



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 91044

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/15

A61K 47/12

A61K 47/26

A61P 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЖИВА ПОСЛАБЛЕНА РОТАВІРУСНА ВАКЦИНА ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

1

2

(21) a200708765

(22) 15.02.2006

(24) 25.06.2010

(86) PCT/EP2006/001442, 15.02.2006

(31) 0503337.8

(32) 17.02.2005

(33) GB

(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.

(72) ВАНДЕ ВЕЛЬДЕ ВІНСЕНТ, ВЕ

(73) ГЛАКСОСМІТКЛАЙН БАЙОЛОДЖІКАЛЗ С.А.,  
ВЕ

(56) WO 01/12797 A 22.02.2001

WO 02/11540 A 14.02.2002

(57) 1. Рідка ротавірусна імуногенна композиція, придатна для перорального призначення малюкам людини, що містить ротавірусний антиген, цукор та карбоксилат, де вказана композиція має рН приблизно 5,0-8,0 та містить менше 1мМ фосфату, де вказаний карбоксилат є похідним від дикарбонової кислоти з  $pK_a > 4$ .

2. Рідка композиція за п.1, де вказана композиція містить менше 0,1мМ фосфату.

3. Рідка композиція за будь-яким з пп.1, 2, де вказана композиція позбавлена фосфату.

4. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-3, де рН вказаної композиції приблизно 5,5-7,5.

5. Рідка композиція за п.4, де рН вказаної композиції приблизно 6,0-7,0.

6. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-5, де вказаний карбоксилат вибраний з групи, яку складають адипат, малат, сукцинат, малонат, глутарат, малеат, фумарат, тартрат та будь-яка комбінація з двох або більше зазначених карбоксилатів.

7. Рідка композиція за п.6, де вказаним карбоксилатом є адипат.

8. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-7, де вказаний карбоксилат присутній у концентрації приблизно 50мМ - 2М.

9. Рідка композиція за п.8, де вказаний карбоксилат присутній у концентрації приблизно 100мМ - 1М.

10. Рідка композиція за п.9, де вказаний карбоксилат присутній у концентрації приблизно 400мМ - 700мМ.

11. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-10, де вказаний цукор вибрано з групи: гліцерин, еритроза, еритріол, ксилітол, арабітол, рибоза, ксилітоза, арабіноза, глюкоза, тагалоza, маноза, галактоза, фруктоза, інозитол, сорбітол, манітол, галактитол, комбінація глюкози та фруктози, мальтоза, софороза, лактоза, целобіоза, мелібіоза, трегалоza, сахароза, палатиноза, мальтулоза, лактилоза, мальтитол, лактитол, рафіноза, мальтотріоза, мелезитоза, целотріоза, циритол, мальтотетраоза, стахіоза, целотетраоза, мальтопентаоза, целопентаоза, мальтогексаоза, целогексаоза, олігосахариди.

12. Рідка композиція за п.11, де вказаним цукром є сахароза або декстроза.

13. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-12, де концентрація вказаного цукру приблизно 1-70мас.%.  
14. Рідка композиція за п.13, де концентрація вказаного цукру приблизно 25-60мас.%.  
15. Рідка композиція за п.14, де концентрація вказаного цукру 50 або 55мас.%.  
16. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-15, що містить крім того карбонову кислоту.  
17. Рідка композиція за п.16, де вказану карбонову кислоту вибрано з групи: адипінова кислота, яблучна кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, карбонатна кислота, пропіонова кислота, масляна кислота, малінова кислота, глутарова кислота, малеїнова кислота, гліколева кислота, молочна кислота, глюконова кислота, фумарова кислота, винна кислота.  
18. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-17, що містить крім того іони кальцію.  
19. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-18, де вказаним ротавірусним антигеном є живий ротавірус, як-то живий послаблений ротавірус.  
20. Рідка композиція за 19, де вказаним живим послабленим ротавірусом є живий послаблений ротавірус людини.  
21. Рідка композиція за п.20, де вказаний живий послаблений ротавірус людини вибрано з групи: штам HRV 89-12C2, депонований під номером ATCC VR 2272, його потомство, реасортанти та

(13) C2

(11) 91044

(19) UA

імунологічно активні похідні; штам HRV P43, депонований під номером ЕКАСС 99081301, його потомство, реасортанти та імунологічно активні похідні.

22. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-21, де вказана композиція має антацидну здатність принаймні 8 хвилин, яку оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків.

23. Рідка композиція за п.22, де вказана композиція має антацидну здатність принаймні 12 хвилин, яку оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків.

24. Рідка композиція за п.22, де вказана композиція має антацидну здатність між 8 та 23 хвилинами, яку оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків.

25. Рідка композиція за п.24; де вказана композиція має антацидну здатність між 12 та 23 хвилинами, яку оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків.

26. Рідка композиція за п.23 або п.25, де вказана композиція має антацидну здатність між 12 та 20 хвилинами, яку оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків.

27. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-26, де вказана композиція є стабільною за принаймні одної з наступних умов: протягом 7 діб при 37°C, протягом одного року при 4°C, протягом двох років при 4°C.

28. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-27, котрою є вакцина.

29. Рідка композиція за будь-яким з пп.1-28, де вказану композицію запропоновано в об'ємі дози між 0,2 та 2,0мл.

30. Рідка композиція за п.29, де вказану композицію запропоновано в об'ємі дози між 0,5 та 1,5мл.

31. Рідка композиція за п.30, де вказану композицію запропоновано в об'ємі дози приблизно 1,5мл.

32. Спосіб попередження або лікування асоційованих з ротавірусом хвороб у людей застосовуванням до людини, яка цього потребує, ефективної кількості рідкої композиції за будь-яким з пп.1-31.

33. Спосіб за п.32 для попередження ротавірусної інфекції у людей.

34. Спосіб за п.32 для попередження ротавірусного гастроентериту у людей.

35. Спосіб за п.34 для попередження ротавірусного суворого гастроентериту у людей.

36. Спосіб за п.34 або 35, де вказаний гастроентерит або суворий гастроентерит викликано ротавірусним штамом відмінного серотипу відносно такого ротавірусного штаму, що міститься у вказаній рідкій композиції.

37. Спосіб за будь-яким з пп.32-36, де вказану композицію запропоновано в об'ємі дози між 0,2 та 2,0мл.

38. Спосіб за п.37, де вказану композицію запропоновано в об'ємі дози між 0,5 та 1,5мл.

39. Спосіб за п.37 або п.38, де вказану композицію запропоновано в об'ємі дози приблизно 1,5мл.

40. Спосіб отримання рідкої ротавірусної композиції за будь-яким з пп.1-31, що полягає у змішуванні ротавірусного антигену, цукру та карбоксилату з фармацевтично прийнятним розріджувачем.

Заявлений винахід стосується нових рідких ротавірусних композицій, що корисні як фармацевтичні композиції та вакцини, способу їх отримання та їх застосування у попередженні ротавірусу, зокрема асоційованих з ротавірусом хвороб людини.

Гостра інфекційна діарея є головною причиною хвороби та смерті у багато зонах світу. У країнах, що розвиваються, вплив діарейної хвороби є дуже суттєвим. Для Азії, Африки та Латинської Америки оцінено, що є 3-4 більйона випадків діареї кожного року та з цих випадків приблизно 5-10 мільйонів призводять до смерті (Walsh, J.A. et al.: N. Engl. J. Med., 301:967-974(1979)).

