



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **112970**

(13) **C2**

(51) МПК

A61K 39/25 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2013 02742	(72) Винахідник(и):	Крах Девід Л. (US), Дехавен Джилл (US), Крісс Дженніфер А. (US), Барр Коллін М. (US), Ягодіч Мері (US)
(22) Дата подання заявки:	04.08.2011	(73) Власник(и):	МЕРК ШАРП ЕНД ДОМЕ КОРП., 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.11.2016	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/371,038	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 6214354 B1, 10.04.2001 MARTIN ET AL.: 'Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB.' VACCINE vol. 28, 13 November 2009, pages 1031 – 1040 WO 94/02596 A1, 03.02.1994
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	05.08.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.06.2013, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.11.2016, Бюл.№ 22		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2011/046534, 04.08.2011		

(54) ІНАКТИВОВАНИЙ ВІРУС ВІТРЯНОЇ ВІСПИ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується інактивованого вірусу вітряної віспи (VZV), який підходить для введення пацієнту з ослабленим імунітетом у вакцині проти VZV, де VZV інактивований з використанням від 10 до 25 кГр гамма-опромінення, де інфекційність VZV складає $\leq 0,040$ бляшкоутворювальних одиниць (БУО)/мл, фармацевтичної композиції, яка містить вказаний інактивований вірус, та її застосування для лікування оперізувального лишая.

UA 112970 C2

ОПИС

Галузь техніки, до якої належить винахід

Винахід стосується композицій і способів профілактики і лікування оперізувального лишаю. Більш конкретно винахід стосується вакцинних композицій, що містять вакцину на основі інактивованого вірусу вітряної віспи (VZV), і способів одержання вказаних композицій.

Передумови створення винаходу

Первинна інфекція вірусом вітряної віспи (VZV) викликає вітряну віспу, як правило, у дітей і підлітків. Хоч клінічні вияви вітряної віспи, як правило, долаються самостійно протягом короткого періоду часу, VZV може зберігатися в латентному стані в сенсорних нейронах протягом багатьох років після інфекції. Реактивація і реплікація латентного VZV, як правило, через десятиріччя, може викликати оперізувальний лишай (HZ), широко відомий як оперізувальний герпес, хворобливі висипання, які, як правило, обмежені тільки дерматомом. Така реактивація VZV корелює зі зниженням клітинного імунітету, яке виникає в немолодому віці, або у осіб з ослабленим імунітетом (Weinberg et al., *Journal of Infectious Diseases* (2009), 200:1068-77). У деяких пацієнтів біль, асоційований з HZ, може зберігатися протягом місяців або навіть років після лікування висипів HZ, ускладнення, визначуване як постгерпетична невралгія (PHN).

На даний час існує жива атенуйована вакцина (ZOSTAVAX®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ) для профілактики оперізувального лишаю у здорових пацієнтів немолодого віку (патенти США №№ 6214354 і 5997880). Така вакцина помітно знижує несприятливий вплив HZ в популяціях імунокомпетентних пацієнтів (Oxman MN, *Clin. Infect. Dis.* (2010), 51(2):197-213; Sanford and Keating, *Drugs Aging* (2010), 27(2):159-76; Oxman et al., *N. Engl. J. Med.* (2005), 352:2271-83). Однак живі атенуйовані вакцини можуть бути непридатними для пацієнтів з імунною недостатністю.

Частота виникнення HZ у індивідуумів з ослабленим імунітетом, включаючи пацієнтів, що страждають гематологічними злоякісними новоутвореннями, пацієнтів, що перенесли імуносупресивну терапію, пацієнтів, яким проводили трансплантацію гематопоетичних стовбурових клітин (HCT) або трансплантацію цілого органа (SOT), ВІЛ-інфікованих пацієнтів і пацієнтів з аутоімунними захворюваннями, вище відносно загальної популяції. Крім того, такі популяції пацієнтів схильні до підвищеного ризику виникнення важких і небезпечних для життя ускладнень (Gourishankar et al. (2004), *Am. J. Transplant.* 4:108-115; Ragozzino et al. (1982), *Medicine (Baltimore)*, 61:310-316; Wung et al. (2005), *Am. J. Med.* 118:1416. e9-1416 e18; Dworkin & Schmader (2003), *Clinical Infectious Diseases*, 36:877-882; Gebo et al. (2005), *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 40:169-174; Mattiuzzi et al. (2003), *Clinical Cancer Research*, 9:976-980; Dworkin et al. (2003), *Neurology* 60:1274-1283), таких як менінгоенцефаліти (Tauro et al. (2000), *Bone Marrow Transplant*, 26:795-796), поперечний мієліт, порушення зору (Walton et al. (1999), *Bone Marrow Transplant*, 23:1317-1320), пневмонія (Wacker et al. (1989), *Bone Marrow Transplant*, 4:191-194), гепатит (Rogers et al. (1995), *Bone Marrow Transplant*, 15:805-807; Schiller et al. (1991), *Bone Marrow Transplant*, 7:489-491), бактеріальна суперінфекція, рубцювання шкіри і спотворення (Schuchter et al. (1989), *Blood*, 74:1424-1427). Незважаючи на високий ризик захворюваності і смерті, асоційованої з HZ, у індивідуумів з ослабленим імунітетом, для цієї популяції не допускається вакцинація живою атенуйованою вакциною проти HZ, такою як ZOSTAVAX®. Таким чином, існує суттєва необхідність у вакцинах, які були б безпечними і ефективними для популяцій пацієнтів з імунною недостатністю для запобігання HZ або зменшення тяжкості або тривалості HZ або асоційованих з ним ускладнень.

Питання безпеки відносно пацієнтів з імунною недостатністю підштовхнули дослідників до дослідження застосування інактивованих вакцин проти вірусних патогенів, таких як субодичні вакцини, вакцини на основі вірусоподібних частинок і інактивованих цільних вакцин. Багато які схвалені інактивовані вакцини містять віруси, які інактивовані з використанням формаліну, включаючи вакцини проти гепатиту А, поліомієліту і японського енцефаліту. Стосовно HZ передбачають, що більш безпечну вакцину для індивідуумів з ослабленим імунітетом можна одержувати шляхом інактивації нагріванням VZV або застосуванням субодичної вакцини (Cohen J.I. (2008), *J. Infect. Dis.* 197(Suppl 2):S237-S241). У Redman et al. (*J. Infectious Diseases* (1997), 176:578-85) описана інактивована вакцина проти VZV, яку інактивували нагріванням при 50 °C, що приводило до вмісту вірусів $\leq 1,2$ БУО/0,5 мл. Такий рівень інфекційності не бажаний для продукту, який необхідно вводити пацієнтам з імунною недостатністю. У патентах США №№ 6214354 і 5997880 також згадується можливе використання інактивованої вакцини проти VZV і описаний приклад одержання і тестування термічно обробленої вакцини.

У медицині був би суттєво запитаний спосіб інактивації VZV, в результаті якого одержать зразок VZV, який був би безпечним і ефективним для пацієнтів з імунною недостатністю, тобто

не мав би залишкової інфекційності, але зберігав би імуногенність і антигенність неінактивованого зразка.

Суть винаходу

У даному описі показано, що зразок VZV можна інактивувати гамма-опроміненням таким чином, що інфекційність зразка знаходиться на невизначуваному рівні, однак це не приводить до суттєвої втрати в імуногенності і/або антигенності і до значних змін в структурі VZV після інактивації способами, описуваними в даному розкритті, відносно не підданого інактивації зразка VZV.

У одному з аспектів винахід стосується інактивованого вірусу вітряної віспи (VZV), де інфекційність VZV не виявляється, і де при введенні пацієнту інактивованій VZV викликає імунну відповідь до VZV. Винахід також стосується фармацевтичної композиції/вакцини, яка містить терапевтично ефективну кількість інактивованого VZV і фармацевтично прийнятний носій. Композиції за винаходом знаходяться в рідкому або замороженому стані, наприклад ліофілізованому. У деяких варіантах здійснення композицій, описуваних в даному розкритті, VZV інактивованій гамма-опроміненням.

У іншому аспекті винахід стосується способу одержання інактивованої вакцини проти VZV, де спосіб включає гамма-опромінення зразка, що містить VZV, із застосуванням від приблизно 5 кГр до приблизно 50 кГр гамма-опромінення. У переважних варіантах здійснення джерело гамма-опромінення являє собою ^{60}Co , хоч інші відомі в даній галузі ізотопи також можуть бути придатними в цьому відношенні. У деяких варіантах здійснення описуваного в даному розкритті способу одержання зразок до опромінення ліофілізують. У альтернативних варіантах здійснення нефасований рідкий препарат піддають гамма-опроміненню без попередньої ліофілізації.

Винахід також стосується способу лікування або імунізації проти HZ або іншого захворювання, асоційованого з реактивацією VZV, де спосіб включає введення індивідууму вакцини або фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інактивованого VZV і фармацевтично прийнятний носій, де VZV інактивованій гамма-опроміненням. У деяких варіантах здійснення способів лікування, описуваних в даному розкритті, спосіб введення композиції/вакцини є підшкірним або внутрішньом'язовим. У конкретних варіантах здійснення такого аспекту винаходу вік пацієнта становить 50 років або більше і/або пацієнт страждає імунною недостатністю.

Протягом всього опису і в прикладеній формулі винаходу, форми однини включають множину, якщо з контексту явно не впливає інше.

Протягом всього опису і в прикладеній формулі винаходу, використовують представлені нижче визначення і скорочення.

Термін "лікування" стосується терапевтичного лікування і профілактичних або превентивних заходів. До потребуючих лікування індивідуумів належать індивідууми вже з порушенням, а також схильні до порушення індивідууми або індивідууми, у яких порушення необхідно попередити. Лікування пацієнта інактивованим VZV за винаходом включає одне або декілька з перерахованого нижче: індукування/посилення імунної відповіді у пацієнта проти VZV, запобігання, поліпшення стану, усунення або зниження імовірності реактивації VZV у пацієнтів, які інфіковані вітряною віспою або одержували живу вакцину проти VZV, запобігання або зниження імовірності розвитку HZ і/або іншого захворювання або ускладнення, асоційованого з реактивацією VZV, такого як PHN, зменшення тяжкості або тривалості HZ і/або іншого захворювання або ускладнення, асоційованого з реактивацією VZV, такого як PHN.

Термін "терапевтично ефективна кількість" означає достатню вакцинну композицію для надання бажаної дії, включаючи, але, не обмежуючись ними, індукування/посилення імунної відповіді у пацієнта проти VZV, запобігання, поліпшення стану або усунення реактивації VZV у пацієнтів, які інфіковані вітряною віспою або одержували живу вакцину проти VZV, запобігання HZ і/або PHN, зменшення тяжкості або тривалості HZ і/або PHN. Фахівець в даній галузі розуміє, що цей рівень може змінюватися.

Термін "імунна відповідь" стосується клітинної (Т-клітина) імунної відповіді і/або утворення антитіл (В-клітина).

Термін "пацієнт" стосується будь-якої людської істоти, яка повинна одержувати інактивовані вакцини проти VZV або фармацевтичні композиції, описувані в даному розкритті, включаючи імунокомпетентних індивідуумів і індивідуумів з імунною недостатністю. Як визначено в даному описі, "пацієнт" включає вже інфікованих VZV пацієнтів шляхом природної інфекції або вакцинації.

Термін "нефасований" стосується рідкого складу або композиції, що містить більше однієї дози вакцини.

Термін "невизначувані рівні" відносно інфекційності конкретного вакцинного складу або композиції означає, що склад або композиція містить $\leq 0,050$ інфекційних доз або бляшкоутворювальних одиниць ("БУО") вірусу інфекційної VZV на мл зразка, переважно $\leq 0,040$ БУО/мл, $\leq 0,030$ БУО/мл, $\leq 0,020$ БУО/мл, $\leq 0,015$ БУО/мл, $\leq 0,010$ БУО/мл, $\leq 0,009$ БУО/мл або $\leq 0,008$ БУО/мл, більш переважно $\leq 0,007$ БУО/мл, $\leq 0,006$ БУО/мл, $\leq 0,005$ БУО/мл, $\leq 0,004$ БУО/мл, $\leq 0,003$ БУО/мл, більш переважно $\leq 0,002$ БУО/мл або $\leq 0,001$ БУО/мл. БУО конкретного зразка можна визначати із застосуванням, наприклад, аналізу утворення бляшок вітряної віспи, такого як аналіз, описаний в прикладі 1, а також описаний у Krah et al. (J. Virol. Methods (1990), 27:319-26). Інфекційність зразка також можна підтверджувати способом імунозabarвлення, як описано в прикладі 1.

