
| середня кратність зростання: | $> 2.5$  | $> 2.0$  |

Винахід також стосується і дітей, у яких, як показано, імунологічна реакція подібна до дорослих (джерело 8), і літніх людей понад 60 років.

Несподівано, всупереч даним про доклінічні дослідження на тваринах та даним клінічного досвіду щодо людей з літератури, нами було встановлено, що імунна реакція у людей після одноразового інтраназального введення інактивованої вакцини проти грипу, що являє собою реконструйовані оболонки клітин вірусу, відповідає усім трьом критеріям СНМР щодо ефективності вакцини проти грипу для вікової групи 18-60 років. Один прийом вакцини (інтраназальним, інгаляційним, оральним, підшкірним або внутрішньом'язовим шляхом) зазвичай є відомою схемою вакцинації, яка не враховує кількох повторних прийомів з інтервалами у кілька днів або тижнів; фахівці називають ці операції "приміювання" та "бустінг". Композиція для інтраназального або інгаляційного введення являє собою суміш однієї або кількох діючих речовин та наповнювачів, які забезпечують введення інтраназальним або інгаляційним шляхом.

Цей винахід пропонує спосіб спричинення системної імунної реакції (циркулюючих імуноглобулінів або В-клітин, що виробляють антитіла), яка відповідає критеріям СНМР, переважно шляхом одного інтраназального або інгаляційного прийому вірус-ліпосомної вакцини проти грипу. Також пропонується спосіб спричинення локальної або слизової імунної реакції, що полягає у підвищенні рівня секреторних імуноглобулінів, відомих як IgA, на поверхні слизових мембран, переважно шляхом одного інтраназального або інгаляційного прийому вірус-ліпосомної вакцини проти грипу. Спричинення специфічних реакцій IgG та IgA після інтраназального введення пов'язане з активацією лімфоїдної тканини у носовій порожнині (джерело 12). Ця тканина зветься носовою лімфоїдною тканиною

(NALT) і є також відома як слизовий індуктивний сайт для клітинних імунних реакцій (джерело 13).

Оскільки відомо, що віросоми здатні провокувати клітинні імунні реакції (джерела 14, 15), цей винахід також пропонує спосіб індукування специфічних цитотоксичних лімфоцитів (CTL).

Віросоми - це ліпідні бішари, що містять вірусні глікопротеїни. Віросоми звичайно добувають екстракцією мембранних протеїнів та ліпідів з вірусів, які мають оболонку, за допомогою мийного засобу, після чого відновлюють характеристичні бішари видаленням цього засобу. Цей винахід також пропонує відновлені оболонки вірусу грипу (зокрема, відновлені без подальшого додання ліпідів і без додання імуномодулятора або імуностимулятора - так званого ад'юванта) для застосування при вакцинації шляхом введення аерозолем до слизової оболонки носоглотки чи ротоглотки через одну або обидві ніздрі, щоб створити системний та локальний імунітет проти грипу. Можливе також одноразове введення шляхом інгаляції або нанесення на слизову оболонку ротової порожнини.

Відновлені віросоми грипу можна виготовляти з інактивованого вірусу, який можна солюбілізувати недіалізуємим мийним засобом, котрий потім видаляють адсорбцією на гідрофобних гранулах. Препарат може являти собою очищену суспензію одного або кількох антигенів грипу, обраних з-поміж гемаглютинину (HA), нейрамінідази (NA), похідного гемаглютинину та похідного нейрамінідази. Протеїни вірусної мембрани гемаглютинин та нейрамінідазу можна відновити у мембрані, що складається з вірусних ліпідів з малим вмістом ендотоксину та овальбуміну (див. джерело 9). Похідні гемаглютинину та/або нейрамінідази - це молекули гемаглютинину та/або нейрамінідази з модифікованими послідовностями амінокислот та/або структурами. Наприклад, амінокислоти можна виключати з послідовностей, змінювати або додавати до них. Можна також змінювати схеми глікозилювання. Похідні зберігають здатність викликати імунну реакцію при потрапленні до організму реципієнта.

Вірус грипу, з якого виробляють відновлені віросоми, можна вирощувати, наприклад, на курячих яйцях з зародками або у культурі клітин на адгезивних клітинах або клітинах у суспензії. Вірус може бути природним, або гібридним, або генетично модифікованим штамом. Це може, наприклад, бути будь-який штам підтипу А чи В вірусу грипу, в тому числі пандемічний.

Винахід також пропонує вакцини. Під вакциною мається на увазі імуноактивний фармацевтичний препарат. У деяких варіантах вакцини можуть являти собою нешкідливі варіанти або похідні патогенних мікроорганізмів, які, наприклад, стимулюють імунну систему опиратися появі даного патогену. У деяких варіантах вакцина, наприклад, створює адаптивний імунітет при введенні до організму реципієнта. Вакцина може містити вбіту або послаблену форму патогену або компонент патогену, як от антигенний компонент патогену. Препарат вакцини може також містити фармацевтичний носій, пристосований до конкретного шляху введення вакцини, наприклад, інтраназального

або інгаляційного введення. Вакцина проти грипу може містити один або кілька неденатурованих антигенів грипу, здатних викликати специфічну імунну реакцію на грип.