Ротавіруси визнані як одна з найбільш суттєвих причин суворої діареї у малюків та / молодших дітей (Estes, M. K. Rotaviruses and Their Replication in Fields Virology, Third Edition, edited by Fields et al., Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Оцінено, що ротавірусна хвороба є відповідною за зверх 600000 смертей щорічно. Індукована ротавірусом хвороба найбільш звичайно впливає на дітей між 6 та 24 місяці віку, а пік поширення хвороби загалом відбувається протягом холодніших місяців у помірного кліматі, та протягом усього року у тропічних зонах. Ротавіруси звичайно переходять від особи

до особи фекально-пероральним шляхом з інкубаційним періодом приблизно від 1 до 3 діб. На відміну від інфекції у 6-24-місячній віковій групі, новонароджені є загалом безсимптомними або мають тільки помірну хворобу. На відміну від суворої хвороби, з якою звичайно стикаються у молодших дітей, дорослі найбільше захищені в результаті попередньої ротавірусної інфекції таким чином найбільші інфекції у дорослих є помірними або безсимптомними (Offit, P.A. et al. Contr. Then, 8(8):21-26, 1982).

Ротавіруси сферичні, та їх назва є похідною від їх характерної зовнішньої та внутрішньої або двооболонкової капсидної структури. Звичайно, двооболонкова капсидна структура ротавірусу оточує внутрішню білкову оболонку або серцевину, що містить геном. Геном ротавірусу складається з 11 сегментів дволанцюгової РНК, котрі кодують принаймні 11 відмінних вірусних білків. Два з цих вірусних білків, позначені як VP4 (Р білок) та VP7 (G білок), є структурними білками, розташованими з зовнішнього боку двооболонкової капсидної структури. Внутрішній капсид ротавірусу представляє один білок, котрий є білком ротавірусу, позначеним VP6. Відносна важливість цих

трьох окремих білків ротавірусу у виявленні імунної реакції нижченаведеної ротавірусної інфекції не є поки ясною. Однак, VP6 білок визначає групу та підгрупу антигену, а VP4 та VP7 білки є детермінантами серотипової специфічності.

Для довідки, принаймні 14 серотипів ротавірусу G та 11 серотипів ротавірусу P ідентифіковано (Linhares A.C. & Bresse J.S., *Pan. Am. J. Publ. Health* 2000, 9, 305-330). Серед них 10 серотипів G та 6 серотипів P ідентифіковані серед ротавірусів людини.

VP7-білок є глікопротеїном 38000 MM (MM 34000, якщо неглікозилований), котрий є продуктом трансляції геномного сегменту 7, 8 або 9, залежно від штаму. Цей білок стимулює утворення головного нейтралізуючого антитіла після ротавірусної інфекції. VP4 білок є неглікозилованим білком приблизно 88000 MM, котрий є продуктом трансляції геномного сегменту 4. Цей білок також стимулює нейтралізуюче антитіло після ротавірусної інфекції. Оскільки білки VP4 та VP7 є вірусними білками, проти котрих нейтралізуючі антитіла спрямовані, вони, можна вважати, є основними кандидатами для розробки ротавірусних вакцин, даючи захист від ротавірусної хвороби.

Природна рота вірусна інфекція протягом раннього дитинства викликає захисну імуногенність.

Початкова розробка вакцин для попередження ротавірусних інфекцій почалася у 1970-х після відкриття вірусу. Спочатку, досліджували послаблені штами від тварин та людей, а пізніше спроби були сфокусовані на реасортантах людини-тварини.

Розробка нових ротавірусних композицій повинна погоджуватися з рядом потреб, охоплюючи всесвітнє поширення потенціалу та стабільності у широких межах умов докільля та зберігання. Зокрема, стабільність композиції, особливо фармацевтичної або вакцинної композиції, загалом є кращою при нижчих температурах порівняно з кімнатною або вищою температурою.

Тому один спосіб стабілізації застосовано для розробки вакцинних композицій, що можна зберігати замороженими (-20°C - -70°C) або альтернативно для розробки ліофілізованої вакцини, що можна витримувати протягом подовженого періоду часу приблизно при температурі холодильника (2°C-8°C). Однак, відомий факт, що спосіб ліофілізації має обмежену продуктивність та асоційований з високою вартістю продукції. Крім того ліофілізовані вакцини мають більше складностей для застосування, оскільки вони можуть потребувати більшої складності, звідси відносно кошовних пристроїв, як-то багатокамерні ампули для вакцини, з активним інгредієнтом в одній камері та рідкого розріджувачу у ще одній камері. Ліофілізовані вакцини також асоційовані з вищою вартістю транспортування та зберігання. Ці альтернативи можуть бути неадекватними для деяких країн у світі, що розвиваються, де пристрій для застосування повинен бути фінансово можливим, та де наявність інфраструктури для отримання та зберігання може бути неіснуючою або ненадійною.

Оскільки ротавірус звичайно застосовують перорально малюкам людини, цей шлях приносить кілька викликів стосовно імуногенної ротавірусної композиції.

Ротавірус швидко інактивується у кислотному середовищі, при дії кислотного буферу або кислотного шлункового соку, наприклад, (C. Weiss та H.F. Clark, 1985, *J. Gen. Virol.*, 66, 2725- 2730; T. Vesikari et al., 1984, *The Lancet*, page 700; R.H.Foster та A.J.Wagstaff, 1998, *BioDrugs Feb*: 9(2) 155-178). Тому бажано створювати ротавірусні композиції таким чином, щоб вони були стабільні при зберіганні та після застосування реципієнтом.

Ротавірусні вакцини головним чином призначені для застосування до немовлят у віці 4 тижні. Невеликий об'єм дози вакцини, як-то нижче 2мл або навіть 1,5мл, буде сприятливим для цієї популяції. Тому, бажано створювати ротавірусні композиції у невеликому об'ємі дози.

Стабілізуючі композиції для рідкої вірусної вакцини відомі. Наприклад, EP 0 065 905 загалом розкриває стабілізуючі композиції, придатні для серії вірусів, як-то композиції, викликаючи кір або грип, та зокрема розкриває стабілізуючий фосфатний буфер, що містить розчини, придатні для живого послабленого вірусу.

Інші стабілізуючі композиції розкриті у WO 98/13065 та у Clark et al. (*Pediatr Infect Dis J.* 2003 Oct; 22(10):914-20). Такі композиції також потребують, серед інших складових, присутність фосфату як буферуючого засобу для нейтралізації шлункової кислотності. Ці композиції однак не сумісні з вищенаведеними потребами для успішної розробки ротавірусної композиції, особливо вони є не сумісні зі зменшенням об'ємом дози вакцини, що є найпридатнішим для малюка людини. Зокрема, винахідником виявлено, що адаптування цієї композиції рівня техніки у тару малого об'єму, як-то 1,5мл або нижче, підтримуючи ефективну антагоністичну здатність, призводить до проблем від надмірної концентрації складових композиції, зокрема фосфатного буферу.

Тому є потреба у розробці альтернативної ротавірусної композиції, зокрема альтернативної рідкої композиції, що може протистояти шлунковій кислотності, та є стабільною у холодильнику, незважаючи на відсутність фосфату. На додаток, є потреба у тому, щоб такі альтернативні композиції бути також успішно створені в об'ємі дози вакцини настільки невеликий, як можливо.

Тому заявлений винахід не тільки стосується альтернативної стабільної імуногенної композиції без фосфату або тільки з мінімальними кількостями фосфату, але яка також дає змогу ротавірусу бути створеним у малому об'ємі дози, придатному для перорального застосування до малюків людини.