Короткий опис креслень

На фігурі 1 представлена кінетика інактивації γ -опроміненого ліофілізованого VZV (log БУО/мл в порівнянні з дозою опромінення, див. приклад 4). Флакони з VZV опромінювали при різних рівнях ^{60}Co -випромінювання з використанням ^{60}Co -опромінювача Gammacell®. Залишкові БУО/мл кожного флакона на дозу опромінення (Гр) визначали з використанням аналізу утворення бляшок вітряної віспи на клітинах MRC-5. Спостережувані експериментальні значення показані у вигляді темнозabarвлених ромбиків ("спостереження"), і максимальні значення, визначені аналізом, показані у вигляді сірих ромбиків (" \leq значення").

На фігурі 2 представлена кінетика інактивації γ -опроміненого нефасованого препарату VZV (титр log БУО/мл відносно часу опромінення, див. приклад 4). Для опромінення нефасованого препарату VZV використовували різні рівні ^{60}Co -випромінювання. Опромінений нефасований препарат аналізували на залишкову інфекційність аналізом утворення бляшок вітряної віспи з використанням клітин MRC-5.

На фігурах 3A-3F представлена відповідь VZV (SFC/ 10^6 PBMC) після інактивації VZV при різних умовах, як визначено аналізом ELISPOT на IFN γ VZV (див. приклад 5). Представлені дані для 6 зразків донорських PBMC (фігури A-F) для п'яти термічно оброблених нефасованих препаратів VZV і двох гамма-опромінених нефасованих препаратів VZV. Також показані відповіді VZV п'яти (необроблених) зразків VZV з нефасованих препаратів, які використовували вище, і серія VZV, яку інактивували обробкою УФ-випромінюванням (VZV серія № 96,07).

На фігурах 4A-4C представлені зображення вірусних частинок VZV, як визначено за допомогою крио-ПЕМ (див. приклад 6). Показані необроблені ліофілізовані зразки (фігура 4A), опромінені 25 кГр (фігура 4B) і опромінені 50 кГр (фігура 4C).

На фігурі 5 представлені результати дослідження імуногенності мишей, в якому титр VZV (відповідь IgG) для набору інактивованих препаратів VZV, одержаних різними способами інактивації (див. приклад 8), оцінювали аналізом ELISA відносно VZV. Розраховані титри VZV (титр VZV мінус титр MRC-5) представлені для кожної миші разом з середнім геометричним титру. Також представлені результати 2 мишей з термічно обробленої ліофілізованої групи, які були розцінені як випадуючі спостереження.

На фігурі 6 представлений статистичний аналіз grELISA утворення антитіл до VZV в різні моменти часу у реципієнтів вакцини, що є людьми, які одержували термічно оброблену вакцину проти VZV (N=65) або гамма-опромінену вакцину проти VZV (N=63), як описано в прикладі 9.

На фігурі 7 представлений статистичний аналіз grELISA утворення антитіл до VZV в різні моменти часу у реципієнтів вакцини, що є людьми, які одержували гамма-опромінену вакцину B проти VZV (16-25 кГр, N=64) або гамма-опромінену вакцину C (25-50 кГр, N=65), як описано в прикладі 10.

Докладний опис винаходу

У даному описі показано, що нефасований або ліофілізований зразок VZV може бути інактивованим гамма-опроміненням таким чином, що інфекційність VZV в зразку знаходиться на невизначуваному рівні (наприклад, інфекційність інактивованих зразків VZV, описуваних в даному розкритті, складала $\leq 0,001$ БУО/мл). Інактивований VZV, одержуваний описуваними в даному розкритті способами, можна складати спільно з фармацевтично прийнятним носієм для одержання фармацевтичної композиції або вакцини для застосування в способах лікування/імунізації за винаходом. Не виявлено суттєвої втрати в імуногенності і/або антигенності і суттєвих змін в структурі VZV після інактивації описуваними в даному розкритті способами відносно неінактивованого зразка VZV. Таким чином, коли пацієнтам вводять фармацевтичні композиції за винаходом, викликана композицією імунна відповідь суттєво не відрізняється від імунної відповіді, викликаної контрольним зразком, що містить аналогічну кількість неінактивованого VZV. Як використовують в даному описі, імунна відповідь, викликана інактивованим зразком, що "суттєво не відрізняється" від неінактивованого контрольного зразка, приблизно на 50 % або менше, більш переважно приблизно на 40 % або менше, приблизно на

30 % або менше, навіть більш переважно приблизно на 20 % або менше, 15 % або менше, 10 % або менше або 5 % або менше.

Імунна відповідь, викликана інактивованим і контрольним зразками, можна визначати на придатній моделі на тваринах або популяції людей в клінічному випробуванні, наприклад, вимірюючи один або декілька наступних параметрів: (1) частоту зустрічальності специфічних до VZV імунореактивних клітин (як описано у Calandra et al., в патенті WO 94/002596), (2) цитотоксичні Т-клітини проти VZV (CTL) або специфічні до VZV клітини CD8⁺, (3) Т-хелпери проти VZV або специфічні до VZV клітини CD4⁺, (4) рівень специфічних антитіл до VZV, або (5) рівень лімфокінів, таких як інтерферон або інтерлейкін.

Способи, придатні для визначення імунної відповіді, відомі в даній галузі і включають, але, не обмежуються ними, аналіз Т-клітинної імунної реакції, аналіз активності, аналіз ELISPOT IFN γ VZV і аналіз ELISA.

Для визначення достатності імунної відповіді, що викликається вакцинами/фармацевтичними композиціями за даним винаходом і викликані описуваними в даному розкритті способами, а також ефективність інактивованої вакцини придатним може виявитися визначення клінічних результатів в клінічному випробуванні на добровольцях/індивідуумах, що є людьми, для визначення, наприклад, зменшення тривалості або тяжкості HZ і/або зменшення тривалості PHN у індивідуума протягом періоду менше одного місяця після виникнення оперізувального лишая, зниження частоти виникнення оперізувального лишая в популяції пацієнтів на статистичному рівні нижче частоти виникнення, виявленої в загальній популяції, або у тих, що аналогічно знаходяться в групі ризику, або у індивідуумів з імунною недостатністю.

Як указано вище, в даному винаході показано, що препарати VZV можна інактивувати до невизначуваних рівнів, які в той же час все ще зберігають антигенність і імуногенність, аналогічну неінактивованому VZV. Таким чином, один з аспектів винаходу стосується інактивованого VZV, де інфекційність VZV не виявляється, і де при введенні пацієнту інактивованій VZV викликає імунну відповідь проти VZV.

Фахівець в даній галузі може легко визначити придатну кількість антигену VZV для застосування як терапевтично ефективної кількості VZV. Така кількість варіює залежно від призначуваного застосування або інших факторів, таких як конкретна популяція пацієнтів. У деяких варіантах здійснення описуваних в даному розкритті способів і композицій кількість VZV складає від приблизно 1 до приблизно 10 антигенних одиниць VZV/дозу, де 1 антигенна одиниця VZV приблизно дорівнює 1 мкг очищеного білка VZV. У конкретних варіантах здійснення кількість антигену VZV, що міститься в композиції, складає від приблизно 2 до приблизно 8 антигенних одиниць VZV/дозу або від приблизно 3 до приблизно 6 антигенних одиниць VZV/дозу. Кількість антигену можна визначати придатним антигенним аналізом, наприклад конкурентним ELISA, описаним в даному розкритті в прикладі 2. Спеціаліст в даній галузі може визначити інші придатні аналізи для вимірювання кількості антигену в зразку.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість описаного вище інактивованого VZV і фармацевтично прийнятний носій, ексципієнт або розріджувач. Придатні для використання в композиціях за винаходом фармацевтично прийнятні носії включають будь-який сумісний засіб, який не є токсичним для пацієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, такий як вода, фізіологічний розчин, декстроза, гліцерин, етанол, буфери і т. п., і їх поєднання. Носій також може містити додаткові компоненти, такі як стабілізатор, солюбілізатор, модифікатор тоничності, такий як NaCl, MgCl₂ або CaCl₂ і т. д., поверхнево-активну речовину і їх суміші.

Винахід також стосується багатодозових композицій, які містять більше однієї дози інактивованого VZV, протимікробного консерванту, який запобігає випадковому мікробному забрудненню при введенні шприца у флакон, що містить композицію і фармацевтично прийнятний носій. Такі багатодозові композиції можна вводити пацієнтам більше одного разу після того, як пройде певна кількість часу, або більше ніж одному пацієнту.

У деяких варіантах здійснення винаходу композиція являє собою рідкий нефасований препарат, який містить більше однієї дози інактивованого VZV. У альтернативних варіантах здійснення композиція є ліофілізованою. Способи ліофілізації відомі в даній галузі. Винахід також стосується ліофілізованого складу, який розбавляють придатним розріджувачем, таким як стерильна вода для ін'єкцій або бактеріостатична вода для ін'єкцій.

Гамма-опромінення широко використовується для стерилізації пристроїв і обладнання для медичного застосування. Його також використовують для знищення будь-яких потенційних патогенів в біологічних препаратах, таких як препарати крові і препарати антитіл. Для цих цілей

організм інактивований без урахування збереження функцій організму. Існує обмежена кількість літературних джерел, в яких описана інактивація вірусів гамма-опроміненням.

Rosen et al. (Int. J. Radiat. Biol. 52:795-804 (1987)) оцінювали інтактні вірусні частинки вірусу простого герпесу на збереження здатності бляшкоутворення і очищені геноми на пошкодження молекул ДНК після обробки ^{60}Co -випромінюванням. У дослідженні не оцінювали антигенність або імуногенність вірусу після опромінення. У іншому дослідженні Elliott et al. (J. Clin. Microbiol. 16:704-708 (1982)) оцінювали інактивацію вірусів Ласса, Марбурга і Ебола з використанням ^{60}Co -випромінювання. Для вірусів Ласса, Ебола і Марбурга спостерігали лінійну кінетику інактивації, і інактивацію вірусу проводили гамма-опроміненням із застосуванням ^{60}Co -випромінювання. Elliott et al. спостерігали, що для інактивації вірусу в замороженому стані була потрібна більш висока доза, в порівнянні з рідким станом. Подібно дослідженню Rosen et al., в цьому дослідженні не вдалося визначити антигенність або імуногенність вірусів після гамма-опромінення. Alsharifi et al. (WO 2010/012045) описують гамма-опромінення для інактивації вірусу грипу, РНК-вмісного вірусу сімейства Orthomyxoviridae, для застосування як вакцини.

У описуваному в даному розкритті винаході показано, що гамма-опромінення може зменшувати інфекційність вірусного препарату VZV до невизначуваних рівнів при збереженні антигенності, імуногенності і структурних характеристик неінактивованого контролю. Таким чином, в переважних варіантах здійснення винаходу VZV інактивований гамма-опроміненням, якому можна піддавати VZV за допомогою експонування придатним ізотопом, таким як ^{60}Co , $^{137}\text{цезій}$, $^{99}\text{технецій}$ або $^{99\text{m}}\text{Tc}$. У переважних варіантах здійснення VZV піддають гамма-опроміненню за допомогою експонування ^{60}Co -випромінюванням.

Кількість гамма-опромінення, придатного для інактивації VZV, складає від приблизно 5 до приблизно 50 кілогрей (кГр) гамма-опромінення. Грей (Гр) являє собою стандартну одиницю поглиненої дози, де один грей дорівнює поглиненій дозі 1 Джоуль/кілограм (100 рад). Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що кількість опромінення, якому піддають зразок, і кількість часу потрібно варіювати для одержання бажаної поглиненої дози опромінення (доза = густина потоку \times час). Фахівець в даній галузі також зможе змінювати кількість опромінення, якому піддається зразок, залежно від розміру контейнера, в який поміщений зразок, таким чином, що забезпечують точну дозу опромінення всьому зразку без надмірного експонування частини зразка, наприклад найбільш близької до радіоактивного джерела частини.