Цей винахід пропонує композицію, яка містить віросоми грипу, що являють собою відновлені оболонки зазначеного вірусу, призначену для інтраназального або інгаляційного введення. Також у зазначеній композиції віросоми містять антигени грипу - гемаглютинин та/або нейрамінідазу або їх похідні. У зазначеній композиції вірусні оболонки цілком походять з частинок вірусу. Також у зазначеній композиції ліпіди із зовнішнього джерела до відновлених віросом не вводяться. Композиція також не містить жодних окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів. Зазначена композиція здатна викликати локальну імунну реакцію при одноразовому інтраназальному або інгаляційному введенні пацієнту. Крім того, зазначена композиція здатна викликати реакцію цитотоксичних лімфоцитів при одноразовому інтраназальному або інгаляційному введенні пацієнту. Здатність зазначеної композиції викликати системну імунну реакцію, та/або локальну імунну реакцію, та/або реакцію цитотоксичних лімфоцитів виявляється по відношенню до людей. При цьому імунна реакція спрямована проти антигенів грипу - гемаглютинину та/або нейрамінідази або їх похідних. У переважному варіанті здійснення імунна реакція на зазначену композицію відповідає критеріям СНМР щодо вакцини проти грипу. Імунна реакція на зазначену композицію забезпечує рівень серозахисту > 70% для дорослих та/або > 60% для літніх, рівень сероконверсії > 40% для дорослих та/або > 30% для літніх та середню кратність зростання > 2.5 для дорослих та/або > 2.0 для літніх з одного, двох або всіх зазначених показників. В особливо переважному варіанті здійснення доза гемаглютинину на один штам вірусу при інтраназальному або інгаляційному введенні зазначеної композиції дорівнює або менша 30 мкг. Нарешті, композиція вакцини за винаходом містить фармацевтичний носій для інтраназального або інгаляційного введення.

Винахід також передбачає застосування віросом грипу, що являють собою реконструйовані оболонки зазначеного вірусу, для виготовлення композиції для інтраназального або інгаляційного введення. При цьому віросоми грипу містять антигени грипу - гемаглютинин та/або нейрамінідазу або їх похідні. Також при цьому застосуванні оболонки вірусів цілком одержують з часток вірусів грипу. Також при цьому застосуванні до віросом грипу не додають жодних сторонніх ліпідів і не вводять до композиції ніяких окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів. Композицію за винаходом складають так, що одноразового інтраназального або інгаляційного введення вистачає, щоб спричинити системну імунну реакцію. Композицію за винаходом складають так, що одноразового інтраназального або інгаляційного введення вистачає, щоб спричинити локальну імунну реакцію. Також композицію за винаходом складають так, що одноразового інтраназального або інгаляційного введення вистачає, щоб спричинити реакцію цитотоксичних лімфоцитів. Об'єктом такого засто-

сування за винаходом є людина. При застосуванні композиція спричинює імунну реакцію, спрямовану проти антигенів грипу - гемаглютинину та/або нейрамінідази або їх похідних. У переважному варіанті здійснення винаходу імунна реакція, спричинена композицією, відповідає критеріям СНМР для вакцини проти грипу, а саме забезпечує рівень серозахисту > 70% для дорослих та/або > 60% для літніх, рівень сероконверсії > 40% для дорослих та/або > 30% для літніх та середню кратність зростання > 2.5 для дорослих та/або > 2.0 для літніх. У найбільш переважному варіанті доза гемаглютинину на штам вірусу при інтраназальному або інгаляційному введенні дорівнює або менша за 30 мкг. Нарешті, при застосуванні згідно з винаходом вироблена композиція являє собою вакцину.

Отже, в одному з варіантів здійснення винаходу композиція з віросом грипу складається з реконструйованих оболонок зазначеного вірусу, причому оболонки вірусів цілком одержані з часток вірусів грипу, а до віросом грипу не додано жодних сторонніх ліпідів, віросоми грипу містять антигени грипу - гемаглютинин та/або нейрамінідазу або їх похідні, а до композиції не введено ніяких окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів. Композиція призначена для інтраназального або інгаляційного введення й відрізняється тим, що одноразового інтраназального або інгаляційного введення людині вистачає, щоб спричинити системну та/або локальну імунну реакцію проти зазначених антигенів грипу таким чином, що системна реакція відповідає критеріям СНМР для вакцини проти грипу, а доза гемаглютинину на штам вірусу при інтраназальному або інгаляційному введенні менша або дорівнює 30 мкг.

Згідно з іншим варіантом здійснення винаходу віросоми грипу, що являють собою реконструйовані оболонки зазначеного вірусу, застосовують для виготовлення композиції для інтраназального або інгаляційного введення, причому оболонки вірусів цілком одержані з часток вірусів грипу, до віросом грипу не додано жодних сторонніх ліпідів, віросоми грипу містять антигени грипу - гемаглютинин та/або нейрамінідазу або їх похідні, а до композиції не введено ніяких окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів. Застосування зазначених віросом грипу для виготовлення композиції для інтраназального або інгаляційного введення відрізняється тим, що одноразового інтраназального або інгаляційного введення людині вистачає, щоб спричинити системну та/або локальну імунну реакцію проти зазначених антигенів грипу таким чином, що системна реакція відповідає критеріям СНМР для вакцини проти грипу, а доза гемаглютинину на штам вірусу при інтраназальному або інгаляційному введенні менша або дорівнює 30 мкг. Згідно із ще одним здійснення винаходу запропонована вакцина, яка являє собою композицію віросом грипу, що являють собою реконструйовані оболонки зазначеного вірусу, причому оболонки вірусів цілком одержані з часток вірусів грипу, до реконструйованих віросом не додано жодних сторонніх ліпідів, віросоми грипу містять антигени грипу - гемаглютинин та/або нейрамінідазу або їх похідні, а до композиції не введено

ніяких окремих ад'ювантів та/або імуностимуляторів. Вакцина призначена для одноразового інтраназального або інгаляційного введення людині, причому доза гемаглютинину на штам вірусу при інтраназальному або інгаляційному введенні менша або дорівнює 30 мкг. Переважно зазначеного одноразового інтраназального або інгаляційного введення вистачає, щоб спричинити системну та/або локальну імунну реакцію у зазначеної людини. Цей винахід також передбачає засіб, який містить певну кількість зазначеної вакцини для одноразового інтраназального або інгаляційного введення. Доза гемаглютинину на штам вірусу при інтраназальному або інгаляційному введенні згідно з винаходом менша або дорівнює 25 мкг, 20 мкг, 15 мкг, 10 мкг або 5 мкг.

Список літератури:

1. Maassab HF. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25°C, *Nature* 213, 612-14 (1967)

2. Maassab HF, Bryant ML. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. *Rev. Med. Virol.* 1999 Oct-Dec;9(4): 237-44.