Фіг.1 - Стандарти криві кислотно-основного титрування для чотирьох карбоксилатів

Фіг.2A - Антацидна здатність різних композицій з вмістом адипату

Фіг.2B - Експериментальна структура дослідження Россетта-Райса малюків

Фіг.3 - Індекс рефракції композицій з вмістом адипату.

Фіг.3А показує, що на стадії адипатного буферу цільовим значенням є 58,5мас.% сахарози, що дає індекс рефракції 1,4578 у суміш.

Фіг.3В показує, що на кінцевому етапі цільової композиції є 55мас.% сахарози, що призводить до індексу рефракції 1,4480.

Фіг.4 - Огляд фази II схеми клінічного дослідження.

Відповідно, згідно з першим аспектом заявленого винаходу, запропоновано рідку ротавірусну імуногенну композицію, котра є придатною для перорального застосування для малюка людини, що містить ротавірусний антиген, цукор та карбоксилат, де вказана композиція має рН між приблизно рН5,0 та приблизно рН8,0 та містить менше 5мМ фосфату. Відповідним чином концентрація фосфату у заявленій композиції не перевищує 1мМ.

Згідно з особливим аспектом винаходу, придатною дозою вакцини звичайно буде 1,5мл або будь-який об'єм менше 2,5мл, як-то об'єм 2мл або менш, що є придатним для перорального застосування до немовлят або малюків. Зокрема об'єм дози буде таким, щоб була можливою технічна здійсненність композиції і не було шкідливого впливу на імуногенний потенціал композиції. Заявлена композиції надає переваг над композиціями рівня техніки з вмістом фосфату тим, що вони можуть протистояти шлунковій кислотності, залишаючи імуногенність та стабільність протягом довгого строку збереження, в той час будучи сумісними з композицією у об'ємі дози менше звичайного, як-то менше 2,0мл або навіть сумісними з об'ємом дози 1,5мл або менше.

В особливому втіленні, рідка імуногенна композиція згідно з винаходом має антацидну здатність 6-23 хвилин як показано дослідженням Россетта-Райса малюків (адаптованим, як деталізовано у прикладі III,2,2 від лужного тесту Россетта-Райса). Відповідним чином антацидна здатність буде принаймні 8 хвилин, звичайно принаймні 12 хвилин, а придатні межі між 12 та 20 хвилин. Несподівано, заявлені композиції показали не тільки прийнятну, але вищу антацидну здатність навіть у меншому об'ємі дози, порівняно з композиціями рівня техніки з вмістом фосфату.

Згідно з ще одним аспектом, запропоновано спосіб отримання вказаної рідкої ротавірусної імуногенної композиції, що полягає у змішуванні ротавірусного антигену, цукру та карбоксилату з фармацевтично прийнятним розріджувачем.

Винахід також стосується згідно з ще одним аспектом застосування ротавірусного антигену у суміші з карбоксилатом та цукром для вироблення пероральної імуногенної композиції для попередження або лікування асоційованих з ротавірусом хвороб у людей, де вказана композиція не містить більше 5мМ фосфату та має рН між приблизно рН5,0 та приблизно рН8,0.

Згідно з ще одним наступним аспектом винахід стосується способу лікування або попередження асоційованих з ротавірусом хвороб у людей застосуванням до людини, яка цього потребує, ефективною кількістю вказаної рідкої імуногенної композиції.

Інші аспекти та переваги заявленого винаходу описані далі у наступному детальному описі його кращих втілень. Винахідником розроблено нові рідкі ротавірусні композиції, що є імуногенними, стабільними при температурі холодильника (між 2 та 7°C, звичайно при 4°C), можуть протистояти кислоті шлунка, при пероральному застосуванні та сумісні з невеликим об'ємом дози.

Рідка композиція означає композицію у текучій формі, як протилежно сухій формі, об'єм якої є фіксований при постійних конкретних умовах (наприклад, при кімнатній температурі або при температурі холодильника, при атмосферному тиску) та чітку форму визначає тара.

Предмет обговорення та інформація розкриті у публікаціях та патентах або патентних заявках, згаданих у цьому описі і уведених тут як посилання.

Терміни 'містять' та 'містить' можуть бути як варіант, заміщені термінами 'складається з', та 'складаються з', відповідно, у кожному випадку.

Заявлений винахід стосується рідкої ротавірусної імуногенної композиції, що містить ротавірусний антиген, цукор та карбоксилат, де вказана композиція має рН між приблизно рН5,0 та приблизно рН8,0 та містить менше 5мМ фосфату. Композиції винаходу показують дуже гарний профіль стабільності, при порівнянні з композиціями з вмістом фосфату, у той же час підтримуючи профіль імуногенності. Ці композиції принаймні такі ж стабільні, як їх подоби з вмістом фосфату. Наступна перевага заявлених композицій у тому, що їх можна отримати у невеликому об'ємі дози, як-то нижче 2,0мл, звичайно 1,5мл, наприклад, порівняно з композиціями рівня техніки, у котрих присутній фосфат.

В особливому втіленні концентрація фосфату в імуногенній композиції не перевищує 5мМ, відповідним чином 1мМ, зокрема не перевищує 0,5мМ. Фосфат - це сіль фосфатної кислоти (також відомої як ортофосфатна кислота ( $H_3PO_4$ )), звичайно застосовують солі натрію або калію чи змішані солі натрію та калію (наприклад:  $Na_3PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $K_3PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ). Відповідним чином, концентрація фосфату є 0,4мМ або нижче, звичайно 0,2мМ або нижче, ідеально 0,1мМ або нижче. У ще одному особливому втіленні композиція, яку заявлено тут, позбавлена від фосфату. Звичайно фосфат, при наявності, поступає з середовища клітинних культур або сольового буферу, застосовуваного як розріджувач, як-то DMEM (модифіковане Дульбекко середовище Ігла), основне BME-середовище Ігла або буферований фосфатом фізіологічний розчин.

Концентрація фосфату, до котрої це стосується в описі, слід розраховувати за кількістю фосфату з вмістом хімікатів в отриманні заявленої композиції. Альтернативно, концентрацію фосфату, наявну у композиції, яку заявлено тут, можна вимірювати експериментально, застосовуючи звичайні аналітичні способи.

Одним придатним способом є колориметричне дослідження, назване 'Nanocolor' від Macherey-Nagel (№ за каталогом 918 78). Цей спосіб є на основі фотометричного визначення жовтого ком-

плекс, утвореного фосфатною кислотою-молібдатом-ванадатом у кислому розчині. Обмеження кількісного аналізу є 2мкг/мл фосфату або 0,02мМ.

Альтернативним способом є дозування фосфору (Р) атомною емісійною спектроскопією, як-то сполучена з плазмою атомна емісійна спектроскопія (ICP-AES) (Boss & Fredeen, in Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, Perkin Elmer eds, second edition, 1997 - дивись Методологію на стор. 72 далі). Обмеження кількісного аналізу є 0,030мкг/мл фосфору відповідно концентрації фосфату 0,00032мМ.

В одному втіленні рН композиції є між рН5,0 та рН8,0. У ще одному особливому втіленні рН заявленої композиції є між приблизно рН5,5-рН7,5. 'Приблизний рН' означає в межах 0,2 одиниці встановленої величини рН. Зокрема, рН композиції є між рН5,5 та рН7,5. Наприклад, рН композиції є між приблизно рН6,0-рН7,0, зокрема між рН6,0 та рН7,0, звичайно між рН6,2 та рН6,8 або між рН6,2 та рН6,6. Розглянуто рН приблизно 6,4, зокрема 6,4. Відомо, що на ротавірус негативно впливає кислотний рН, як-то рН нижче 4,0, та слід очікувати максимум стабільності при нейтральному або навіть слабо лужному рН, тобто межах рН7,0-8,0, котрі отримані, наприклад, у буферованій фосфатом композиції рівня техніки. Як показано в експериментальному розділі, композиції винаходу, незважаючи на відсутність фосфату, показали гарний профіль стабільності у заявлених межах рН, та крім того мають несподівано прийнятний профіль стабільності та імуногенності навіть у помірно кислотних умовах, тобто приблизно рН6,0-7,0, як-то при рН приблизно 6,4, наприклад.