У деяких варіантах здійснення способів і композицій за винаходом, описуваних в даному розкритті, кількість гамма-опромінення, застосовувана для інактивації VZV, становить приблизно 25 кГр або менше. У альтернативних варіантах здійснення кількість гамма-опромінення знаходиться в діапазоні від приблизно 5 кГр до приблизно 40 кГр, від приблизно 5 кГр до приблизно 35 кГр, від приблизно 5 кГр до приблизно 30 кГр, від приблизно 5 кГр до приблизно 25 кГр, від приблизно 5 кГр до приблизно 20 кГр, від приблизно 5 кГр до приблизно 10 кГр, від приблизно 10 кГр до приблизно 50 кГр, від приблизно 10 кГр до приблизно 40 кГр, від приблизно 10 кГр до приблизно 35 кГр, від приблизно 10 кГр до приблизно 30 кГр, від приблизно 10 кГр до приблизно 25 кГр, від приблизно 10 кГр до приблизно 20 кГр, від приблизно 15 кГр до приблизно 50 кГр, від приблизно 15 кГр до приблизно 40 кГр, від приблизно 15 кГр до приблизно 35 кГр, від приблизно 15 кГр до приблизно 30 кГр, від приблизно 15 кГр до приблизно 25 кГр, від приблизно 15 кГр до приблизно 20 кГр.

Винахід також стосується фармацевтичної композиції, як описано вище, і способів одержання вказаної композиції, де композиція являє собою рідкий нефасований препарат, і кількість гамма-опромінення, застосовувана для інактивації VZV, складає від приблизно 5 кГр до приблизно 10 кГр або від приблизно 5 кГр до приблизно 12,5 кГр. У інших конкретних варіантах здійснення композицію піддають ліофілізації до гамма-опромінення, і в такому варіанті здійснення кількість гамма-опромінення складає від приблизно 5 кГр до приблизно 25 кГр або від приблизно 15 кГр до приблизно 25 кГр.

У даному описі показано, що спостерігали лінійну кінетику інактивації для VZV, інактивованого гамма-опроміненням, яке являє собою суттєву перевагу при проведенні моделювання інактивації, тобто достовірної оцінки рівня залишкової інфекційності зразка, що містить інактивований VZV. Таку лінійну кінетику інактивації не спостерігали для термічно обробленого інактивованого VZV. Grieb et al. (Biologicals (2002), 30:207-216, and Biomaterials (2005), 26:2033-2042) описали два специфічних механізми інактивації вірусів гамма-опроміненням, яке сприяє лінійній кінетиці інактивації, спостережуваний для VZV. Перший механізм є "безпосереднім результатом поглиненої енергії фотона ціллю". Таке пряме перенесення енергії приводить до "переміщення електронів зовнішньої оболонки молекули і розриву ковалентних зв'язків". Другий, "опосередкований", механізм є результатом хімічного впливу на вільні радикали і активні форми кисню, що, як правило, генеруються при взаємодії

випромінювання з молекулами води і киснем. У конкретних варіантах здійснення композицій і способів, описуваних в даному розкритті, VZV піддають ліофілізації до інактивації гамма-опроміненням, таким чином, малоімовірна численна взаємодія з молекулами води, оскільки воду видаляють з продукту при ліофілізації.

5 Redman et al. (J. Infectious Diseases (1997), 176:578-85) описують інактивовану вакцину проти VZV, яку інактивували нагріванням до 50 °C, що приводило до вмісту інфекційного вірусу $\leq 1,2$ БУО/0,5 мл. Показано, що термічно оброблена вакцина, описана Redman і співавторами, зменшує тяжкість захворювання, асоційованого з реактивацією VZV, у 24 пацієнтів, що чекають аутологічну БМТ, або ін'єкцію стовбурових клітин периферичної крові, або іншу БМТ. Такий
10 рівень інфекційності не придатний для всіх пацієнтів, таких як пацієнти з ослабленим імунітетом. Крім того, для способів інактивації VZV із застосуванням термічної обробки необхідні тривалі періоди часу для одержання низьких рівнів інфекційності, яка є неефективною і економічно недоцільною.

Нарешті, винахід стосується інактивованого VZV і фармацевтичних композицій/вакцин, що
15 містять вказаний інактивований VZV, де інфекційність VZV знаходиться на невизначуваному рівні, тобто $\leq 0,050$ БУО/мл, де вказані композиції інактивованого VZV є більш безпечними, ніж описані раніше вакцини для лікування і/або профілактики HZ або захворювання, асоційованого з реактивацією VZV, і придатні для більш ефективного способу одержання. Інактивовані VZV за даним винаходом зберігають структурні фізичні характеристики, імуногенність і антигенність
20 неінактивованого контролю VZV після інактивації. У деяких варіантах здійснення інфекційність складає $\leq 0,040$ БУО/мл, $\leq 0,030$ БУО/мл або $\leq 0,020$ БУО/мл. Винахід також стосується варіантів здійснення, де величина інфекційних доз складає $\leq 0,015$ БУО/мл, $\leq 0,010$ БУО/мл, $\leq 0,009$ БУО/мл або $\leq 0,008$ БУО/мл. У альтернативних варіантах здійснення інфекційність VZV складає $\leq 0,007$ БУО/мл, $\leq 0,006$ БУО/мл, $\leq 0,005$ БУО/мл, $\leq 0,004$ БУО/мл або $\leq 0,003$ БУО/мл. У
25 додаткових альтернативних варіантах здійснення інфекційність складає $\leq 0,002$ БУО/мл або $\leq 0,001$ БУО/мл.

У деяких варіантах здійснення композицій і способів, описуваних в даному розкритті, інфекційність (БУО) зразка визначають з використанням аналізу утворення бляшок вітряної віспи, такого як аналіз, описаний в прикладі 1, а також описаний у Krah et al. (J. Virol. Methods
30 (1990), 27:319-26). Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що інші способи також придатні для визначення інфекційності зразка VZV або композиції VZV, і їх можна використовувати замість аналізу утворення бляшок вітряної віспи.

У композиціях і способах, описуваних в даному розкритті, можна використовувати будь-який штам VZV, в тому числі штам вітряної віспи дикого типу або атенуйований штам, такий як штам Ока, описаний в патенті США № 3985615 і доступний від American Type Culture Collection (номер доступу VR-795™, ATCC, Manassas, VA). Штам Ока спочатку був одержаний від здорового хлопчика з інфекцією звичайної вітряної віспи і пересіяний на ембріональні клітини легень людини. Його адаптували для вирощування на клітинних культурах ембріональних клітин морської свинки і клітинних культурах диплоїдних фібробластів легень людини (наприклад, клітинах MRC-5). У переважних варіантах композицій і способів, описуваних в даному розкритті, VZV являє собою штам Ока або похідне штаму Ока, таке як штам VZV Ока/Мерк. Як використовують в даному описі, "похідне штаму Ока" являє собою штам, одержаний способом додаткового пересівання штаму Ока на придатний тип клітин для достатньої атенуації штаму таким чином, щоб він був придатним, наприклад, як жива атенуйована вакцина. В описуваних в
45 даному розкритті способах і композиціях за винаходом живий або атенуйований VZV, такий як штам Ока або його похідне, інактивують гамма-опроміненням до введення пацієнту.

Даний винахід також стосується способу одержання інактивованого VZV, який включає гамма-опромінення зразка, що містить VZV, із застосуванням від приблизно 5 до приблизно 50 кГр гамма-опромінення. У переважних варіантах здійснення такого аспекту винаходу зразок
50 піддають гамма-опроміненню за допомогою експонування зразка ^{60}Co -випромінюванням. У конкретних варіантах здійснення такого аспекту винаходу кількість гамма-опромінення є такою, як описано вище.

Винахід також стосується інактивованого VZV, який одержаний або одержується способами, описуваними в даному розкритті. Додатково винахід стосується вакцини, яка містить
55 терапевтично ефективну кількість інактивованого VZV, одержаного описуваними в даному розкритті способами, і фармацевтично прийнятний носій.

У одному з аспектів винахід також стосується способу лікування, профілактики, імунізації проти або зниження імовірності виникнення оперізувального лишая і/або іншого захворювання або ускладнення, асоційованого з реактивацією VZV, наприклад постгерпетичної невралгії, у
60 пацієнта, де спосіб включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості вакцини або

фармацевтичній композиції, що містить інактивований VZV і фармацевтично прийнятний носій, де VZV інактивований гамма-опроміненням. У зв'язку з тим, що реактивація VZV корелює зі зниженням клітинного імунітету, способи лікування в даному описі придатні для посилення клітинної імунної відповіді у пацієнта, який був попередньо експонований вітряною віспою шляхом природної інфекції або вакцинації, але у якого знизилася імунна відповідь внаслідок віку і/або дисфункції імунної системи.

У описаних вище способах лікування/імунізації фармацевтичну композицію, яка містить інактивований VZV, можна вводити пацієнту будь-яким придатним способом, включаючи, але, не обмежуючись ними, підшкірну ін'єкцію, внутрішньокірне введення, втиснення через шкіру або інші способи введення, такі як, внутрішньовенна, внутрішньом'язова або інгаляційна доставка. У переважних варіантах здійснення способів, описуваних в даному розкритті, спосіб введення являє собою підшкірний або внутрішньом'язовий.

Описані вище способи і композиції придатні для запобігання HZ і/або PHN або зменшення їх тяжкості або тривалості в популяціях імунокомпетентних пацієнтів і пацієнтів з імунною недостатністю, включаючи, але, не обмежуючись ними, здорових пацієнтів і пацієнтів з імунною недостатністю, які перенесли трансплантацію гематопоетичних стовбурових клітин (HCT) або трансплантацію цілого органа (SOT), ВІЛ-інфікованих пацієнтів, пацієнтів з аутоімунними захворюваннями, індивідуумів зі злоякісними новоутвореннями крові, індивідуумів, що одержують хіміотерапію відносно широкого діапазону солідних пухлинних злоякісних новоутворень, пацієнтів, що одержують тривалу імуносупресивну терапію відносно широкого діапазону станів, включаючи ревматоїдний артрит (RA), системний червоний вовчак (SLE), хворобу Крона, псоріаз і розсіяний склероз. У деяких варіантах здійснення способів, описуваних в даному розкритті, інактивовану вакцину проти VZV вводять пацієнту з підвищеним ризиком HZ внаслідок захворювання, наприклад вказаних вище захворювань, або лікування захворювання (такого як гематологічні злоякісні новоутворення, солідні пухлинні злоякісні новоутворення або хіміотерапія, аутоімунні захворювання).

У деяких варіантах здійснення будь-якого з описаних вище способів і композицій вік пацієнта становить 50 років або старше, і пацієнт може бути здоровим або з імунною недостатністю. У інших варіантах здійснення вік пацієнта становить 55 років або старше, 60 років або старше, 65 років або старше, 70 років або старше або 75 років або старше. У альтернативних варіантах здійснення вік пацієнта складає від приблизно 50 до приблизно 55 років, від приблизно 55 до приблизно 60 років, від приблизно 60 до приблизно 65 років або від приблизно 65 до 70 років.

У додаткових варіантах здійснення способів, описуваних в даному розкритті, вакцину або фармацевтичну композицію вводять спільно з іншими загальноприйнятими "стандартними терапіями" або з іншими вакцинами для цільових популяцій пацієнтів, включаючи, наприклад, пневмококову вакцину, таку як PNEUMOVAX™ 23 (PN23, Merck & Co., Inc.), вакцину проти гепатиту В (HBV), таку як RECOMBIVAX™ HB або ENGERIX-B™ (GlaxoSmithKline Biologicals), і вакцини проти грипу.