3. Keitel W, Piedra PA. Live cold-adapted, reassortant in influenza vaccines (USA). In: *Textbook of Influenza*. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (Ed), Blackwell Science Oxford, UK, 373-390 (1998).

4. Gluck U, Gebbers JO, Gluck R, Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli heat-labile toxin in adult volunteers. *J Virol.* 1999 Sep;73(9): 7780-6.

5. Sarndal HH, Bakke H, Oftung F, Holst J, Haugen IL, Korsvold GE, Kristoffersen AC, Krogh G, Nord K, Rappuoli R, Berstad AKH, Haneberg B. Anon-Living Nasal Influenza Vaccine Can Induce Major Humoral and Cellular Immune Responses in Humans without the Need for Adjuvants. *Human Vaccines* 1:2, 85-90; March/April 2005.

6. Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Spyr C, Steffen R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 2004 Feb 26;350(9): 896-903.

7. Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines. EMEA/CpMP/BWP/214/96.

8. Daubeney, P., Taylor, C.J., McGaw, J., Brown, E.M., Ghosal, S., Keeton, B.R., Palache, B., Kerstens, R. Immunogenicity and tolerability of a trivalent influenza subunit vaccine (influvac<sup>R</sup>) in high-risk children aged 6 months to 4 years. *BJCP* 1997 March, 51(2): 87-90.

9. Stegmann, T., Morselt, H.W.M., Booy, F.P., Van Breemen, J.F.L., Scherphof, G., Wilschut, J. Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *EMBO Journal* 1987, 6(9): 2651-2659.

10. Treanor J, Nolan C, O'Brien D, Burt D, Lowell G, Linden J, Fries L. Intranasal administration of a proteosome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza

antibodies in healthy human subjects. *Vaccine* 2006;24(3): 254-62.

11. Read R.C., Naylor S.C., Potter C.W., Bond J., Jabbal-Gili I., Fisher A., Illum L., Jennings R. Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine* 2005;23(35):4367-74

12. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestein AM, van Breda Vriesman PJ, Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 1992 13: 219-24.

13. Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J. Immunol.* 2002 168:1796-803

14. Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM, Wilschut J. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* 2005 23 (Suppl 1):S26-38.

15. Glück R, Burri KG, Metcalfe I. Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes. *Curr. Drug Deliv.* 2005 2:395-400

#### ПРИКЛАД 1

ВІРУС-ЛІПОСОМНА ВАКЦИНА У 8-ТИЖНЕВИХ МИШЕЙ BALB/C; ПОРІВНЯННЯ ПРИ ІНТРАНАЗАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ РІЗНИХ СПІВВІДНОШЕНЬ НА/LPP RATIOS ПРИ СУБОПТИМАЛЬНИХ ДОЗАХ НА

Групи по 10 серонегативних до грипу самок мишей Balb/c місе одержують інтраназально випуск ліпосомну вакцину при співвідношеннях НА/LPP (ліпопептид) 1:1.5, 1:0.7, 1:0.4, 1:0 (тобто без ліпопептиду) при вмісті 2 мкг НА на дозу. Контрольна група з 10 самок мишей одержують 0 мкг НА/дозу (порожній носій інтраназально).

Готують чотири препарати віросом з вмістом LPP. Інактивованій вірус грипу у 30-40 % розчині сахарози осаджують на центрифугі. Вірус знову суспендують та солюбілізують у буфері, що містить мийний засіб октаєтиленглікольмонододецил-етер (OEG). Після того нуклеокапсид вірусу видаляють на ультрацентрифугі. Супернант з вмістом OEG розділяють на 4 рівних обсяги та додають різні кількості ліпопептиду P3CSK4 у буфері з вмістом OEG (P3CSK4: Н-пальмітоїл-8-[2,3-біс(пальмітоїлокси)-(2RS)-пропил]-[R]-цистеїнил-[S]-серил-[S]-лізил-[S]-лізил-[S]-лізил-[S]-лізин).

Обсяг коригують буфером з вмістом OEG. OEG видаляють абсорбцією на гідрофобній смолі. Це призводить до утворення віросом з вмістом LPP, реконструйовані вірусні пухирці містять у мембранах НА та NA, а за бажанням також LPP. Після видалення OEG віросоми фільтрують крізь мембрану з полівініліденофторзду з розміром пор 0.22 мкм.

Вихідним матеріалом слугує 20 мг НА з штаму грипу A/Wyoming/3/2003 X-147 (типу A/Fujian/411/200 (H3N2)) з вмістом 252 вакцинувальних доз ендотоксину/100 мкг НА. Після солюбілізації готують 4 партії, як показано у табл. 1.

Таблиця 1

## Приготування віросом

| Партія      | Кількість НА як вихідного матеріалу (мг) | Кількість доданого РЗСКС4 (мг) | Співвідношення НА/LPP |
|-------------|--|--------------------------------|-----------------------|
| VIR-2004-11 | 5  | 7.5                            | 1:1.5                 |
| VIR-2004-12 | 5  | 3.5                            | 1:0.7                 |
| VIR-2004-13 | 5  | 2.0                            | 1:0.4                 |
| VIR-2004-14 | 5  | 0                              | 1:0                   |

Носій складається з 5 мМ Hepes, 145 мМ NaCl, 1 мМ EDTA (pH 7.4). Для групи Е (див. табл. 2) носій фільтрують крізь мембрану з полівініліденториду з розміром пор 0.22 мкм. Одержані 4 партії віросом розбавляють до концентрації 200 мкг/мл для інтраназальної та 67 мкг/мл для внутрішньо-

м'язової імунізації та розливають по 1-мл флаконах (по 2 на групу), як показано у табл. 2. Ці групи вакцин використовують так, як наведено у табл. 4.

Таблиця 2

## Приготування вакцин

| Група | Препарат    |
|-------|-------------|
| A     | VIR-2004-11 |
| B     | ViR-2004-12 |
| C     | VIR-2004-13 |
| D     | VIR-2004-14 |
| E     | Носій*      |

\*Носій: 5 мМ Hepes, 145 мМ NaCl, 1 мМ EDTA (pH 7.4), фільтрований крізь мембрану з полівініліденториду з розміром пор 0.22 мкм.