Рідка композиція, яку заявлено тут, містить карбоксилат.

Карбоксилат ( $-\text{COO}^-$ ) є дисоційованою формою карбонової кислоти, утвореною нейтралізацією кислотної функціональної групи ( $-\text{COOH}$ ) лужною речовиною. Карбоновою кислотою є сполука, що містить карбоксил:  $-\text{COOH}$ ; котрий є формально поєднанням карбонілу ( $-\text{CO}-$ ) та гідроксиду ( $-\text{OH}$ ). Однак, взаємодія між ними таким чином модифікує їх хімічні властивості, що суцільну групу розглядають як нову функцію з характерними властивостями (Organic Chemistry, J. B. Hendrickson, D.J. Cram, та G. S. Hammond, McGraw-Hill Book Company, third edition 1970 page 131). Хоча Міжнародний союз чистої та прикладної хімії (IUPAC) рекомендує до застосування номенклатуру алканових кислот (для монокарбонових кислот) та алкандіонових кислот (для дикарбонових кислот), у цьому тексті застосовано більшість тривіальних назв карбонових кислот, оскільки ці продукти добре відомі спеціалісту. Наприклад, назва IUPAC оцтової кислоти є етанова кислота, а для адипінової кислоти - гександіонова кислота.

В особливому втіленні, застосовують карбоксилатну сіль неорганічної кислоти або, відповідним чином, органічної кислоти. В особливому втіленні, вказаний карбоксилат є похідним слабкої кислоти. Наприклад, вказаний карбоксилат є карбоксилатною сіллю, вибраною з групи: адипат, цитрат, малат, ацетат, сукцинат, пропіонат, бутират, малонат, глутарат, малеат, гліколят, лактат, глюкго-глюкгоконат, фумарат, тартрат, пімелат та будь-яка їх комбінація. Придатними карбоксилатами є карбоксилати, похідні від карбонової кислоти з  $\text{pK}_a$  більше 4 або карбоксилати, похідні від ді- або три-карбонової кислоти (ді- або три-карбоксилати) з середнім  $\text{pK}_a$  більше 4 (Таблиця 9). Приклади попереднього класу охоплюють карбоксилати, похідні від пропінової, масляної та оцтової кислот. Приклади останнього класу охоплюють карбоксилати, похідні від лимонної, малеїнової, маленової, бурштинової, адипінової, глутарової та яблучної кислот.

В особливому втіленні вказаний карбоксилат належить до переліку GRAS, тобто карбоксилатів, що загалом визнані у США як безпечні для застосування у їжі та ліках, та вибрані з переліку, що містить ацетат, пропіонат, малат, глутарат, адипат, лактат, фумарат та тартрат. Відповідним чином карбоксилат є сіллю адипінової кислоти, тобто мононатрієвою сіллю адипінової кислоти, монокалієвою сіллю адипінової кислоти, відповідним чином динатрій адипатом або дикалій адипатом, або кальцій адипатом.

В особливому втіленні, концентрація карбоксилату між 50мМ до 2М є відповідно застосовуваною у рідкій ротавірусній композиції. Ясно, що концентрація карбоксилату у вищезгаданих межах може бути відповідно адаптованою звичайним експериментом згідно з природою карбоксилату, антацидною здатністю, що треба досягти, та об'єму дози вакцини. Наприклад, концентрації карбоксилату вище 1 М можна застосовувати, при потребі високого антацидного потенціалу, як-то вище 8 хвилин, відповідно вище 10 хвилин, або вище 12 хвилин як оцінено тестом Россетта-Райса малюків для об'єму дози 1,5мл. Концентрації 1М або нижче є звичайно застосовуваними, як-то концентрації між 100мМ та 1М, звичайно концентрації між 200мМ та 800мМ. Придатні концентрації карбоксилату є між приблизно 300мМ та приблизно 800мМ, відповідно між 400мМ та 700мМ. Зокрема, коли карбоксилат є адипатом, придатною концентрацією є 400-500мМ. Однак, спеціалісту ясно, що концентрації 10-20 процентів встановленої величини можуть бути доречними, тобто, коли встановлено 100мМ, межі 80-90мМ-110-120мМ є також розкриті та охоплені. Ілюстративні концентрації надані у нижченаведеній таблиці 1 для різних карбоксилатів.

Таблиця 1

Антацидна здатність карбоксилатів при певній концентрації  
Ці ілюстративні параметри надані для  
об'єму дози 1,5мл та відповідають згаданому номеру прикладу у таблиці 1

Карбоксилат (Мм)	Концентрація карбоксилату (М)	pH у PPM при t=0	Антацидна здатність (хвилин)*	№ зразку у прикладі II
Адипат (144)	0,372	6,38	8	91
Адипат (144)	0,465	6,24	12	92
Адипат (144)	0,548	6,50	16	93
Адипат (144)	0,652	6,11	20	94
D,L-малат (132)	0,621	6,15	8	72
D,L-малат (132)	0,746	6,08	12	64
D,L-малат (132)	0,895	5,35	15	77
Ацетат (59)	1,000	6,14	12	89
Цитрат (189)	0,441	6,55	12	129

\*оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2

pH рідкої ротавірусної імуногенної композиції, яку заявлено тут, можна отримувати змішуванням карбонової кислоти та карбоксилату. Зокрема, карбонову кислоту можна застосовувати у суміші з відмінним карбоксилатом, наприклад, цитрат поєднують з адипіновою кислотою. Це може бути сприятливим при застосуванні комерційно доступних хімікатів, деякі з яких можуть не бути легко доступними, або для спрощення. Наприклад, одну (або більше) з вказаних карбонових кислот можна вибрати з групи: адипінова кислота, лимонна кислота, яблучна кислота, оцтова кислота, бурштинова кислота, карбонатна кислота, пропіонова кислота, масляна кислота, малінова кислота, глутарова кислота, малеїнова кислота, гліколева кислота, молочна кислота, глюконова кислота, фумарова кислота, винна кислота, пімелінова кислота, та змішувати у придатній пропорції з одним (або більше) карбоксилатами, вибраними з групи: адипат, цитрат, малат, ацетат, сукцинат, прогіонат, бутират, малонат, глутарат, малеат, гліколят, лактат, глюкглуконат, фумарат, тартрат, пімелат.

Рідка композиція, яку заявлено тут, містить цукор. Сахароза є особливо придатною. Декстроза є ще одним придатним цукром. Інші цукри або цукрові спирти можна також застосовувати замість сахарози або декстрази, наприклад: гліцерин, еритрозу, еритриол, ксилітол, арабітол, рибозу, ксилозу, арабінозу, глюкозу, тагалоу, манозу, галактозу, фруктозу, інозитол, сорбітол, манітол, галактитол, суміш глюкози та фруктози, мальтозу, софорозу, лактозу, целобіозу, мелібіозу, трегалоу, сахарозу, палатинозу, мальтулозу, лактилозу, мальтитол, лактитол, рафінозу, мальтотриозу, мелезитозу, целотриозу, циритол, мальтотетраозу, стахіозу, целотетраозу, мальтопентаозу, целопентаозу, мальтогексаозу, целогексаозу, олігосахариди.