У окремих варіантах здійснення способів лікування/запобігання, описуваних в даному розкритті, спосіб додатково включає забезпечення проходження відповідної певної кількості часу і введення пацієнту однієї або більше додаткових доз фармацевтичної композиції. У вказаних варіантах здійснення одну додаткову дозу можна вводити пацієнту після того, як пройшла відповідна кількість часу, альтернативно, можна вводити дві, три або чотири додаткові дози після того, як пройшла відповідна кількість часу. У ілюстративному варіанті здійснення пацієнту вводять 3 або 4 дози в рамках режиму дозування, який відповідним чином розділений протягом всього періоду часу. Фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що кількість часу між дозами може варіювати залежно від популяції пацієнтів, дозування вакцини і/або додержання пацієнтом схеми лікування. У ілюстративному варіанті здійснення допускають проходження періоду часу приблизно 3 тижні, приблизно 1 місяць, приблизно 6 тижнів, приблизно 2 місяці або приблизно 3 місяці або більше між введеннями кожної дози пацієнту. У одному конкретному варіанті здійснення вакцину вводять пацієнту, на якого чекає трансплантація, до трансплантації, наприклад за 3 тижні, 1 місяць або 2 місяці до трансплантації, і пацієнту вводять додаткові одну або більше доз у відповідні періоди часу після трансплантації, наприклад через 3 тижні, 1 місяць або 2 місяці після трансплантації, після проходження певної кількості часу між введенням кожної дози.

Всі публікації, вказані в даному описі, включені за допомогою посилання з метою ілюстрації і опису способів і речовин, які можна використовувати застосовно до даного винаходу. Ніщо в даному описі не треба тлумачити як допущення того, що винахід не наділений правом передувати такому розкриттю на основі попереднього винаходу.

Опис переважних варіантів здійснення винаходу з посиланнями на прикладені креслення потрібно розуміти як те, що винахід не обмежений цими конкретними варіантами здійснення, і що фахівець в даній галузі може проводити різні зміни і модифікації в ньому, не виходячи за рамки обсягу або суті винаходу, як визначено в прикладеній формулі винаходу.

5 Представлені нижче приклади ілюструють, але не обмежують винахід.

РЕЧОВИНИ І СПОСОБИ

ПРИКЛАД 1

Аналіз утворення бляшок вітряної віспи

10 Титри інфекційності препаратів вірусу вітряної віспи (VZV) визначали з використанням рідкого двофазового способу, описаного Krah et al. (J. Virol. Methods (1990), 27:319-326). Аналіз проводили таким чином: клітини MRC-5 (диплоїдні фібробласти легень людини) висівали на 60 мм планшетах для культивування тканин при 600000 клітин в 5 мл об'єму BME (мінімальне середовище Ігла зі збалансованим сольовим розчином Хенкса) з 100 мг/л галактози, 50 мкг/мл неоміцину, 2 mM L-глутамату і інкубували при 35±1 °C в 5±1 % CO₂-інкубаторі. Після інкубації 15 протягом 24-56 годин клітини досягали 50-80 % конфлюентності, і їх використовували для аналізу утворення бляшок. Середовище для вирощування клітин видаляли аспірацією, і клітини інфікували 100 мкл аліквотами розчину VZV, розбавленого у відповідному розріджувачі, такому як стабілізатор PGS (PBS з сахарозою і гідролізованим желатином).

Вірус давали розповсюдитися протягом ≥1 години при 35±1 °C в 5±1 % CO₂-інкубаторі. Потім 20 культури покривали 5 мл об'єми підтримувального середовища (мінімальне підтримувальне середовище з солями Ігла (MEM), 2 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки, 50 мкг/мл неоміцину і 2 mM L-глутамату) і знов залишали інкубуватися при 35±1 °C в 5±1 % CO₂-інкубаторі протягом 6-7 діб для утворення бляшок. Потім середовище з планшетів аспірували і візуалізували бляшки за допомогою забарвлення клітин 0,2 % (мас./об.) розчином 25 Кумасі синього R-250 в етанолі, 1 % оцтовою кислотою. Кількість бляшок являла собою середнє 3-5 повторень, і її множили на коефіцієнт розбавлення (зворотну величину відповідного розбавлення тестованих вірусів) і на об'ємний коректуючий фактор інокуляту (10 при доведенні від 0,1 мл до 1 мл) для одержання бляшкоутворювальних одиниць/мл (БЮО/мл).

Враховуючи особливо важливу необхідність в забезпеченні відсутності хибно-позитивних 30 результатів БЮО для інактивованих зразків (в яких могли з'являтися бляшкоподібні плями в моношарі клітин, використовуваних для аналізу утворення бляшок внаслідок випадкового дряпання моношару або внаслідок наявності скупчення клітин), розробляли спосіб імунозабарвлення і застосовували для підтвердження того, що осередки, підраховані як бляшки, фактично були осередками інфікованих VZV клітин (бляшки VZV). У короткому викладі, 35 забарвлення Кумасі синім в стандартному аналізі утворення бляшок наступне, культури з видимими бляшками інкубували з поліклональною сироваткою проти VZV, розбавленою в PBS, 0,05 % Tween 20, і інкубували протягом 1 години при 35 °C. Клітини відмивали PBS, 0,05 % Tween 20 для видалення антитіла, що не зв'язалося, і детектували антитіло, що зв'язалося, з використанням кон'югованого з пероксидазою антитіла кози до IgG людини і субстрату 40 пероксидази (розчину діамінобензидину), який утворював осад при реакції з пероксидазою. Коричневий осад утворювався навколо осередків, що містять VZV, і додаткових бляшок, крім тих, що виявляли при забарвленні Кумасі синім, не детектували. Таким чином, такий спосіб імунозабарвлення з використанням комбінації первинної сироватки проти VZV, кон'югованого з пероксидазою антитіла до первинної сполуки і субстрату пероксидази забезпечує спосіб, який 45 підтверджує, чи є фактично передбачувана бляшка в інактивованому зразку залишковим інфекційним VZV.

ПРИКЛАД 2

Аналізи конкурентного ELISA антигену VZV і неконкурентного ELISA антигену VZV

Для характеристики і кількісного визначення антигену VZV використовували два формати 50 антигенного аналізу. У вибраних дослідженнях використовували конкурентний ELISA антигену, в якому відтворюють тест, використовуваний для оцінки антигену VZV в комерційному продукті VZV, і застосовують одну поліклональну сироватку для детекції антигену VZV. Для одержання додаткової характеристики реактивності антигену VZV після гамма-опромінення або інших інактивуючих обробок розробили і застосовували неконкурентний ELISA, де тестований зразок 55 безпосередньо адсорбувався на планшетах для мікротитрування ELISA, а потім його детектували з використанням моноклональних або поліклональних антитіл.

Конкурентний ELISA для кількісного визначення антигену VZV

У короткому викладі, цей аналіз проводили за допомогою інкубації антигену VZV із 60 тестованих зразків з фіксованою кількістю поліклональної сироватки проти VZV в розчині. Вільне антитіло, що залишалось (що не зв'язалося з антигеном), залишали для зв'язування зі

стандартним антигеном VZV, іммобілізованим на планшетах для мікротитрування ELISA. Кількість антитіла, здатного зв'язуватися з планшетами, зворотно пропорційна кількості антигену в тестованому зразку. Зв'язування антитіл з планшетами кількісно визначали по реакції зі зв'язаним з ферментом антилюдським антитілом і відповідним субстратом з одержанням забарвленого продукту, який кількісно визначали спектрофотометрично.

Спосіб тестування включав наступні стадії. (1) Планшети ELISA покривали глікопротеїнами (gp) від інфікованих VZV або неінфікованих клітин MRC-5, а потім покривали 1 % (мас./об.) бичачим сироватковим альбуміном для зменшення адсорбції неспецифічних антитіл на планшетах. (2) Тестовані антигени VZV розбавляли стабілізатором PGS в поліпропіленових мікропробірках. Антигенний препарат VZV відомого антигенного титру включали як контроль. Зразки, як правило, серійно розбавляли 1:1,25 розведень для одержання концентрацій антигену в діапазоні від 2,6 до 0,9 антигенних одиниць/мл. Для побудови калібрувальної кривої для визначення антигену в тестованих зразках використовували серії розведень стандарту VZV. (3) Сироватку людини проти VZV розбавляли в стабілізаторі PGS до двократного бажаного кінцевого розбавлення. (4) Об'єми по триста мкл розбавленого антигену розливали в поліпропіленові мікропробірки, змішували з 300 мкл розбавленої сироватки проти VZV і інкубували при 35-37 °C протягом 15-30 хвилин. Як контроль використовували сироватку проти VZV плюс розріджувач (не антиген). (5) Аліквоти по 100 мкл з кожної суміші сироватка-антиген (і контролю) додавали до 2 повторень ямок, покритих глікопротеїнами VZV, і до 2 ямок, покритих глікопротеїнами MRC-5. (6) Планшети інкубували протягом 15-30 хв. при 35-37 °C для забезпечення зв'язування вільного антитіла (що не утворило комплекс з тестованим антигеном в розчині) з глікопротеїнами антигену, іммобілізованого на планшетах. (7) Антитіло, що не зв'язалося, видаляли промиванням, і додавали в ямки розчин кон'югованого з лужною фосфатазою антитіла кози до IgG людини для детекції антитіла людини, що зв'язалося. (8) Після інкубації протягом 15-30 хвилин при 35-37 °C кон'югат, що не зв'язався, видаляли промиванням. Кон'югат, що зв'язався, детектували за допомогою інкубації протягом 10-15 хв. при 35-37 °C з п-нітрофенілфосфатним субстратом. (9) Після зупинення реакції субстрату додаванням 50 мкл 3М NaOH кількісно визначали виявлення забарвлення (OD при 405 нм) з використанням мікропланшетного спектрофотометра.

Розрахунки і інтерпретація тестів включали наступні стадії. (1) Відповідні повторні значення OD для повторних ямок, покритих глікопротеїнами VZV і MRC-5, усереднювали. Дослідним шляхом встановлено, що OD MRC-5 різних зразків і розбавлень співпадає. Таким чином, значення OD глікопротеїнів MRC-5 для всієї тестованої серії, як правило, усереднювали і використовували для корекції неспецифічного зв'язування першого антитіла (сироватки проти VZV). Усереднені OD глікопротеїнів MRC-5 віднімали з відповідних усереднених OD глікопротеїнів VZV для одержання специфічних значень (ΔOD) VZV. (2) Побудова калібрувальної кривої для визначення кількостей антигенів: будували графік калібрувальної кривої як залежність значень ΔOD від відомих концентрацій антигену (антигенні одиниці VZV/мл). Дані вводили у відповідну графічну програму, визначали лінійну ділянку кривої і одержували "формулу лінійної відповідності" ($y=a+bx$) для цієї лінійної кривої. (3) Розрахунки кількостей антигену тестованих зразків: оскільки значення a і b задані формулою лінійної відповідності, і y (ΔOD) відоме, невідоме значення x , що являє собою антиген одиниці/мл, можна, таким чином, розрахувати і скоректувати відповідно до розбавлення зразка для одержання концентрації антигену вихідного (нерозбавленого) тестованого зразка. Описана концентрація антигену являє собою концентрацію, одержану з найменш розбавленим зразком, що забезпечує значення ΔOD на лінійній ділянці калібрувальної кривої.

ELISA детекція зв'язування антигену VZV

У короткому викладі, даний аналіз проводили за допомогою інкубування розбавлень антигену VZV із тестованих зразків в 96-ямкових планшетах для мікротитрування для іммобілізації антигену з подальшою детекцією антигену, що зв'язався з моноклональними або поліклональними антитілами до VZV. Антитіла до VZV, що зв'язалися, кількісно визначали реакцією зі зв'язаним з ферментом антитілом до відповідної сполуки і відповідного субстрату з одержанням забарвленого продукту, який кількісно визначали спектрофотометрично. Потім порівнювали криві титрувань OD відносно розбавлення зразків (кількісно визначали як різницю міри розбавлення кривих титрувань ("зсув кривий")).

Спосіб тестування включав наступні стадії. (1) Планшети ELISA з високим зв'язуванням покривали 200 мкл антигену (вакцини), розбавленого PBS 1:20 з 1:2560 в серійних 2-кратних розведеннях. Планшети закривали і зберігали при 2-8 °C протягом ночі. (2) Рідину зі стадії № 1 виливали, і обполіскували планшети 3 рази PBS+0,05 % Tween 20. Видаляли останнє обполіскування і додавали розбавлене антитіло (100 мкл/ямку). Планшети інкубували протягом

1 години при 35 °C. (3) Рідину зі стадії № 2 виливали, і обполіскували планшети 3 рази PBS+0,05 % Tween 20. Останнє обполіскування видаляли і додавали розбавлений кон'югат (100 мкл/ямку). Планшети інкубували протягом 1 години при 35 °C. (4) Рідину зі стадії № 3 виливали, і обполіскували планшети 3 рази PBS+0,05 % Tween 20. Останнє обполіскування видаляли і додавали субстрат (нерозбавлений). Потім планшети інкубували протягом 30 хвилин при 35 °C. (5) Реакцію зупиняли NaOH. (6) Оптичну густину (OD) визначали зчитуванням планшета при 405 нм.