## Аналіз композиції

Композиції, одержані у цьому дослідженні, аналізують по кількох параметрах, як показано у табл. 3.

Таблиця 3

## Дані аналізу віросом, що використовуються для одержання вакцин

| Компонент                                   | VIR-2004-11  | VIR-2004-12  | VIR-2004-13  | VIR-2004-14  |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Протеїн (мг/мл) <sup>a</sup>                | 1.7          | 1.6          | 1.5          | 1.4          |
| НА (мкг/мл) <sup>b</sup>                    | 776          | 759          | 697          | 757          |
| Фосфоліпід (ммоп/л) <sup>c</sup>            | 0.658        | 0.692        | 0.658        | 0.682        |
| Ендотоксин (од. на 100 мкг НА) <sup>d</sup> | 3.1          | 1.5          | 1.9          | 1.0          |
| Овальбумін (мкг на 100 мкг НА) <sup>e</sup> | 0.047        | 0.050        | 0.055        | 0.050        |
| Чистота <sup>f</sup>                        | Переважає НА | Переважає НА | Переважає НА | Переважає НА |

<sup>a</sup>Проба Лоурі, принцип: Протеїни набувають синього забарвлення після обробки лужним сульфатом міді та фенольним реактивом Фоленсіокальто. Вміст протеїну визначають за спектральним вбиранням на 750 нм з еталонним стандартним альбуміном BSA.

Lowry, OH, NJ Rosebrough, AL Fair, and RJ Randall. J. Biol. Chem. 193: 265. 1951.

Oostra, GM, NS Mathewson, and GN Catravas. Anal. Biochem. 89: 31. 1978.

Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. Methods in Enzymology 182:50-69 (1990).

Hartree, EF. Anal. Biochem. 48: 422-427 (1972).

<sup>b</sup>Європейська фармакопея: монографія 2053 та розділ 2.7.1

<sup>c</sup>Принцип: Кожний фосфоліпід містить один атом фосфору, який може слугувати для кількісного визначення фосфоліпідів. Фосфоліпід руйнується хлорною кислотою, одержаний фосфат утворює комплекс із молібдатом, який відновлюється аскорбиновою кислотою з утворенням продукту синього забарвлення. Колір визначають спектрофотометром на хвилі 812 нм. Кількість фосфоліпиду у зразку визначають за допомогою фосфатного калібратора.

Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Meth. Enzymol. 1966; 8:115-118.

Bottcher CJF, van Gent CM & Pries C A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. Anal. Chim. Acta 1961; 24:203-204

<sup>d</sup>Європейська фармакопея: 2.6.14.

<sup>e</sup>Імуноферментний аналіз овальбуміну - це прямий імуноферментний сендвіч-аналіз, де іміобілізовані поліклональні антиовальбумінові антитіла використовують для захоплення, а антиовальбумін-HRP кон'югати слугують детекторною системою. Кон'югат інкубують одночасно із зразками.

Незв'язані компоненти видаляють промивкою. До дучок додають субстрат (TMB та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Проявлення специфічно зв'язаного кон'югату в дучках свідчить про наявність синього забарвлення. Доданням сірчаної кислоти до субстрату реакцію зупиняють, і продукт змінює колір на жовтий. Спектральне вбирання (оптичну щільність) зчитують на хвилі 450 нм. Для одержання оптимальних результатів використовують еталонний фільтр на 620 нм. Будують стандартну криву з реакції еталонних зразків овальбуміну (0.3-20.0 нг/мл), включених до аналізу. Концентрації невідомих зразків можна інтерполювати із стандартної кривої.

<sup>f</sup>Згідно з монографіями 0869 та 2053: чистоту одновалентного зведеного збору визначають електрофорезом поліамідного гелю Електрофорез згідно з Європейською фармакопеєю 2.2.31.

Тест-система

Досліджувані тварини

Використовують сім груп по десять самок мишей Balb/c (BALB/cAnNCrl). На початку експериментів миші у віці 8-9 тижнів важать по 17-19 г.

Тварин вакцинують інтраназально у день 0 та у день 14 одновалентною вірус-ліпидною вакциною проти грипу (A/Wyoming) та проводять некропсію на 21 день після другої вакцинації.

Дослідні речовини інокулюють інтраназально (10 мкл в обидві ніздрі) під легкою анестезією ізофуран/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O у дорсальному положенні.

Таблиця 4

Схема вакцинавання

| Група | Шлях введення | Склад вакцини                         | Кількість самок | № тварин |
|-------|---------------|---------------------------------------|-----------------|----------|
| A     | Інтраназально | 2 мкг НА, співвідношення НА/LPP 1:1.5 | 10              | 01-10    |
| B     | інтраназально | 2 мкг НА, співвідношення НА/LPP 1:0.7 | 10              | 11-20    |
| C     | Інтраназально | 2 мкг НА, співвідношення НА/LPP 1:0.4 | 10              | 21-30    |
| D     | інтраназально | 2 мкг НА, співвідношення НА/LPP 1:0   | 10              | 31-40    |
| E     | Інтраназально | 2 мкг НА, співвідношення НА/LPP 0:0   | 10              | 41-50    |

Перед першою вакцинацією та за 14 днів після неї відбирають орбітальні проби крові під анестезією ізофуран/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O. На 35-й день тварин забивають та беруть зразки крові (обезкровлення під анестезією O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> через черевну аорту або проколом серця). Сироватку з усіх зразків збирають, глибоко заморожують та зберігають у поліпропіленових пробірках при температурах <-10°C до аналізу.