Звичайні концентрації цукру приблизно від 1мас.% до 70мас.%, наприклад, приблизно від 25мас.% до 60мас.%. Спеціалісту, однак, ясно, що природу та концентрацію цукру слід оптимізувати так, щоб гарантувати задовільну вірусну життєзда-

тність, підтримуючи у той же час в'язкість на рівні, що є сумісним з нижченаведеними етапами процесу створення композиції, як-то фільтрування. В особливому втіленні застосовують сахарозу. Звичайно, її концентрацію підтримують при мінімум 30мас.%. Вищі, тобто вище 30мас.%, концентрації сахарози можна крім того застосовувати для гарантування довгого терміну зберігання, оскільки очікують, що високий ізоосмотичний тиск таких композицій попереджуватиме бактеріальний ріст. Відповідно, нижче обмеження концентрації сахарози у рідких композиціях, які заявлено тут, є відповідно 30мас.% або вище, як-то 35мас.% або вище, відповідно 40мас.% або вище. Придатна концентрація сахарози приблизно від 40мас.% до 70мас.%. Наприклад, придатна концентрація сахарози буде між 45мас.% та 60мас.%, відповідно між 50мас.% та 55мас.%. Зокрема, застосовують сахарозу при концентрації приблизно 50мас.% або приблизно 55мас.%. Кінцеві концентрації сахарози 50мас.% або 55мас.% придатні.

Спеціалісту ясно, що звичайну оптимізацію концентрації цукру можна проводити для гарантування вірусної стабільності, коли ще один цукор замінює сахарозу.

Крім того встановлені величини для цукрів можуть бути трохи адаптовані для узгодження з параметрами композиції/вироблення, як-то об'єм дози. Тому, спеціалісту ясно, що концентрації у межах 10% встановленої величини можуть бути доречні, тобто, коли встановлено 50мас.%, межі 45мас.%-55мас.% також розкриті та охоплені.

Рідка ротавірусна імуногенна композиція заявленого винаходу також містить ротавірусний антиген. Зокрема рідка композиція, яку заявлено тут, є імуногенною композицією, наприклад, вакциною композицією. Ротавірусний антиген означає будь-який ротавірусний антиген, що є придатним для застосування у вакцинній композиції. Пероральні живі ротавірусні антигени розглянуті особливо. Наприклад, будь-як придатний ротавірусний антиген можна вибрати з групи: живий послаблений ротавірус від тварин або людей, зокрема живий

послаблений ротавірус людини; реасортантний ротавірус, зокрема, але без обмеження реасортантний ротавірус людини-людини, реасортантний ротавірус корови-людини або реасортантний ротавірус макаки резус-людини.

Усі ротавірусні штами, штами людини або тварини, розглянуті у заявленому винаході. Ротавірусні штами людини придатні. Зокрема, ротавірусним антигеном є в одному втіленні послаблена популяція ротавірусу людини, що містить єдиний варіант або по суті єдиний варіант, вказаний варіант визначено нуклеотидною послідовністю, що кодує принаймні один з головних вірусних білків, позначений як VP4 та VP7, як розкрито у WO 01/12797, зокрема будь-який, охоплюючий один або більше з варіантів, позначених мутаціями, представленими у таблицях 2, 3,1 та 3,2 of WO 01/12797. В особливих втіленнях, ротавірусний антиген є будь-яким з таких живих послаблених ротавірусних штамів людини: штаму HRV 89-12C2, депонованого під номером ATCC VR 2272 (як описано у EP 0 557 427), його потомства, реасортантів та імунологічно активних похідних; штаму HRV P43, депонованого під номером ЕКАСС 99081301 (як описано у WO 01/12797), його потомства, реасортантів та імунологічно активних похідних.

Ротавірусні популяції, що мають характеристики будь-якого з вищезгаданих депонованих штамів є також придатними вакцинними штамами. Похідні від вказаних депонованих штамів можна отримувати піддаванням вказаних штамів наступній обробці, як-то їх розмноженням з наступним пасажуванням, тонуванням або іншими способами, застосовуючи живий вірус, або модифікуванням вказаних депонованих штамів будь-яким шляхом, охоплюючи способи генної інженерії або реасортантні способи. Такі етапи та способи добре відомі у рівні техніки. Ротавірусними антигенами особливого інтересу є потомство будь-якого з вказаних депонованих штамів та їх імунологічно активних похідних. Імунологічно активні похідні - це матеріали, отримані з будь-якого з депонованих штамів, зокрема штаму HRV P43, депонованого під номером ЕКАСС 99081301, особливо антигени вірусу, котрі здатні виявляти імунну реакцію, що є реактивною проти ротавірусу, при ін'єкції у хазяїна-тварину.

Матеріали, похідні від вищезгаданих депонованих штамів, є також придатними ротавірусними антигенами та охоплюють білковий та генний матеріал. Особливий інтерес мають реасортантні ротавіруси, котрі містять принаймні один антиген або принаймні один сегмент будь-якого з вказаних депонованих штамів, наприклад, реасортантів, котрі містять вірулентний штам ротавірусу, де один або частина одного з 11 сегментів геному замінено сегментом геному або його частиною з будь-якого з вказаних депонованих штамів. Особливо ротавірусний реасортант, де сегмент або частковий сегмент, що кодує NSP4, є сегментом або частковим сегментом будь-якого з вказаних депонованих штамів, може мати корисні властивості. Реасортантні ротавіруси та способи їх отримання добре відомі (Foster, R. H. and Wagstaff, A.

J. Tetravalent Rotavirus Vaccine, review. ADIS drug evaluation, BioDrugs, Gev, 9 (2), 155-178, 1998).

Ротавірусний антиген заявленої композиції можна отримувати звичайними способами. Звичайно ротавірусні антигенні препарати можна отримувати з культур тканин способами, застосовуваними для розмноження вірусу або експресії реасортантних ротавірусних антигенів. Придатні клітинні субстрати для вирощування вірусу охоплюють, наприклад, клітини нирок собаки, як-то MDCK або клітини від клону MDCK, клітини MDCK-типу, клітини нирок мавпи, як-то клітини AGMK, охоплюючи клітини Vera, котрі є особливо придатними, інші клітинні лінії, похідні від нирок мавпи, як-то BSC-1, LLC-MK2 та MA104, придатні лінії клітин свиней, або будь-яких клітин інших ссавців, придатних для продукції ротавірусу для вакцин. Придатні клітинні субстрати також охоплюють клітини людини, наприклад, клітини MRC-5. Придатні клітинні субстрати не обмежені лініями клітин; наприклад, первинні клітини охоплені також.

Також у рамках винаходу є суміші будь-яких вищезгаданих депонованих штамів з іншими ротавірусними варіантами, наприклад, іншими клонованими варіантами або іншими реасортантними ротавірусами, або з іншими вірусами зокрема іншими послабленими вірусами. Зокрема композиція згідно з винаходом містить два ротавірусні антигени. Зокрема один антиген у композиції - штам HRV P43, депонований під номером ЕКАСС 99081301, а інший антиген є його реасортантним похідним або будь-яким його імунологічно активним похідним.

Ротавірусний антиген для введення у заявлені композиції може бути моновалентним ротавірусним штамом, тобто містити єдиний ротавірусний штам, або бути полівалентним, тобто містити принаймні два або більше ротавірусних штамів.

Спеціалісту ясно, що інші легко доступні послаблені штами від людини або тварин, що можна отримувати з депозитаріїв також придатні та їх можна застосовувати як замісники згаданих депонованих штамів.