Застосовувані в цьому експерименті антитіла являли собою наступні: EPP сироватка і очищені моноклональні антитіла до gE (Biodesign кат. № mab8612), gB (Chemicon кат. № C05102M, Millipore Corp., Billerica, MA) і gH (Biodesign кат. № C05104M і Virusys кат. № VA033-100, Virusys Corp., Taneytown, MD). Використовувані кон'югати являли собою антилюдський IgG (BioSource кат. № AH10305, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) або козячий антимишачий IgG (Pierce кат. № 31322, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). 100 мл лужної фосфатази pNPP (Sigma кат. № p7988, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) використовували як субстрат.

ПРИКЛАД 3

Аналіз ELISPOT IFN γ VZV

У короткому викладі, серійні розведення тестованих антигенів в діапазоні від 1 до 0,125 антигенних одиниць VZV/мл інкубували з PBMC від 6 донорів в двох повторних ямках. Після інкубації клітини, що відповідають на антиген VZV, визначали по їх здатності продукувати гамма-інтерферон. Продукцію гамма-інтерферону детектували із застосуванням антитіла миші до гамма-інтерферону, нанесеного на планшет для мікротитрування, і відповідного кон'югованого з ферментом вторинного антитіла до IgG миші і субстрату, що дозволяють детекцію субстрату, преципітованого навколо продукуючих гамма-інтерферон клітин ("плями"). Кількість клітин, що утворюють плями (SFC: клітини, які утворюють плями, вказуючи на секрецію гамма-інтерферону), визначали за допомогою автоматичного пристрою для зчитування планшетів ELISPOT, і результати представляли як SFC на 10⁶ PBMC.

РЕЗУЛЬТАТИ

ПРИКЛАД 4

Кінетика інактивації гамма-опроміненого VZV

Раніше автори досліджували термічну обробку як спосіб інактивації ліофілізованого VZV для застосування як вакцини для пацієнтів з імунною недостатністю, але виявили, що цей спосіб приводить до залишкової інфекційності вірусного препарату (див. нижче). Передбачають, що така залишкова інфекційність не є оптимальною характеристикою "інактивованої" вакцини. Більш ефективну інактивацію рідкої нефасованої вакцини одержували відносно ліофілізованої вакцини, але термічна обробка нефасованої вакцини була визначена, як така, що не забезпечує оптимальний спосіб одержання. Таким чином, досліджували альтернативний спосіб інактивації ліофілізованої вакцини проти вірусу вітряної віспи (Ока/Мерк) із застосуванням гамма-опромінення ⁶⁰Co, щоб з'ясувати, чи можна встановити спосіб більш ефективної інактивації інфекційності (одержання більш сприятливого і більш безпечного профілю), ніж при термічній обробці. Метою такої оцінки було, по-перше, визначити, чи можна одержувати більш ефективну інактивацію інфекційності опроміненням ⁶⁰Co, а потім, по-друге, чи відрізняються антигенні властивості, одержані після гамма-опромінення, від антигенних профілів термічно обробленої речовини, і чи є вони придатними для застосування в клінічних дослідженнях. Флакони з VZV опромінювали з використанням $\approx 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ кГр (2007) або 0,45, 1,35 і 2,7 кГр. Опромінення проводили із застосуванням опромінювача ⁶⁰Co Gammacell® (Best Theratronics Ltd. Corporation, Ottawa, Ontario, Canada).

Залишкові БУО/мл кожного флакона на дозу опромінення (Гр) визначали з використанням аналізу утворення бляшок вітряної віспи на клітинах MRC-5. Будували графік залежності log БУО/мл від дози опромінення, і експериментальні дані демонстрували зворотну лінійну залежність інактивації (фігура 1). Після дослідження кінетики автори тестували 100 мл інактивованої вакцини проти VZV, опроміненої ⁶⁰Co-випромінюванням до 12 кГр (інактивованої ліофілізованої), для забезпечення розширеного підтвердження міри інактивації (шляхом тестування більшого загального об'єму). У 100 мл зразка не було детектовано бляшок.

Додатково ⁶⁰Co-випромінювання використовували для опромінення нефасованого препарату VZV. Нефасований препарат розморожували і розливали по аліквотах в PETG пляшки для опромінення при 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 кГр (фігура 2). Опромінений нефасований препарат аналізували на залишкову інфекційність аналізом утворення бляшок вітряної віспи з використанням клітин MRC-5. У 100 мл зразка опроміненого нефасованого препарату (6 кГр) не було детектовано бляшок. Лінійну кінетику інактивації одержували побудовою графіка залежності титру log БУО/мл від часу опромінення.

ПРИКЛАД 5

Оцінка імуногенності аналізом ELISPOT IFN γ VZV

Для оцінки впливу різних способів інактивації на імуногенність проводили аналіз ELISPOT IFN γ VZV, як описано в прикладі 3, з використанням 6 донорських зразків мононуклеарних клітин периферичної крові (PBMC). Це дослідження проводили, щоб встановити, чи знижується утворення IFN γ після інактивації VZV при різних умовах. Тестували п'ять термічно оброблених нефасованих препаратів VZV, а також два гамма-опромінених нефасованих препарати VZV. Термічно оброблені препарати VZV складалися із зразків, які обробляли при наступних умовах: (1) 40 °C протягом 24 год., (2) 45 °C протягом 3,5 год., (3) 45 °C протягом 4,5 год., (4) 56 °C протягом 30 хвилин і (5) 56 °C протягом 90 хвилин. Гамма-опромінені зразки складалися з нефасованих препаратів VZV, гамма-опромінених протягом 3 або 4 годин при 5,92 кГр. Для порівняння також тестували живі (необроблені) зразки VZV з аналогічних нефасованих препаратів, таких як використовувані вище для одержання інактивованих зразків.

Також включали серію VZV, яка була інактивована обробкою УФ-випромінюванням, як антиген ELISPOT (VZV серія № 96.07), як контроль серійного аналізу, а також PHA (позитивний контроль) і середовище (негативний контроль). Всі антигени оцінювали в серійному двократному розбавленні від 1:40 до 1:320. Один серійний аналіз проводили, тестуючи 6 зразків PBMC, вибраних для одержання діапазону рівнів відповіді на VZV.

Підрахунок плям VZV, що виходили (SFC/106 PBMC), представлений на фігурах 3A-F. Не були одержані дані, що свідчать про відмінності у відповіді на VZV для інактивованих антигенних препаратів в порівнянні з необробленими антигенними препаратами в тестованих донорських зразках. Також не були одержані дані про суттєвий взаємозв'язок препарату (обробки) і відповіді при конкретних рівнях розбавлення. Відносно препарату живої VZV відмінності рівнів в підрахунку ELISPOT для 8 інактивованих препаратів VZV, включаючи вихідну VZV серію № 96.07, знаходилися в діапазоні від в 1,15 разу менше (56°C протягом 90 хвилин) до в 1,14 разу більше (40°C протягом 24 годин, серія № 96.07) відносно препарату живого VZV. Відносно препарату живого VZV ні для одного з 8 інактивованих препаратів VZV не одержували статистично значущу більш низьку кількість плям ELISPOT в тестованих донорських зразках.

Таким чином, при тестуванні ELISPOT з використанням PBMC від групи донорів, що є людьми, не показано значущої відмінності у відповідях для препаратів VZV, інактивованих різними способами (термічною обробкою при 40°C, 45°C, 56°C або гамма-опроміненням нефасованого препарату).

ПРИКЛАД 6

Аналіз електронної мікроскопії інактивованої вакцини проти VZV

Аналізи ЕМ термічно оброблених і гамма-опромінених нефасованих препаратів і ліофілізованої вакцини проводили для одержання додаткової характеристики ефектів інактивації на інактивовані препарати VZV. Вибраний спосіб аналізу являв собою крио-просвічувальну електронну мікроскопію (крио-ПЕМ) в склоподібному льоді для кращого збереження цілісності вірусу при проведенні аналізу ЕМ. Кріо-ПЕМ проводили в Nanoimaging Services, Inc (San Diego, CA).

Для аналізу ЕМ одержували зразки інактивованого VZV для оцінки ефектів інактивації на цілісність частинки/зовнішнього вигляд. Ліофілізовані зразки регідратували 700 мкл стерильної дистильованої води і надалі не розбавляли до візуалізації. Зразки зберігали в тонкому шарі склоподібного льоду, закріпленого на 2,0×0,5 мкм C-Flat перфорованій вуглецевій плівці (Protochips, Inc., Raleigh, NC) на мідній сітці 400 меш. Безпосередньо перед використанням сітки очищали в пристрої Solarus plasma cleaner (10 секунд, 25 % O₂, 75 % Ar). Всі зразки одержували нанесенням краплі (≈3 мкл) суспензії зразка на сітку, очищену від плазми, промоканням фільтрувального паперу і безпосередньою обробкою осклюванням в рідкому етані з використанням пристрою FEI Vitrobot™ (4C, 95 % RH). Сітки зберігали в рідкому азоті до перенесення на електронний мікроскоп для візуалізації. Електронну мікроскопію проводили з використанням електронного мікроскопа FEI Tecnai™ T12 (FEI Company, Hillsboro, OR), працюючого при 120 кеВ, оснащеного камерою FEI Eagle™ 4K×4K CC (FEI Company). Зображення кожної сітки одержували в багаторазових масштабах для оцінки загального розподілу зразка. Після ідентифікації цільових областей для візуалізації при більш низьких збільшеннях одержували пари зображень при більш високому збільшенні.

Зразки оцінювали з використанням пристрою Nanoimaging Systems (збільшення 21K-52K). Порівнювали необроблений ліофілізований VZV, ліофілізований VZV, термічно оброблений протягом 77 діб при 56 °C, і ліофілізований VZV, опромінений при 25 або 50 кГр з використанням джерела ⁶⁰Co.

Результати кріо-ЕМ свідчать про потенційні ефекти частинок при високих дозах гамма-опромінення із зменшенням електронної густини (яка, можливо, відображає деградацію вірусної ДНК), але без достовірного ефекту на повну частинку і зовнішнього вигляду білка для ліофілізованих зразків. Проте, ліофілізація може захищати від таких змін, оскільки для ліофілізованих інактивованих зразків було показане зменшення електронної густини, але частинки залишалися інтактними при більш високих дозах (див. фігуру 4).

ПРИКЛАД 7

Визначення антигенної реактивності

Аналізи ELISA антигену VZV проводили для визначення вмісту антигенів (Ag) термічно або гамма-опромінених інактивованих зразків нефасованого препарату або гамма-опроміненого ліофілізованого VZV з використанням поліклональної сироватки людини і моноклональних антитіл (mAb) до gB, gH, gE VZV як детектуючих антитіл. Для гамма-опроміненого нефасованого препарату або ліофілізованих зразків не було виявлено змін в антигенній реактивності. Однак для зразків, термічно оброблених при 56 °C протягом 90 хвилин, була показана зміна в антигенній реактивності поліклональних антитіл і моноклональних антитіл до gE і gH.

Додаткові зразки нефасованого препарату VZV піддавали гамма-опроміненню при 25 кГр і 50 кГр для того, щоб підтвердити застосування 50 кГр як найбільш високого експонування для термінальної стерилізації. Ці зразки тестували аналізом неконкурентного ELISA антигену з поліклональною сироваткою проти VZV і mAb до gpE, gB і gH.

Гамма-опромінення ліофілізованої вакцини проти VZV в умовах стерилізації (25-50 кГр) не змінює на виявлюваному рівні ELISA-реактивність антигену поліклональної сироватки або моноклональних антитіл до gE або gB. Результати застосування mAb gH були непереконливими внаслідок високого фонового забарвлення. Підвищений фоновий сигнал з цим моноклональним антитілом (але не з моноклональними антитілами до gE або gB) також спостерігали з використанням іншого планшета ELISA (Maxisorp).