Вірус грипу склеюється з червоними кров'яними тільцями (RBC), що блокуються у присутності достатньої кількості специфічного антитіла до вірусу. Це явище лежить в основі реакції інгібування гемаглютинації (HI), яка використовується для якісного та кількісного визначення специфічних антитіл до вірусу у сироватці. Сироватку додають до вірусу грипу та індичах RBC. Виконують кілька розбавлень (титрація). Титр HI визначають як зворотну величину до найбільшого розбавлення, при якому гемаглютинація ще інгібується. Середньге-

ометричні титри (GMT) розраховують наступним чином:

1) розраховують індивідуальний логарифмічний титр (титри) як середньоарифметичне двох дублів:

$$[\log(\text{titer}_1) + [\log(\text{titer}_2)]/2$$

2) розраховують середньоарифметичне індивідуального логарифмічного титру (титрів)

3) GMT<sub>(групи)</sub> = 10 EXP (середньоарифметичне індивідуального логарифмічного титру (титрів) для групи)

Статистика

Титри HI сумують по групам тварин та дням за допомогою середньгеометричних титрів. Після логарифмічного перетворення титри HI 35 дня по групам аналізують методом лінійної регресії, щоб дослідити залежність доза-реакція між вмістом LPP у вакцині та GMT.

Результати Аналіз титру HI

GMT наведені у табл. 5.

Таблиця 5

Середньгеометричні титри

| Група | Шлях введення | Співвідношення НА/LPP | День 0 | 14 день | 35 день |
|-------|---------------|-----------------------|--------|---------|---------|
| A     | Інтраназально | 1:1.5                 | 5      | 8       | 415     |
| B     | Інтраназально | 1:0.7                 | 5      | 6       | 161     |
| C     | Інтраназально | 1:0.4                 | 5      | 7       | 97      |
| D     | Інтраназально | 1:0                   | 5      | 7       | 12      |
| E     | Інтраназально | 0:0                   | 5      | 5       | 5       |

У день 0 у мишей не виявляється жодних специфічних до НА антитіл (тобто всі титри HI < 10). На 14 день не виявляється специфічних до НА антитіл у більшості мишей, вакцинованих інтраназально (і.п.). Усі титри HI ≤ 10, за винятком однієї миші з групи A (титр HI: 80), однієї миші з групи C (титр HI: 35) та однієї миші з групи D (титр HI: 160).

На 35 день спостерігається реакція вироблення специфічних до НА антитіл у залежності від дози, тобто чим більше вміст LPP у вакцині, там вище титр антитіл.

Логарифмічно трансформовані титри HI на 35 день порівнюють між групами методом лінійної регресії. Підігнаний нахил регресії дуже значущий (P < 0.0001). Отже, спостерігається статистично значуща залежність між вмістом LPP у вакцині та GMT.

Висновки:

Повторна інтраназальна вакцинація мишей реконструйованими вірусами грипу без ад'ювантів не спричинює помітної системної імунної реакції. Повторна інтраназальна вакцинація реконст-

руйованими вірусом грипу з ад'ювантом LPP при такій само дозоровці НА (2 мкг НА/дозу) призводить до системної імунної реакції, яка тим сильніше, чим більше вміст LPP. На відміну від цього винаходу (див. далі приклад 2), ці дані раніше тлумачили на підтримку загально прийнятої думки, що використання імуностимулянта (у даному випадку LPP) необхідне при інтраназальній вакцинації інактивованою вакциною проти грипу, навіть при наявності антигену грипу (НА) у реконструйованій віросомі.

#### ПРИКЛАД 2

ПОДВІЙНЕ СЛІПЕ, РАНДОМІЗОВАНЕ, ДОСЛІДЖЕННЯ НА ПАРАЛЕЛЬНИХ ГРУПАХ БЕЗПЕЧНОСТІ ЛІПОПЕПТИДНОГО АД'ЮВАНТА ТА ЙОГО ДІЇ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ВІРУСОМНОЇ СУБОДИНИЧНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ГРИПУ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ЧЕРЕЗ НІС ЗДОРОВИМ ДОРΟΣЛИМ У ВІЦІ ВІД 18 ДО 40 РОКІВ

Здорових добровольців інтраназально вакцинують реконструйованими вірусом грипу з ад'ювантними LPP (ліпопептидами) у дозі 0.2 мл (0.1 мл на ніздрю) з вмістом 150 мкг НА/мл на штам та 315 мкг LPP/мл. Аналогічну групу піддають інтраназальній вакцинації реконструйованими вірусом грипу без LPP у дозі 0.2 мл (0.1 мл на ніздрю) з вмістом 150 мкг НА/мл на штам. Метою дослідження було підтвердження на людях з'ясованого на мишах факту, що для одержання належної системної імунної реакції після інтраназальної вакцинації реконструйованими вірусом грипу необхідно застосування ад'юванта (наприклад, LPP).

#### Планування експерименту:

Це було подвійне сліпе, рандомізоване дослідження на паралельних групах здорових пацієнтів у віці  $\geq 18$  та  $< 40$  років. Дослідження проводять у дослідницькому центрі Swiss Pharma Contract Ltd., Базель, Швейцарія, під керівництвом д-ра М. Зайберлінга. Дослідження складається з двох частин. У першій частині оцінюють безпечність вакцини з субодиничних вірусом грипу з ад'ювантом LPP на 12 піддослідних. Дев'ятерох вакцинують LPP-RVM (реконструйовані з LPP вірусні мембрани; вакцина проти грипу з поверхневим антигеном, інактивована, віросомна, з ад'ювантом LPP), а трьох вакцинують RVM (вакцина проти грипу з поверхневим антигеном, інактивована, віросомна). У другій частині дослідження оцінюють ефективність та безпечність LPP-RVM на ста піддослідних (по 50 у групі).

Досліджують здорових пацієнтів. Крім того, піддослідні, які беруть участь у другій частині дослідження, не одержували вакцин проти грипу протягом трьох років до початку експерименту. Це підсилює однорідність досліджуваної популяції у частині II, бо мінімізує кількість піддослідних, в організмі яких раніше існували антитіла проти грипу.

#### Частина I:

За 14 днів до вакцинації (відвідування 1), після того, як піддослідний давав згоду на участь в експерименті, його перевіряють на відповідність критеріям дослідження та піддають медичному огляду. Беруть зразки носових епітеліальних клітин та висівають їх для цитологічного дослідження та

вимірювання активності війок у сахариновому тесті.