Згідно з заявленим винаходом придатна імуногенна композиція містить ротавірусний антиген, зокрема послаблений штам P43 людини (депонований під номером ЕКАСС 99081301, дивись WO 01/12797) у концентрації  $10^5$ - $10^6$  уоо на дозу (або еквівалент до  $10^{5.5}$ - $10^{6.5}$  як виражено у ІДКК50 на дозу), 55мас.% сахарози, 0,465 М динаматрій адипат (відповідно 132,74мг на дозу), та має рН приблизно 6,2-6,6, у 1,5мл об'єму дози. Для цієї композиції вміст DMEM є 6мас.%, а тому вміст фосфату менше 0,1мМ.

Композиція згідно з заявленим винаходом може крім того охоплювати додатковий антацидний компонент, як-то неорганічний антацид, наприклад, алюміній гідроксид  $Al(OH)_3$  та магній гідроксид  $Mg(OH)_2$ . Алюміній гідроксид є особливо придатним. Інші комерційно доступні антациди, котрі придатні для застосування у винаході, охоплюють Mylanta™, котрий містить алюміній гідроксид та магній гідроксид. Вони нерозчинні у воді та надані у суспензії. Ще одним особливо придатним антацидом, що може бути додатково застосовуваним у

вакцинній композиції заявленого винаходу є нерозчинна неорганічна сіль, кальцій карбонат ( $\text{CaCO}_3$ ). Звичайна концентрація  $\text{CaCO}_3$  є 80мг на дозу вакцини, наприклад.

Іншими придатними водо-нерозчинними антацидами є магній карбонат, алюміній карбонат, алюміній фосфат, суміш алюміній гідроксиду та магній карбонату, алюміній-магній-гідрокарбонат, алюміній гідроксид-магній карбонат-сорбітол-манітол, гідрокси-алюміній-натрій-карбонат, дигідрокси-алюміній-калій-карбонат, магапдрат, гідроталькіт, алмагцит, магній-алюміній-силікат-гідрат.

Імуногенна композиція згідно з заявленим винаходом може додатково містити фармацевтично придатні сполуки та/або носії, зокрема відомі у рівні техніки як придатні для перорального застосування, особливо для малюків. Такі носії охоплюють без обмеження вуглеводи, поліспирти, амінокислоти, алюміній гідроксид, магній гідроксид, гідроксіапатит, тальк, титан оксид, ферум гідроксид, магній стеарат, карбоксиметилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, мікрористалічну целюлозу, желатин, рослинний пептон, ксантан, карагінан, гуміарабік,  $\beta$ -циклодекстрин.

Композиція згідно з заявленим винаходом може додатково містити іони кальцію для стабілізації ротавірусу.

В'язкі агенти можуть додатково бути уведеними у композиції.

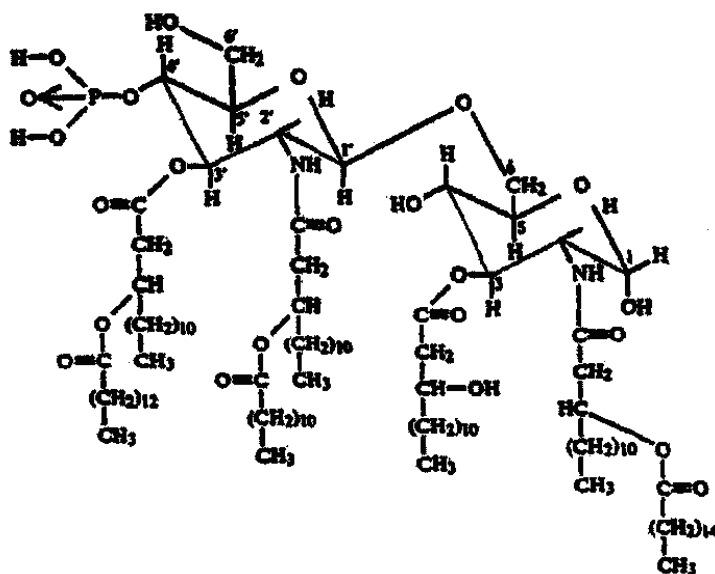
Можливі в'язкі агенти, що можна застосовувати, охоплюють псевдопластичні наповнювачі. Придатні в'язкі агенти охоплюють: пропіленгліколь, гуміарабік, камедь алдраганту, агар-агар, альгінат, пектин, натрій-карбоксиметилцелюлозу (Tyloses C®), метилцелюлозу (Methocels A®, Viscotrans MC®, Tylose MN® та MB®), гідроксипропілметилцелюлозу (Klucels®), гідроксипропілцелюлозу (Methocels E® та K®, Vicotrans MPH®),

Carbopol®, ксантанову камедь, Veegum® (Магній-алюміній силікат), Avicel® (приблизно 89% мікрористалічна целюлоза та 11% карбоксиметилцелюлоза-Na). Ксантанова камедь або крохмаль є особливо придатними в'язкими агентами для додаткового застосування у рідкій композиції згідно з винаходом.

Може також бути сприятливим введення у заявлені композиції носіїв на основі ліпідів, як-то віросоми або ліпосоми, емульсії масло-у-воді або частинки носія. Альтернативно або на додаток можуть бути введені у композиції імуностимулятори, як-то відомі у рівні техніки для пероральних вакцин. Такі імуностимулятори охоплюють бактеріальні токсини, особливо токсин холери (TX) у формі холотоксину (суцільна молекула) або тільки В-ланцюга (B-TX) та інактивованій теплом ентеротоксин *E. coli* (LT). Мутовані LT (mLT), котрі менш ймовірно повертаються у їх активну форму, ніж природний LT, описані у WO 96/06627, WO 93/13202 та US 5,182,109.

Композиція згідно з винаходом може крім того містити ад'ювант або імуностимулятор, як-то, але без обмеження детоксикований ліпід А з будь-якого джерела та нетоксичні похідні ліпиду А, сапонінів та інших реагентів, здатних стимулювати реакцію типу TH1.

Давно відомо, що ентеробактеріальний ліпополісахарид (ЛПС) є потужним стимулятором імунної системи, хоча його застосування у ад'ювантах обмежено його токсичною дією. Нетоксичне похідне ЛПС, монофосфорилліпід А (МФЛ), утворюють видаленням серцевинної вуглеводневої групи та фосфату з відновлювано-кінцевого глюкозаміну, як описано Ribi et al (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419), та має таку структуру:



Наступна детоксикована версія МФЛ походить від видалення ацильного ланцюга з 3-положення дисахаридної основи, та має назву 3-О-деацильований монофосфорилліпід А (3D-МФЛ).

Його можна очищати та отримувати способами, представленими у GB 2122204B, це посилання також розкриває отримання дифосфорилліпиду А, та 3-О-деацильованих його варіантів.

Придатним 3D-МФЛ є у формі емульсії, що має невеликий розмір частинок менше 0,2мкм у діаметрі, а його спосіб вироблення розкрито у WO 94/21292. Водні композиції, що містять монофосфорилліпід А та сурфактант, описані у WO9843670A2.

Бактеріальні ліпополісахаридні похідні ад'юванти для композицій заявленого винаходу можна очищати та переробляти з бактеріальних джерел, або альтернативно вони можуть бути синтетичними. Наприклад, очищений монофосфорилліпід А описано Ribi et al 1986 (вище), а 3-О-деацильований монофосфорил- або дифосфорилліпід А, похідний від *Salmonella* sp., описано у GB 2220211 та US 4912094. Інші очищені та синтетичні ліпополісахариди описані (Hilgers et al., 1986, *Int.Arch.Allergy.Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, *Immunology*, 60(1):141-6; та EP 0 549 074 B1). Особливо придатним бактеріальним ліпополісахаридним ад'ювантом є 3D- МФЛ.