ПРИКЛАД 8

Імуногенність у мишей

Для оцінки набору інактивованих препаратів VZV (iVZV), одержаних різними способами інактивації, проводили дослідження імуногенності у мишей. Зразки сироватки, одержані в ході дослідження, оцінювали аналізом ELISA VZV для визначення відносного титру антитіл до VZV, індукованих різними інактивованими препаратами VZV. Одержували і оцінювали два різних нефасованих препарати VZV: (1) нефасований препарат VZV, термічно оброблений при 56 °C протягом 90 хвилин, і (2) нефасований препарат VZV, підданий гамма-опроміненню 5924,7 грей (Гр) протягом 3 годин. Також одержували і оцінювали два різних препарати ліофілізованої вакцини проти VZV: (1) ліофілізована вакцина проти VZV, термічно оброблена при 56 °C протягом 50 діб, і (2) ліофілізована вакцина проти VZV, піддана гамма-опроміненню 25000 Гр. Оцінювали нефасований препарат живого (необробленого) VZV і живу (необроблену) ліофілізовану вакцину проти VZV для порівняння з нефасованими препаратами iVZV.

Мишей BALB/c (n=16 для кожної групи) імунізували інтраперитонеально (i/p) 4,5 антигенними одиницями VZV Од/мишу (9 Од/мл) на 0, 14 і 29 добу. Кров (сироватку) збирали на добу -1 (до імунізації) і на 13, 28 і 43 добу. Сироватку 28 доби (14 діб після введення дози 2) оцінювали ELISA VZV на утворення IgG.

Наведені тири VZV (титр VZV мінус титр MRC-5) представлені на фігурі 5. Відібрану до імунізації сироватку тестували з відповідною групою на 28 добу для визначення порогового титру MRC-5 і VZV. Ямки планшетів для ELISA покривали УФ-обробленим VZV або екстрактом клітин MRC-5, а потім інкубували з розбавленою тестованою сироваткою мишей для визначення відносної кількості специфічних антитіл до VZV в сироватці мишей.

Результати демонструють, що титр IgG термічно обробленого нефасованого препарату був в середньому в 5,57 разу нижче (95 % CI=(3,45, 8,99)), і титр IgG обробленого гамма-опроміненням нефасованого препарату був в середньому в 2,43 разу нижче (95 % CI=(1,51, 3,93)) відносно необробленого нефасованого препарату. Термічно оброблений ліофілізований титр був в середньому в 1,38 разу нижче (95 % CI=(1,00, 1,90)), і оброблений гамма-опроміненням ліофілізований титр був в середньому в 1,66 разу нижче (95 % CI=(1,22, 2,26)), ніж необробленого ліофілізованого вірусу. Титр антитіл з обробленим гамма-опроміненням нефасованим препаратом був в середньому в 2,29 разу вище (95 % CI=(1,54, 3,41)), ніж титр, одержаний після імунізації термічно обробленим нефасованим препаратом. Титр антитіл з обробленим гамма-опроміненням ліофілізованим вірусом був в середньому в 1,20 разу нижче (95 % CI=(0,89, 1,61)), ніж титр, одержаний після імунізації термічно обробленим ліофілізованим

препаратом. Всі дані підтверджують, що гамма-опромінення ліофілізованого вірусу здійснює найменший вплив на імуногенність на цій моделі.

Результати демонструють, що утворення антитіл (IgG) у мишей було знижене після імунізації 2 дозами інактивованих препаратів в порівнянні з необробленими нефасованими препаратами.

ПРИКЛАД 9

Введення інактивованої вакцини проти VZV здоровим пацієнтам у віці 50-59 років

Оброблену гамма-опроміненням вакцину проти VZV вводили здоровим дорослим у віці від 50 до 59 років в мультицентровому рандомізованому подвійному сліпому дослідженні II фази, яке призначалося для оцінки безпеки, переносимості і імуногенності вакцини. Метою цього дослідження було дослідження безпеки, переносимості і імуногенності серії вакцин, інактивованих способами обробки гамма-опроміненням або термічної обробки.

У загальній складності групу з 161 здорового індивідуума у віці від 50 до 59 років розділяли у випадковому порядку 2:2:1 для одержання обробленої гамма-опроміненням вакцини проти VZV "А", інактивованої від 16 до 25 кГр (n=65), термічно обробленої вакцини проти VZV (n=63) або плацебо (n=33), що вводяться при 4-кратному режимі дозування. Кожну дозу вводили приблизно через 30 діб. Термічно оброблену вакцину і оброблену гамма-опроміненням вакцину "А" одержували з незалежних серій нефасованого препарату, але перевірених на однаковий вміст антигену.

Первинна гіпотеза полягала в тому, що оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV (А), інактивована при рівні від 16 до 25 кГр, буде викликати прийнятну специфічну до VZV імунну відповідь, як виміряно grELISA на 28 добу після введення дози 4. Допоміжна гіпотеза полягала в тому, що термічно оброблена вакцина проти VZV буде викликати прийнятну специфічну до VZV імунну відповідь, як виміряно grELISA на 28 добу після введення дози 4. Статистичний критерій сприятливого результату, відповідний нижній границі двостороннього 95 % довірчого інтервалу підвищення середнього геометричного (GMFR), в групі реципієнтів термічно обробленої вакцини проти VZV становить >1,0. Результати імуногенності реципієнтів вакцини в цьому дослідженні представлені на фігурі 6.

Результати демонструють, що сприятливі результати, що перевіряються первинною і додатковою гіпотезами, виконувалися, тобто оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV А і термічно оброблена вакцина VZV були імуногенними при введенні здоровим індивідуумам. Обидві групи вакцини мали показники безпеки, аналогічні таким, як в групі плацебо.

ПРИКЛАД 10

Введення серій вакцин проти VZV, інактивованих при різних рівнях гамма-опромінення, здоровим добровольцям у віці від 50 до 59

Друге дослідження проводили для одержання клінічних даних про серії вакцин, інактивованих при більш широких діапазонах гамма-опромінення. У цьому дослідженні в загальній складності 129 здорових індивідуумів у віці від 50 до 59 років випадковим чином розділяли 1:1 для введення обробленої гамма-опроміненням вакцини проти VZV "В", опроміненої при від 16 до 25 кГр (n=64), або обробленої гамма-опроміненням вакцини проти VZV "С", опроміненої при від 25 до 50 кГр (n=65), що вводяться при 4-кратному режимі дозування, де кожна дозу вводили приблизно через 30 діб. Серії вакцин В і С, які використовували в цьому дослідженні, одержували з аналогічної серії нефасованого препарату і аналогічного наповнення/складу ідентичного вмісту антигенів VZV, але інактивованих при різних рівнях гамма-опромінення.

Перша первинна гіпотеза цього дослідження полягала в тому, що оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV (С), інактивована при рівні від 25 до 50 кГр, викликає специфічну до VZV імунну відповідь, як grELISA, що визначається на 28 добу після введення дози 4. Друга первинна гіпотеза полягала в тому, що оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV (В), інактивована при рівні від 16 до 25 кГр і відповідного антигенного вмісту вакцини, інактивованої при від 25 до 50 кГр, викликає прийнятну специфічну до VZV імунну відповідь, як grELISA, що визначається на 28 добу після введення дози 4. Статистичний критерій сприятливого результату для кожної гіпотези, відповідний нижній границі двостороннього 95 % довірчого інтервалу GMFR, в групі реципієнтів обробленої гамма-опроміненням вакцини становить >1,0. Результати імуногенності реципієнтів вакцини в цьому дослідженні представлені на фігурі 7.

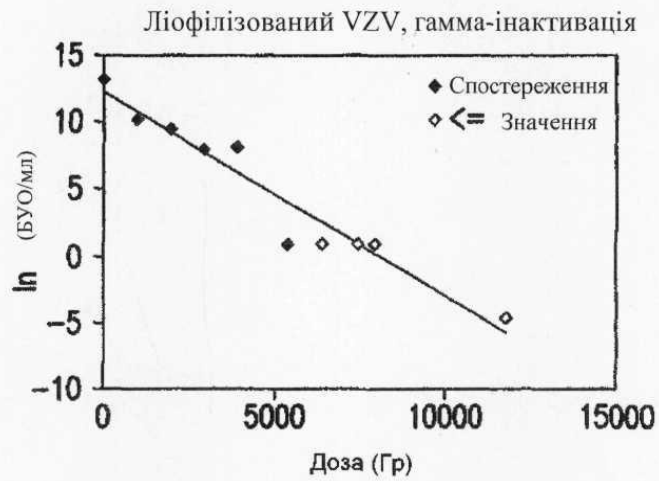
Результати даного дослідження демонструють, що сприятливі результати перевірюваних первинних гіпотез виконувалися, тобто оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV В (оброблена гамма-опроміненням при 16-25 кГр) і оброблена гамма-опроміненням вакцина проти

VZV С (оброблена гамма-опроміненням при 25-50 кГр) були імуногенними при введенні здоровим індивідуумам. Обидві групи вакцини мали аналогічні показники безпеки.

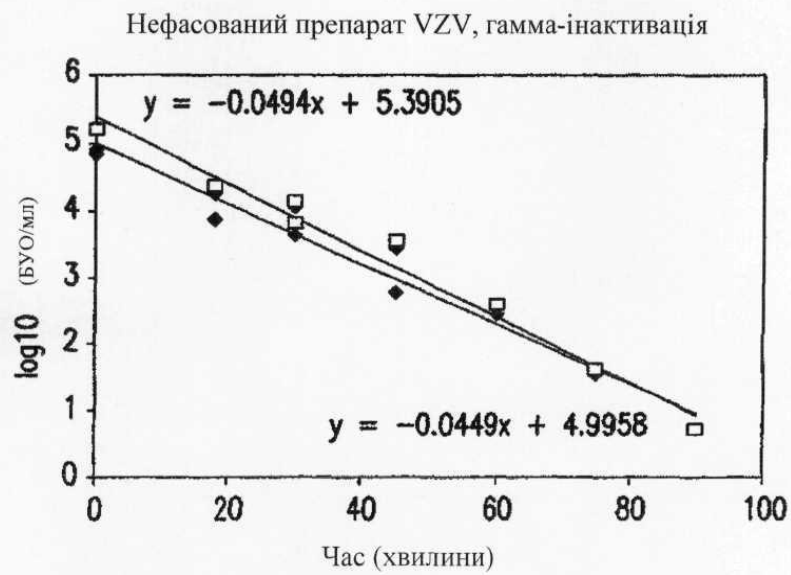
Результати даного дослідження також демонструють, що існувала нерівність фонового середнього геометричного титру (GMT), в групі В фоновий GMT складав ≈ 313 , в групі С фоновий GMT складав ≈ 429 . Хоч різниці в підвищенні не були значними, відмінності фонових титрів можна пояснити відмінностями підвищення, спостережуваними у випробуванні. Крім того, дані аналізу вказують на те, що більш висока доза гамма-опромінення (>25 кГр) викликає більш високу деградацію антигену.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