Під час відвідування 2 (день 1) беруть пробу 4-6 мл крові для стандартного гематологічного аналізу та 6-10 мл для стандартного біохімічного аналізу, а також оцінюють основні життєві показники організму. Після рандомізації піддослідного вакцинують однією з двох вакцин та залишають на добу в клініці, щоб спостерігати миттєві локальні та системні реакції та небажані події. Через 4 та 24 години після вакцинації знімають показники життєдіяльності. Крім того, через 24 години беруть пробу 4-6 мл крові для стандартного гематологічного аналізу та 6-10 мл для стандартного біохімічного аналізу, а також беруть зразки носових епітеліальних клітин та висівають їх для цитологічного дослідження та вимірювання активності війок у сахариновому тесті. Піддослідним видають анкету (анкета I) у якій вони вдома записують локальні та системні реакції наступного дня (день 3).

За два дні піддослідні мають повернутися до клініки - відвідування 3 (день 4). При цьому оцінюють локальні та системні реакції та будь-які небажані події, що мали місце після попереднього відвідування. Також беруть пробу 4-6 мл крові для стандартного гематологічного аналізу та 6-10 мл для стандартного біохімічного аналізу й оцінюють основні життєві показники організму.

За два тижні після першої вакцинації піддослідні повертаються до клініки (відвідування 4). В них беруть зразки носових епітеліальних клітин для цитологічного дослідження, вимірювання активності війок у сахариновому тесті та оцінюють небажані події, що мали місце між відвідуваннями 3 та 4.

#### Частина II:

За 14 днів до першого взяття проб крові та носового слизу (відвідування 1), після того, як піддослідний давав згоду на участь в експерименті, його перевіряють на відповідність критеріям дослідження та піддають медичному огляду.

Під час відвідування 2 (день 1; відвідування 1 та 2 можуть бути суміщені) беруть пробу 6-10 мл крові для визначення титру інгібування гемаглютинину (HI) та пробу 4 -6 мл крові для стандартного гематологічного аналізу і 6-10 мл для стандартного біохімічного аналізу. Пробу носового слизу аналізують на титр антитіл IgA у носі.

Наступного дня під час відвідування 3 (день 1) після оцінки основних життєвих показників організму і рандомізації піддослідних вакцинують однією дозою одного або другого складу назальної вакцини проти грипу. Миттєві локальні та системні реакції та небажані події спостерігають на місці протягом години після вакцинації. Далі знов оцінюють основні життєві показники організму, а піддослідним видають анкету, у якій вони вдома записують локальні та системні реакції протягом 7 днів після вакцинації.

За два тижні (відвідування 4; день 15) беруть пробу 6-10 мл крові для визначення титру HI, пробу 4-6 мл крові для стандартного гематологічного аналізу та 6-10 мл для стандартного біохімічного аналізу й пробу носового слизу на титр антитіл IgA у носі.



### Оцінка ефективності

Для оцінки ефективності беруть проби крові та носового слизу у день 1 (вихідне значення) та у день 15.

#### Проби крові

Відбирають 6-10 мл крові для визначення титрів інгібування гемаглютинину (HI).<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Palmer DF, Dowdle WR, Coleman MT, Schild GC. Hemagglutination Inhibition Test. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. U.S. Dept. Hlth. Ed. Welfare, P.H.S. Atlanta; 1975: 25-62.

Після взяття та коагуляції крові (принаймні 30 хв. при кімнатній температурі) відокремлюють сироватку й заморожують її (-20°C) до титрування. Титром проби є середньгеометричне значення двох вимірювань. Сироватки, взяті до та після вакцинації, титрують однаково.

#### Проби носового слизу

Для збору носового слизу вводять 6 мл підігрітого (37°C) фізіологічного розчину де однієї ніздрі, слідкуючи через риноскоп. Піддослідний нахилиє голову під кутом 60° так, щоб промивна рідина затекла до ніздрі. Зібрану пробу вводять до другої ніздрі, яку промивають таким само чином. До проб додають розчин консерванту (1/100 обсягу проби). Розчин містить 10 мг/мл альбуміну бичачої сироватки у 100 мМ буферу Tris-HCl з рН 8. Проби освітлюють повільним центрифугуванням (10 хв. при 800g), поділяють на частини (щоб уникнути частого відтаювання у подальших аналізах) та витримують на сухій кризі, перш ніж помістити до середовища з температурою - 80°C.

Рівні IgA у носовому слизі визначають твердофазним імуноферментним аналізом та статистично обробляють за тестом Вілкоксона. Вакцина проти грипу слугує антигеном оболонки у 96-дучкових планшетах. Неспецифічні сайти зв'язування блокують інкубацією з блокувальним буфером. Розбавлений вдвічі у блокувальному буфері носовий слиз (12 розбавлень на пробу) поглинає специфічні до грипу антитіла до антигенів у 96-дучкових планшетах. Планшети перед інкубацією

промивають кон'югованими з ферментом антилюдськими антитілами (пероксидазою хрину або кон'югованою лужною фосфатазою). Незв'язані антилюдські антитіла видаляють промивкою, а кількість специфічних до штаму грипу антитіл визначають вимірюванням оптичної щільності після додання субстрату до ферментативної реакції.

#### Склад вакцини

У дослідженні використовують два різних складки вакцини. Обидва містять вірусні антигени, рекомендовані CO3 для Південної півкулі на 2005 рік<sup>2</sup> у дозуванні 30 мкг на штамп при дозі 0,2 мл

- штамп типу A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
- штамп типу A/Wellington/1/2004 (H3N2)
- штамп типу B/Shanghai/361/2002

<sup>2</sup>WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2005 influenza season. Weekly Epidem Rec. 2004;79:369-376.