Відповідно, похідні ЛПС, що можна застосовувати у заявленому винаході, є такими імуностимуляторами, що подібні за структурою до такого ЛПС або МФЛ або 3D-МФЛ. Згідно з ще одним аспектом заявленого винаходу похідні ЛПС можуть тоді бути ацилованим моносахаридом, котрий є субфрагментом вищенаведеної структури МФЛ.

Синтетичні похідні ліпиду А відомі також, охоплюючи, але без обмеження:

OM174 (2-дезоксигалакто-6-о-[2-дезоксигалакто-3-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-о-фосфоно-β-D-глюкопіранозил)-2-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]-α-D-глюкопіранозилдигідрофосфат), (WO 95/14026)

OM294 DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-5-аза-9(R)-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол, 1,10-біс(дигідрофосфат) (WO 99/64301 та WO 00/0462)

OM197 MP-Ас DP (3S,9R)-3-[(R)-додеканоїлокситетрадеканоїламіно]-4-оксо-6-аза-10-[(R)-3-гідрокситетрадеканоїламіно]декан-1,10-діол, 1-дигідрофосфат 10-(6-аміногексаноат) (WO 01/46127)

Очищені сапоніни як пероральні ад'юванти описані у WO 98/56415. Сапоніни та монофосфорилліпід А можна застосовувати окремо або у комбінації (наприклад, WO 94/00153) та можуть бути створеними у системах ад'ювантів разом з іншими засобами. 3D-МФЛ є добре відомим ад'ювантом, виробленим Ribi Immunochem, Montana та його вироблення описано у GB 2122204.

Ще одним кращим імуностимулятором для застосування у заявленому винаході є сапонін Quil А та його похідні. Сапоніни приведені у: Lacaille-Dubois, M та Wagner H. (1996. A review of biological та pharmacological activity of saponines. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Сапоніни є стероїдними або тритерпеновими глікозидами, широко розповсюдженими у рослинах та морських тваринах. Сапоніни утворюють колоїдні розчини у воді, котрі утворюють піну при струшуванні та осаджують холестерин. Коли сапоніни є поблизу клітинних мембран, вони створюють структури типу пір у

мембрані, у мембрані, котрі викликають розрив мембрани. Гемоліз еритроцитів є прикладом цього явища, котре є властивістю деяких, але не усіх сапонінів.

Сапоніни відомі як ад'юванти у вакцинах для системного застосування. Ад'ювантна та гемолітична активність індивідуальних сапонінів добре досліджено у рівні техніки (Lacaille-Dubois та Wagner, вище). Наприклад, Quil А (похідні з кори південно-американського дерева *Quillaja Saponaria* Molina), та їх фракції, описані у US 5,057,540 та "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55; та EP 0 362 279 B1 Сипучі структури під назвою Імунні Стимулювальні Комплекси (ISCOMS), що містять фракції Quil А, є гемолітиками та є застосовуваними у виробленні вакцин (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). Гемолітичні сапоніни QS21 та QS17 (очищені BEPX фракції Quil А) описані як потужні системні ад'юванти, а спосіб їх продукції розкрито у патенті США №5,057,540 та EP 0 362 279 B1. QS-21 є природним похідним сапоніну з кори *Quillaja saponaria* Molina, котрий індукує CD8+ цитотоксичні Т-клітини (CTL), ТМ-клітини та панівну реакцію IgG2а-антитіл та є придатним сапоніном у контексті заявленого винаходу. Інші сапоніни, котрі є застосовуваними у системних дослідженнях вакцинації, охоплюють ці похідні від інших видів рослин, як-то *Gypsophila* та *Saponaria* (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992).

Посилена система залучає комбінацію нетоксичного похідного ліпиду А та похідного сапоніну, особливо комбінацію QS21 та 3D-МФЛ, яку розкрито у WO 94/00153, або менш реактогенну композицію, де QS21 гаситься холестерином, як розкрито у WO 96/33739. Сапоніни, що утворюють частину заявленого винаходу можуть бути окремо у формі мицел, або можуть бути у формі великих упорядкованих структур, як-то ISCOMs (EP 0 109 942 B1) або ліпосоми, при створенні з холестерином та ліпідом, або у формі емульсії масло-у-воді (WO 95/17210). Сапоніни можуть відповідно бути асоційовані з сіллю металу, як-то алюміній гідроксид або алюміній фосфат (WO 98/15287).

Особливо потужну композицію ад'юванту, що містить QS21 та 3D-МФЛ в емульсії масло-у-воді, описано у WO 95/17210 та у WO 99/11241 та WO 99/12565, та є придатною композицією.

Загальне обговорення носіїв та ад'ювантів для пероральної імунізації можна знайти у *Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*, edited by Powell та Newman, Plenum Press, New York, 1995.

Вакцинна композиція згідно з винаходом може містити додаткові компоненти, охоплюючи, наприклад, ароматизатори (особливо для пероральних вакцин) та бактеріостатичні засоби.

В особливому втіленні, рідка композиція згідно з винаходом має антацидну здатність між 6 та 23 хвилини, як оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків (адаптованим, як деталізовано у прикладі III,2,2 від лужного тесту Россетта-Райса). Згідно з заявленим винаходом 'антацидна здатність' означає період часу у хвилинах, протягом которого рН

композиції при тестуванні залишається вище 4, як оцінено згідно з експериментальним способом, даним у прикладі III,2.2. Відповідно антацидна здатність буде між 12 та 20 хвилин. Антацидна здатність вище 23 хвилин, як-то 29-30 хвилин, наприклад, є також чудово прийнятною у перспективі розробки вакцин, але така висока продуктивність є надлишковою. Зокрема, антацидна здатність принаймні 8 хвилин, принаймні 10 хвилин, принаймні 12 хвилин є розглянутою особливо. Антацидна здатність принаймні 12 хвилин, принаймні 13 хвилин, принаймні 14 хвилин, принаймні 15 хвилин, принаймні 16 хвилин, є придатною. Відомо, що шлунок невеликих малюків, які не їли протягом трьох годин є дуже кислотним, та що на ротавірус негативно впливає такий кислотний рН. Іншими словами, працюючи з низьким об'ємом композиції, котра є бажаною, неможливо вимірювати антацидну здатність класичних композицій з вмістом фосфату, оскільки розчинності фосфатів легко перевищувалися та відбувалася кристалізація складових при створенні композиції та/або короткому терміні зберігання. За контрастом, заявлені композиції несподівано показали прийнятну, але вищу антацидну здатність навіть у меншому об'ємі дози, порівняно з композиціями рівня техніки з вмістом фосфату.

У ще одному особливому втіленні вказана рідка імуногенна композиція є стабільною за принаймні однієї з наступних умов: протягом 7 діб при 37°C, протягом одного року при 4°C, протягом 18 місяців при 4°C, протягом двох років при 4°C. Згідно з заявленим винаходом стабільність даної композиції оцінено виміром вірусного титру (тобто вірусної стабільності), способом, наведеним у прикладі III,1, після зберігання композиції протягом позначеного періоду часу при даній температурі. Стабільність композиції може бути оціненою прискореним тестом стабільності, наприклад, після зберігання композиції протягом одного тижня при 37°C. Стабільності композиції можуть бути альтернативно оцінено протягом довшого періоду часу, як-то протягом кількох місяців, при температурі холодильника (між 2 та 7°C, звичайно при 4°C) або при кімнатній температурі (20-22°C). У цих умовах, стабільною є композиція, що має максимум втрати титру ротавірусу 1, як виражено  $\log_{10}$  уоо/дозу у позначених умовах тестування. Особливо придатними є композиції, де максимум 0,5  $\log_{10}$ , наприклад, 0,4 або менше, 0,3 або менше, 0,2 або менше або відповідно 0,1  $\log_{10}$  уоо на дозу вакцини, втрачається при прискореному тесті стабільності при 37°C протягом одного тижня.