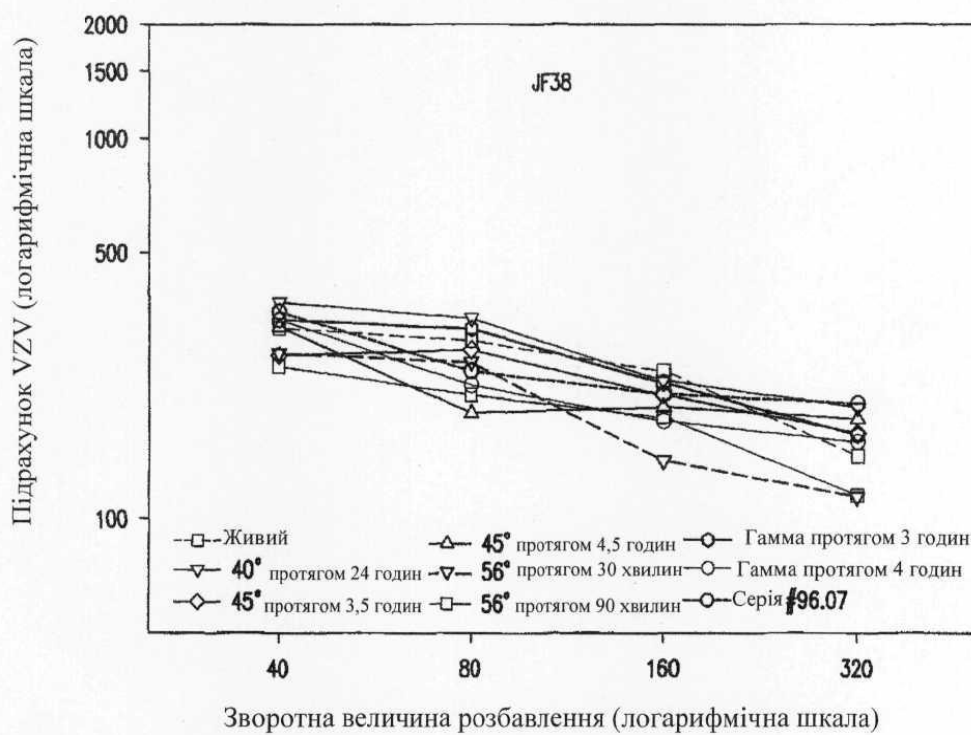
1. Інактивований вірус вітряної віспи (VZV), який підходить для введення пацієнту з ослабленим імунітетом у вакцині проти VZV, де VZV інактивований з використанням від 10 до 25 кГр гамма-опромінення, де інфекційність VZV складає $\leq 0,040$ бляшкоутворювальних одиниць (БУО)/мл.
2. Фармацевтична композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість VZV за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій.
3. Фармацевтична композиція за п. 2, де інфекційність інактивованого VZV складає $\leq 0,010$ бляшкоутворювальних одиниць (БУО)/мл.
4. Фармацевтична композиція за п. 2, де інфекційність інактивованого VZV складає $\leq 0,002$ бляшкоутворювальних одиниць (БУО)/мл.
5. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 2-3, де штам VZV являє собою штам Ока або похідне штаму Ока.
6. Фармацевтична композиція за п. 5, де композиція є ліофілізованою.
7. Фармацевтична композиція за п. 6, де імунна відповідь, яка викликається композицією, суттєво не відрізняється від імунної відповіді, яка викликається контрольним зразком, що містить аналогічну кількість неінактивованого VZV.
8. Фармацевтична композиція за п. 7, де імунна відповідь, що викликається інактивованим VZV, відрізняється від імунної відповіді, що викликається контрольним зразком, на 25 % або менше.
9. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 2-3, де інфекційність VZV визначають аналізом утворення бляшок вітряної віспи.
10. Спосіб одержання інактивованого вірусу вітряної віспи (VZV), який включає гамма-опромінення зразка, що містить VZV, із застосуванням від приблизно 10 кГр до приблизно 25 кГр гамма-опромінення.
11. Спосіб за п. 10, де гамма-опромінення зразка забезпечують експонуванням зразка ^{60}Co -випромінюванням.
12. Спосіб за п. 11, де VZV являє собою штам Ока або похідне штаму Ока.
13. Спосіб за п. 11, де зразок ліофілізують до опромінення.
14. Спосіб лікування оперізувального лишаю у пацієнта, який включає введення пацієнту фармацевтичної композиції, що містить терапевтично ефективну кількість інактивованого вірусу вітряної віспи (VZV), який має інфекційність $\leq 0,040$ бляшкоутворювальних одиниць (БУО)/мл, і фармацевтично прийнятний носій, де VZV інактивований з використанням від 10 до 25 кГр гамма-опромінення.
15. Спосіб за п. 14, де спосіб введення фармацевтичної композиції є підшкірним або внутрішньом'язовим.
16. Спосіб за п. 15, де вік пацієнта становить 50 років або більше.
17. Спосіб за п. 15 або 16, де пацієнт має ослаблений імунітет.
18. Спосіб за п. 17, де пацієнт має щонайменше один стан, вибраний з групи, що складається з: гематологічне злоякісне новоутворення, перенесена імуносупресивна терапія, перенесена трансплантація гематопоетичних стовбурових клітин, перенесена трансплантація цілого органа, інфікування ВІЛ і аутоімунне захворювання.
19. Спосіб за п. 15 або 16, де спосіб додатково включає очікування певної кількості часу і введення пацієнту однієї або більше доз фармацевтичної композиції.