Інактивованний вірус грипу у 30-40 % розчині сахарози осаджують центрифугуванням. Вірус знову суспендують та солюбілізують у буфері, що містить мийний засіб монододецилтер октаетиленгліколю (OEG). Після того вірусний нуклеокапсид видаляють центрифугуванням. Супернатант з вмістом OEG коригують ліпопептидом P3CSK4 в OEG-вмістному буфері або в OEG-вмістному буфері лише у випадку реконструйованих вірусних мембран без вмісту LPP (P3CSK4: N-пальмітоїл-5-[2,3-біс(пальмітоїлокси)-(2RS)-пропил]-[R]-цистеїніл-[S]-серил-[S]-лізил-[S]-лізил-[S]-лізил-[S]-лізин). OEG видаляють абсорбцією на гідрофобній смолі. Одержують реконструйовані вірусні мембрани з вмістом LPP або без нього (реконструйовані вірусні везикули з HA та NA у мембранах, а за бажанням також LPP у мембранах). Після видалення OEG віросоми фільтрують крізь мембрану з полівініліденфториду з розміром пор 0.22 мкм.

Для кожного штаму вірусу готують окремий препарат з LPP або без (табл. 6). Кількість доданого LPP відповідає масовому співвідношенню HA/LPP 1:0.7.

Таблиця 6

### Приготування віросом

| Партія      | LPP   | Штам вірусу   |
|-------------|-------|---|
| VIR-2005-09 | Є     | Influenza B/Jiangsu/10/2003                           |
| VIR-2005-11 | Є     | Influenza A/New Caledonia/20/1999 IVR-116 reassortant |
| VIR-2005-13 | Є     | Influenza A/Wellington/1/2004 IVR-139 reassortant     |
| VIR-2005-10 | Немає | Influenza B/Jiangsu/10/2003                           |
| VIR-2005-12 | Немає | Influenza A/New Caledonia/20/1999 IVR-116 reassortant |
| VIR-2005-14 | Немає | Influenza A/Wellington/1/2004 IVR-139 reassortant     |

Таблиця 7

## Аналіз складу

| Компонент                                   | VIR-2005-09  | VIR-2005-10  | V1R-2005-11  | VIR-2005-12  | VIR-2005-13  | V1R-2005-14  |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Протеїн (мг/мл) <sup>a</sup>                | 1.51         | 1.54         | 1.86         | 1.83         | 1.37         | 1.18         |
| НА (мкг/мл) <sup>b</sup>                    | 805          | 854          | 711          | 784          | 704          | 644          |
| Фосфоліпід (ммолів/л) <sup>c</sup>          | 0.494        | 0.563        | 0.820        | 1.03         | 0.717        | 0.695        |
| Ендотоксин (од. на 100 мкг НА) <sup>d</sup> | <0.4         | <0.4         | <0.4         | <0.4         | <0.4         | <0.5         |
| Овальбумін (мкг на 100 мкг НА) <sup>e</sup> | 0.068        | 0.088        | 0.037        | 0.036        | 0.132        | 0.126        |
| Чистота <sup>f</sup>                        | Переважно НА | Переважно НА | Переважно НА | Переважно НА | Переважно НА | Переважно НА |

<sup>a</sup>Проба Лоурі, принцип: Протеїни набувають синього забарвлення після обробки лужним сульфатом міді та фенольним реактивом Фоленсіокальто. Вміст протеїну визначають за спектральним вбиранням на 750 нм з еталонним стандартним альбуміном BSA.

Lowry, OH, NJ Rosebrough, AL Fair, and RJ Randall. J. Biol. Chem. 193: 265. 1951.

Oostra, GM, NS Mathewson, and GN Catravas. Anal. Biochem. 89: 31. 1978.

Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. Methods in Enzymology 182: 50-69 (1990).

Hartree, EF. Anal. Biochem 48: 422-427 (1972).

<sup>b</sup>Європейська фармакопея: монографія 2053 та розділ 2.7.1

<sup>c</sup>Принцип: Кожний фосфоліпід містить один атом фосфору, який може слугувати для кількісного визначення фосфоліпідів. Фосфоліпіди руйнуються хлорною кислотою, одержаний фосфат утворює комплекс із молібдатом, який відновлюється аскорбіною кислотою з утворенням продукту синього забарвлення. Колір визначають спектрофотометром на хвилі 812 нм. Кількість фосфоліпиду у зразку визначають за допомогою фосфатного калібратора.

Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Meth. Enzymol. 1966; 8: 115-118.

Softener CJF, van Gent CM & Pries C A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. Anal. Chim. Acta 1961; 24: 203-204.

<sup>d</sup>Європейська фармакопея: 2.6.14.

<sup>e</sup>Імуноферментний аналіз овальбуміну - це прямий імуноферментний сендвіч-аналіз, де імібілізовані поліклональні антиовальбумінові антитіла використовують для захоплення, а антиовальбумін-HRP кон'югати слугують детекторною системою. Кон'югат інкубують одночасно із зразками. Незв'язані компоненти видаляють промивкою. До дучок додають субстрат (TMB та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Про наявність специфічно зв'язаного кон'югату в дучках свідчить поява синього забарвлення. Доданням сірчаної кислоти до субстрату реакцію зупиняють, і продукт змінює колір на жовтий. Спектральне вбирання (оптичну щільність) зчитують на хвилі 450 нм. Для одержання оптимальних результатів використовують еталонний фільтр на 620 нм. Буду-

ють стандартну криву з реакції еталонних зразків овальбуміну (0.3-20.0 нг/мл), включених до аналізу. Концентрації невідомих зразків можна інтерполювати із стандартної кривої.

<sup>f</sup>Згідно з монографіями 0869 та 2053: чистоту одновалентного зведеного збору визначають електрофорезом поліамідного гелю. Електрофорез згідно з Європейською фармакопеєю 2.2.31.

## Ефективність

Титри антитіл до НІ на штам вірусу на 15 день після логарифмічного перетворення та титри антитіл IgA у носовій порожнині на 15 день у двох груп вакцинованих порівнюють за критерієм суми рангів за Вілкоксоном при рівні двосторонньої значності 0.05.

Титри антитіл НІ на 15 день аналізують розрахунками наступних трьох параметрів на штам вірусу і на групу вакцинованих:

- рівень серозахисту, який визначається як титр НІ<sub>≥40</sub>,

- рівень сероконверсії, де сероконверсія визначається як стан, коли титр НІ до вакцинації був <10, а після вакцинації становить ≥40, або титр НІ до вакцинації був ≥10, а після неї збільшився принаймні у 4 рази,

- середня кратність зростання, тобто геометричне середнє зростає титру НІ.

Дані з ефективності аналізують як суворо за протоколом, так і виходячи з намірів обробки. Втім, оскільки це так зване контрольно-перевірне дослідження, головним вважається аналіз за протоколом. Для наміру обробки придатні дані з ефективності деяких піддослідних після вакцинації. Вибірку за протоколом становлять ті піддослідні, які завершили протокол без серйозних порушень. До серйозних порушень належать, між іншим: невідповідність критеріям відбору та застосування заборонених ліків. Більш того, піддослідні, у яких лабораторно підтверджена інτερкурентна грипозна інфекція, а також ті, на кого відсутні вихідні дані щодо ефективності, також потрапили до вибірки за протоколом. Щодо кожного такого піддослідного рішення про включення або невключення до вибірки за протоколом приймалося до дерандомізації даних дослідження.

## Результати

Таблиця 8

Оцінка за критеріями СНМР гуморальної імунної реакції після інтраназальної вакцинації віросомною вакциною

| Рівень серозахисту        |               |            |               |            |            |            |
|---------------------------|---------------|------------|---------------|------------|------------|------------|
| Статистика                | Типу А (H3N2) |            | Типу А (H1N1) |            | Типу В     |            |
|                           | LPP-RVM       | RVM        | LPP-RVM       | RVM        | LPP-RVM    | RVM        |
|                           | (N=48)        | (N=43)     | (N=48)        | (N=43)     | (N=48)     | (N=43)     |
| Після вакцинації (день15) |               |            |               |            |            |            |
| Серозахист                |               |            |               |            |            |            |
| Так n(%)                  | 48 (100%)     | 42 (97.7%) | 41 (85.4%)    | 38 (88.4%) | 35 (72.9%) | 35 (81.4%) |
| Ні n(%)                   | 0             | 1 (2.3%)   | 7 (14.6%)     | 5 (11.6%)  | 13 (27.1%) | 8 (18.6%)  |
| Разом n                   | 48            | 43         | 48            | 43         | 48         | 43         |

RVM: віросомна вакцина проти грипу

LPP-RVM: віросомна вакцина проти грипу з ад'ювантом ліпопептидом

Таблиця 8 (продовження)

Оцінка за критеріями СНМР гуморальної імунної реакції після інтраназальної вакцинації віросомною вакциною проти грипу (RVM)

| Рівні сероконверсії       |                   |               |                   |               |                   |               |
|---------------------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| Статистика                | Типу А (H3N2)     |               | Типу А (H1N1)     |               | Типу В            |               |
|                           | LPP-RVM<br>(N=48) | RVM<br>(N=43) | LPP-RVM<br>(N=48) | RVM<br>(N=43) | LPP-RVM<br>(N=48) | RVM<br>(N=43) |
| Після вакцинації (день15) |                   |               |                   |               |                   |               |
| Сероконверсія             |                   |               |                   |               |                   |               |
| Так n(%)                  | 37 (77.1%)        | 25 (58.1%)    | 25 (52.1%)        | 33 (76.7%)    | 24 (50.0%)        | 22(51.2%)     |
| Ні n(%)                   | 11 (22.9%)        | 18 (41.9%)    | 23 (47.9%)        | 10 (23.3%)    | 24 (50.0%)        | 21 (48.8%)    |
| Разом n                   | 48                | 43            | 48                | 43            | 48                | 43            |

RVM: віросомна вакцина проти грипу

LPP-RVM: віросомна вакцина проти грипу з ад'ювантом ліпопептидом

Таблиця 8 (продовження)

Оцінка за критеріями СНМР гуморальної імунної реакції після інтраназальної вакцинації віросомною вакциною проти грипу (RVM)

| Середня кратність зростання титру антитіл HI |                   |               |                   |               |                   |               |
|--|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|
| Статистика                                   | Типу А (H3N2)     |               | Типу А (H1N1)     |               | Типу В            |               |
|  | LPP-RVM<br>(N=48) | RVM<br>(N=43) | LPP-RVM<br>(N=48) | RVM<br>(N=43) | LPP-RVM<br>(N=48) | RVM<br>(N=43) |
| Після вакцинації (день15)                    |                   |               |                   |               |                   |               |
| Сероконверсія                                |                   |               |                   |               |                   |               |
| n  | 48                | 43            | 48                | 43            | 48                | 43            |
| Середнє*                                     | 12.14             | 8.52          | 4.78              | 10.07         | 3.64              | 4.51          |

Примітка: \*середньогометричне

RVM - віросомна вакцина проти грипу

LPP-RVM: віросомна вакцина проти грипу з ад'ювантом ліпопептидом

Таблиця 9

Титри IgA у носовому слизу (GMT)

|         | H3N2         |          | H1N1         |          | B            |          |
|---------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
|         | LPP-RVM N=48 | RVM N=43 | LPP-RVM N=48 | RVM N=43 | LPP-RVM N=48 | RVM N=43 |
| День 1  | 93.88        | 95.45    | 80.93        | 85.97    | 65.84        | 55.21    |
| День 15 | 104.51       | 126.96   | 89.16        | 96.94    | 87.93        | 102.10   |

## Висновок

Несподівано і всупереч даним доклінічних досліджень, одержаним з цією самою партією вакцини (приклад I), як описано у VVO 04/110486, та клінічним даним (Gluck U, Gebbers JO, Gluck R, Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli heat-labile

toxin in adult volunteers J Virol. 1999 Sep; 73(9): 7780-6), спостерігається задовільна системна імунна реакція згідно з критеріями СНМР для вакцин проти грипу в групі людей, вакцинованих лише один раз протигрипозною вакциною з реконструйованих вірусом без ад'юванта.