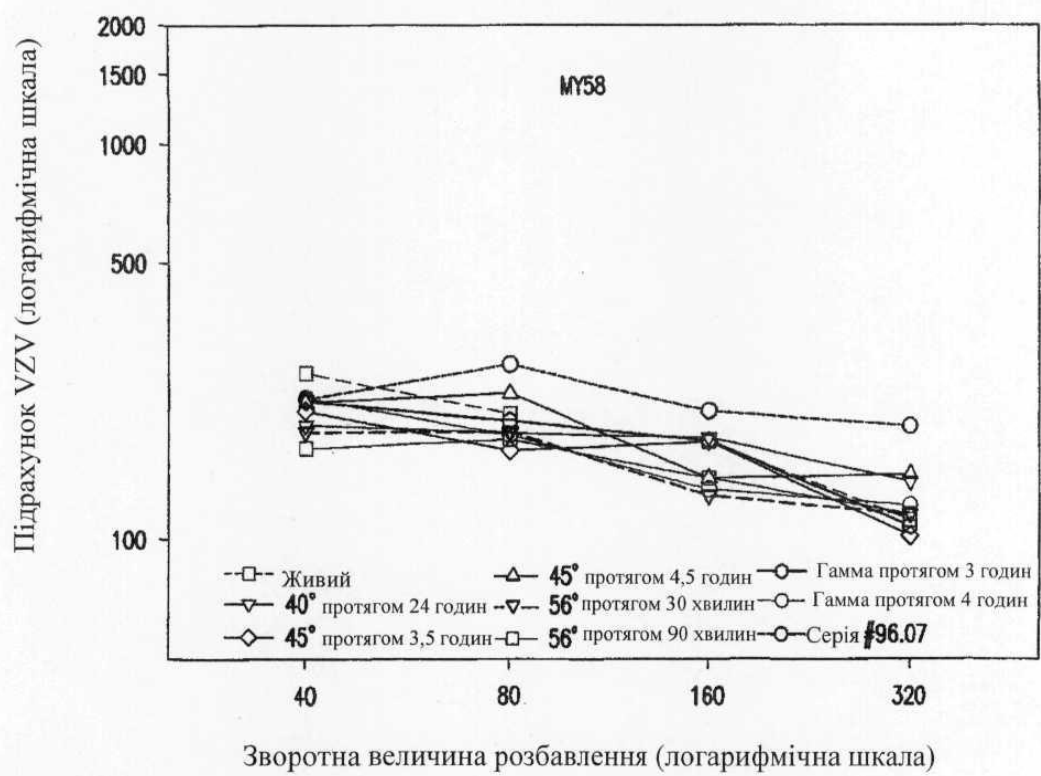
Фіг. 1



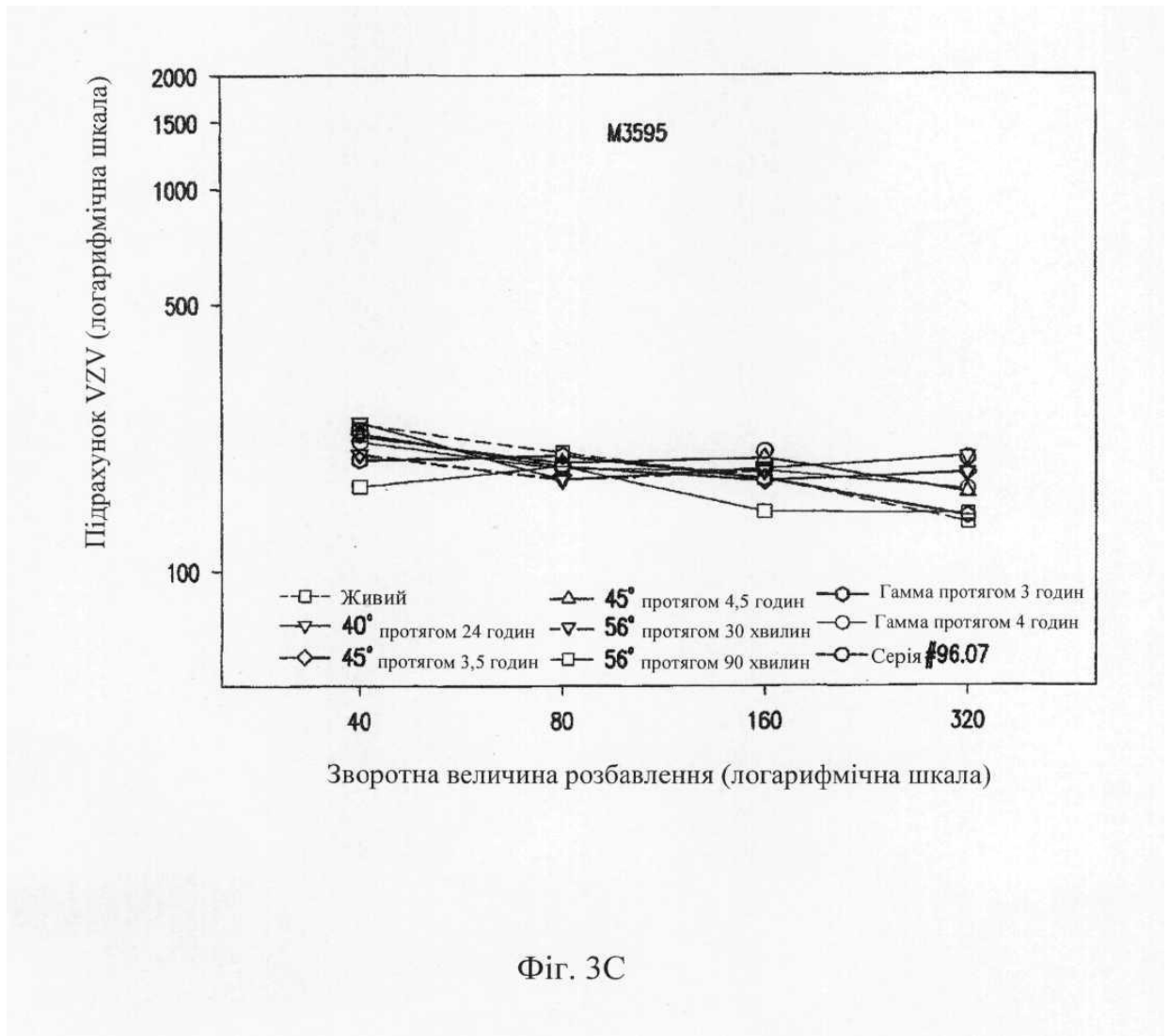
Фіг. 2

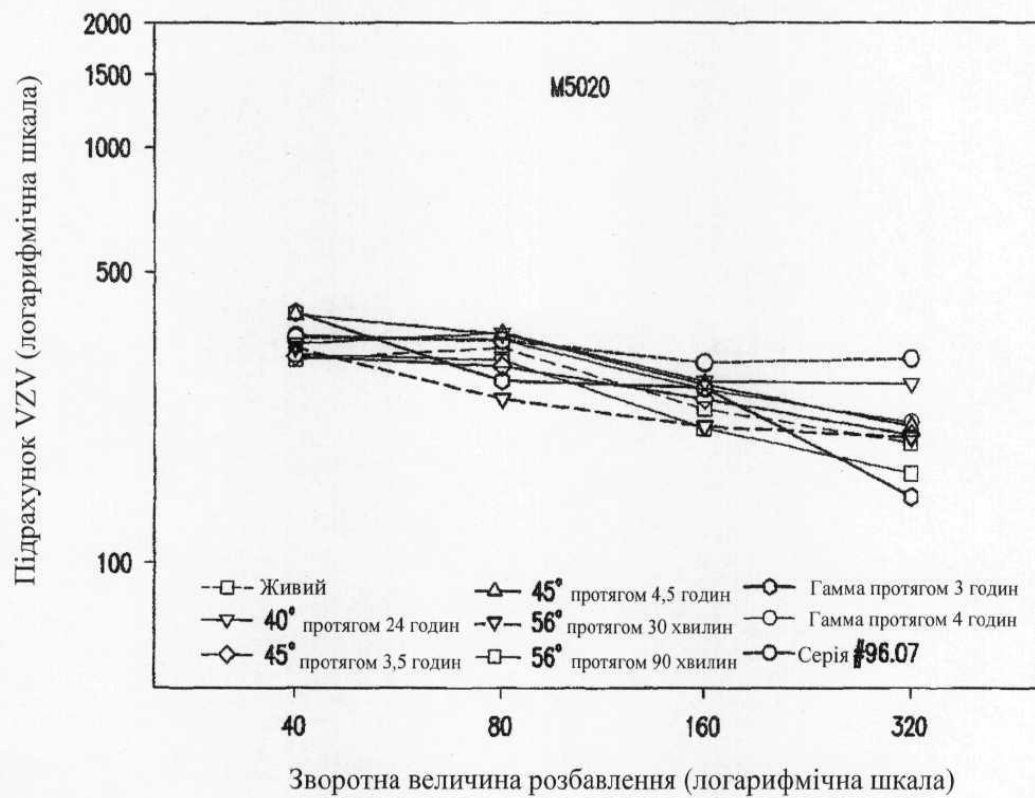


Фіг. 3А

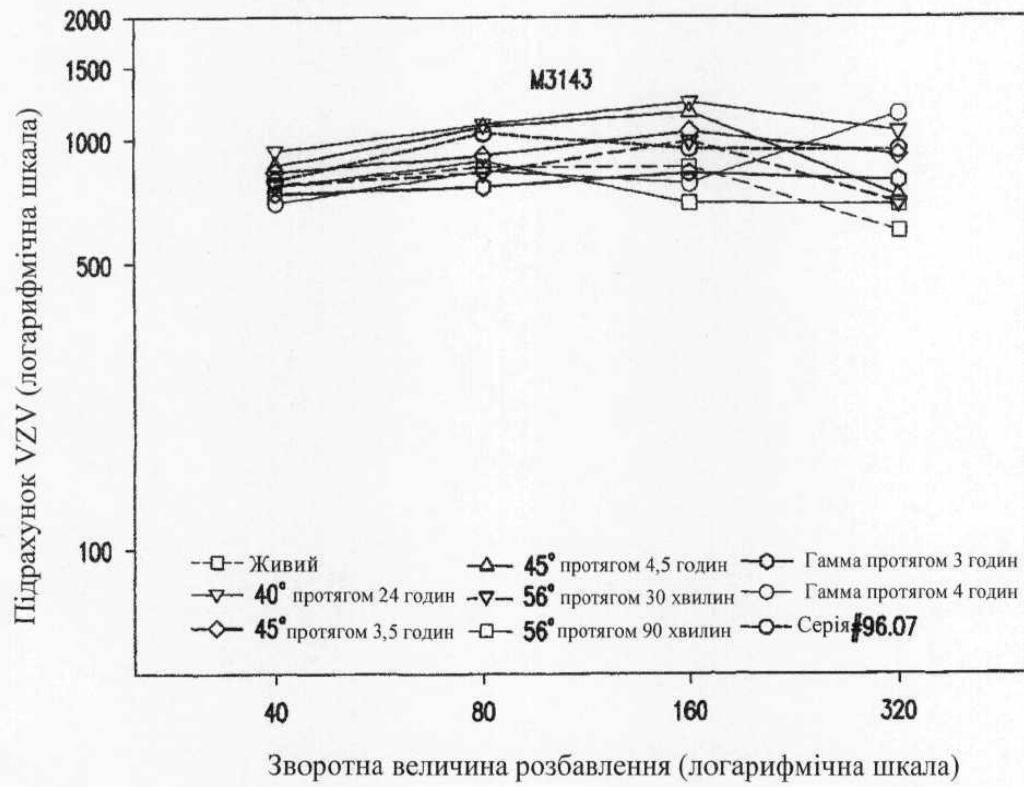


Фіг. 3В

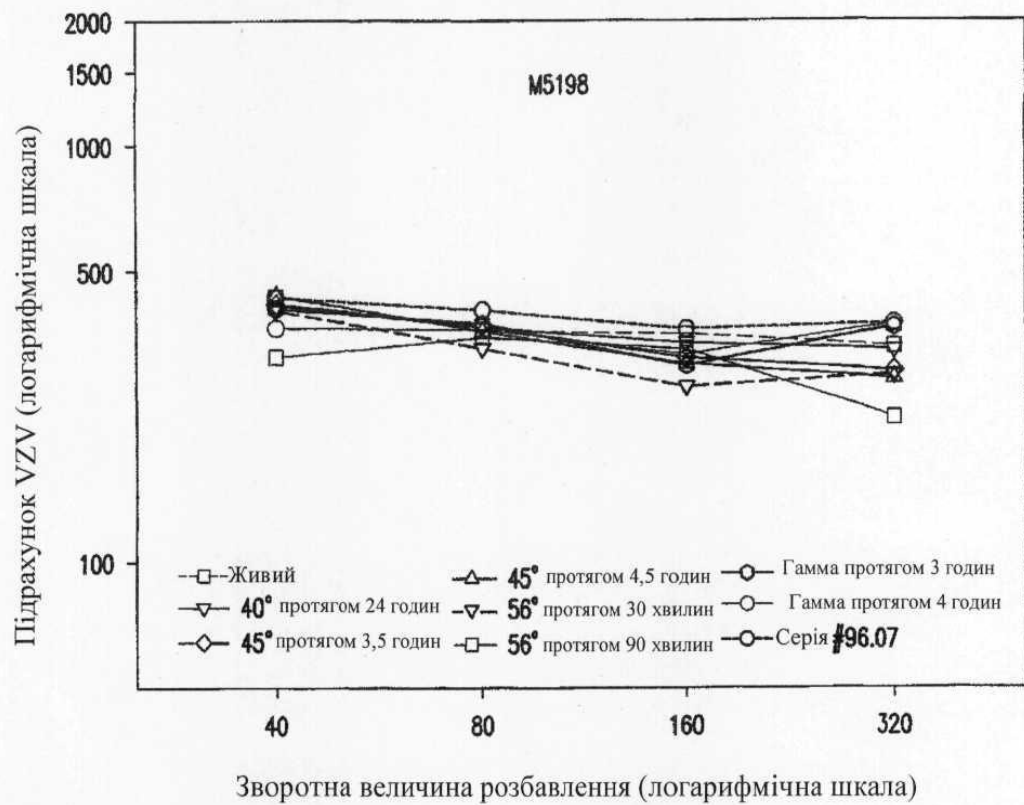




Фіг. 3D

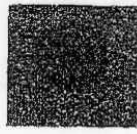


Фіг. 3Е

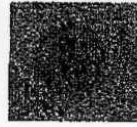


Фіг. 3F

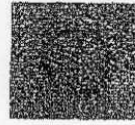
Аналіз кріо-ПЕМ ліофілізованого VZV



ФІГ. 4А

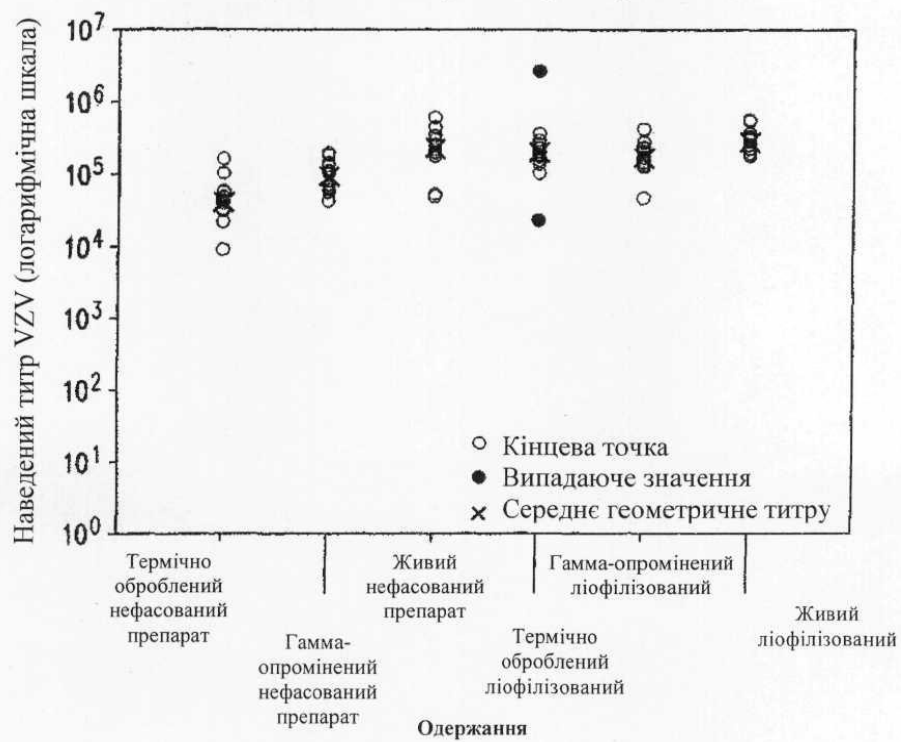


ФІГ. 4В



ФІГ. 4С

Наведений титр VZV при одержанні



Фіг. 5

КІНЦЕВА ТОЧКА	Термічно оброблена вакцина проти VZV (N=65)				Оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV A (N=63)			
	n	Передбачува- на відповідь t	(95% CI)†	p- значення	n	Передбачува- на відповідь t	(95% CI)†	p- значення
21-35 день після введення дози 1								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	62	484.36	(372.10, 630.47)		59	524.74	(410.80, 670.30)	
	62	1.67	(1.38, 2.03)		59	1.72	(1.48, 2.00)	
21-35 день після введення дози 2								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	62	560.77	(436.73, 720.04)		59	598.98	(474.93, 755.42)	
	62	1.94	(1.61, 2.34)		59	1.96	(1.62, 2.37)	
21-35 день після введення дози 3								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	62	585.72	(474.47, 723.06)		59	689.98	(543.82, 875.43)	
	62	2.02	(1.68, 2.43)		59	2.26	(1.89, 2.69)	
21-35 день після введення дози 4								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	62	608.67	(492.50, 752.25)		59	666.27	(532.81, 833.16)	
	62	2.10	(1.78, 2.48)	<0.0001	59	2.18	(1.82, 2.61)	<0.0001

† Обчислення основані на регресійній моделі даних тривалого спостереження (приведені до рівня імуногенності до вакцинації при наявності неповних даних) з візитом як коваріант. Модель окремо складали в кожній групі вакцини.

N = кількість вакцинованих індивідуумів в кожній групі.

n = кількість індивідуумів, що беруть участь в даному аналізі імуногенності (з обґрунтованими результатами на початковому рівні і моментах часу після вихідного).

gpELISA = імуносорбентний ферментний аналіз на основі глікопротеїнів.

GMT = середнє геометричне титру.

Фіг. 6

КІНЦЕВА ТОЧКА	Оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV B (N=64)				Оброблена гамма-опроміненням вакцина проти VZV A (N=65)			
	n	Передбачувана відповідь t	(95% CI)†	p-значення	n	Передбачувана відповідь t	(95% CI)†	p-значення
21-35 день після введення дози 1								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	59 59	599.04 1.91	(465.53, 770.84) (1.58, 2.32)		63 63	646.12 1.50	(507.55, 822.52) (1.29, 1.75)	
21-35 день після введення дози 2								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	59 59	638.49 2.04	(505.07, 807.15) (1.69, 2.46)		63 63	712.55 1.66	(571.77, 888.00) (1.44, 1.92)	
21-35 день після введення дози 3								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	59 59	566.13 1.81	(454.64, 704.95) (1.48, 2.21)		63 63	601.06 1.40	(483.71, 746.88) (1.21, 1.62)	
21-35 день після введення дози 4								
GMT підвищення середнього геометричного, день 1	59 59	594.03 1.90	(479.90, 735.32) (1.57, 2.29)	<0.0001	63 63	676.64 1.58	(544.98, 840.10) (1.35, 1.84)	<0.0001
† Обчислення основані на регресійній моделі даних тривалого спостереження (приведені до рівня імуногенності до вакцинації при наявності неповних даних) з візитом як коваріант. Модель окремо складали в кожній групі вакцин. N = кількість вакцинованих індивідумів в кожній групі. n = кількість індивідумів, що беруть участь в даному аналізі імуногенності (з обґрунтованими результатами на початковому рівні і моментах часу після вихідного). gpELISA = імуносорбентний ферментний аналіз на основі глікопротеїнів. GMT = геометричне середнє титру. CI = довірчий інтервал. VZV = вірус вітряної віспи.								

Фіг. 7

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601