Альтернативно, рідка імуногенна композиція, яку заявлено тут, може бути заморожена та зберігатися замороженою при -20°C або нижче, або при -70°C протягом кількох років, та залишатися стабільною при 4°C протягом принаймні одного року при розтопленні. Звичайно заморожена композиція буде стабільною протягом принаймні 6 місяців, принаймні 12 місяців, принаймні 18 місяців, принаймні 2 років, або принаймні 3 років, та залишатися стабільною при 4°C протягом принаймні одного року, відповідно 18 місяців або 2 років при розтопленні.

Композицією згідно з заявленим винаходом є імуногенна композиція, наприклад, вакцинна. Наприклад, заявлена імуногенна композиція здатна, звичайно після одної, допустимо двох доз, відокремлених одним або двома місяцями, для виявлення імунної реакції, наприклад, чудового вакцинного реагування та специфічної IgA-реакції у сироватці на ротавірус. 'Вакцинне реагування' позначено як процент осіб, що виявляють серологічну реакцію, наприклад, появу IgA до ротавірусу у сироватці після імунізації при титрі  $\geq 20$ U/мл (ELISA), та/або з зниженням ротавірусу (ELISA) у будь-якому зразку екскрементів. Вакцинне реагування можна позначити як зниження вірусу вакциною у будь-якому зразку екскрементів, зібраних між першою дозою та аж до 1 до 2 місяців після другої дози. В особливому втіленні, вакцина згідно з винаходом здатна до зниження випадків будь-якого, а переважно суворого, ротавірусного гастроентериту порівняно з плацебо. Звичайно вакцина здатна надавати крос-захист проти циркулюючих штамів інших, ніж наявних у вакцині. Звичайно, коли вакцина містить штам типу G1, як-то послаблений вірус людини P43, імунна реакція в індукованому до серотипу G1 та принаймні одного з не-G1 серотипів, вибраних з групи: G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 та G14. Відповідно вакцини, що містять штам G1, здатний надавати захист від штамів G1 та не-G1, як-то штамів G2, G3 та/або G4, а зокрема від глобально виявленого серотипу G9.

В особливому втіленні, вказаний гастроентерит або суворий гастроентерит викликано ротавірусним штамом відмінного від серотипу у заявленій композиції. Зокрема, якщо ротавірусний штам, наявний у заявленій композиції є серотипом G1, як-то, але без обмеження штамом живого послабленого ротавірусу людини HRV P43 (EКАСС 99081301), попередження надається проти гастроентериту або суворого гастроентериту, викликаного ротавірусним штамом серотипу G1, а також ротавірусним штамом серотипу не-G1, наприклад, ротавірусним штамом, що має серотип, вибраний з групи: G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 та G14. В окремому втіленні імуногенна композиція, заявлена тут, здатна до індукування імунної реакції проти, та/або забезпечувати захист проти гастроентериту або суворого гастроентериту, викликаного принаймні одним, допустимо усіма з таких серотипів не-G1: G2, G3, G4 та G9. У ще одному особливому втіленні, якщо ротавірусний штам, наявний у заявленій композиції, є ротавірусом типу P[8], як-то, але без обмеження, живий послаблений штам ротавірусу людини HRV P43 (EКАСС 99081301), попередження надається проти гастроентериту або суворого гастроентериту, викликаного ротавірусним штамом типу P[8] та типу не-P[8], наприклад, ротавірусним штамом, що має серотип, вибраний з групи: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9 та P11 типів. Зокрема, заявлена тут імуногенна композиція здатна до індукування імунної реакції проти, та/або забезпечення захисту проти гастроентериту або суворого гастроентериту, викликаного принаймні одним, допустимо усіма з таких типів не-P[8]: P4, P6. У ще одному втіленні

заявлена композиція здатна до індукування імунної реакції до, та/або забезпечення захисту проти гастроентериту або суворого гастроентериту, викликаного ротавірусним штамом відмінного G-типу та відмінного P-типу до штаму, наявного у застосованій композиції. Зокрема, заявлена композиція містить ротавірусний штам G1P[8] та є також здатна до індукування імунної реакції до, та/або забезпечення захисту проти гастроентериту або суворого гастроентериту, викликаного ротавірусним штамом G2P[4].

Відповідно композицію згідно з винаходом застосовують перорально. Відповідно композицію постачають у одно-дозовому пристрої, як-то скляна або пластикова пляшечка або шприц, придатний для введення невеликим малюкам.

Вакцини винаходу можна створювати та застосовувати відомими способами, застосовуючи придатну кількість живого вірусу для забезпечення ефективного захисту проти рота-вірусної інфекції без значної шкідливої побічної дії у звичайних вакцинах.

Відповідно заявлений винахід стосується способу отримання рідкої ротавірусної композиції або імуногенної композиції, як описано тут, що містить змішаний ротавірусний антиген, цукор та карбоксилат з фармацевтично прийнятним розріджувачем.

Придатна кількість живого вірусу звичайно буде між  $10^4$  та  $10^7$  уоо на дозу. Звичайна доза вакцини може містити  $10^5$ - $10^6$  уоо на дозу та може бути даною кількома дозами протягом періоду часу, наприклад, двома дозами з інтервалом два місяці. Титр ротавірусу можна також виражати у ІДКК50 та це можна оцінити у контексті цього винаходу, що ІДКК50  $10^{60}$  є еквівалентом уоо  $10^{55}$  на дозу. Користь можна, однак, отримувати більше, ніж 2 дозами, наприклад, 3 або 4 дозами, особливо у країнах, що розвиваються. Першу дозу можна відповідно давати малюкам при віку від 4 тижнів до 14 або 15 тижнів, відповідно 6-14 тижнів віку. Інтервал між дозами є принаймні 4 тижнів, але може бути більше або менше двох місяців, наприклад, другу дозу та будь-яку наступну дозу, якщо доречно, можна давати через один місяць або три місяці після попередньої дози, залежно від програми локальної імунізації. Оптимальну кількість живого вірусу для єдиної дози або для багатовдозового режиму, та оптимальний розрахунок часу для дози, можна встановити стандартними дослідженнями, що залучають спостереження титрів антитіл та інших реакцій у осіб.

Звичайно об'єм дози вакцини згідно з винаходом звичайно буде 2,5мл або нижче, звичайно між 0,5мл та 2,5мл. Згідно з особливим аспектом винаходу, придатною дозою вакцини звичайно буде 1,5мл або відповідно будь-як об'єм менше 2,5мл, як-то об'єм 2мл або менше, що є придатним для перорального застосування до немовлят або малюків. Зокрема об'єм дози буде таким, щоб була можливою технічна здійсненність композиції і не було шкідливого впливу на імуногенний потенціал композиції. Заявлені композиції дає перевагу над композиціями рівня техніки, що містять фосфат, у тому, що вони можуть протистояти шлунковій кис-

лотності, залишаються імуногенними та стабільними протягом довгого строку збереження, в той час будучи сумісними з композицією в об'ємі дози менше звичайного, як-то менше 2,0мл або навіть, відповідним чином, 1,5мл або менше. Звичайно об'єм дози вакцини згідно з винаходом є між 0,5мл та 2,0мл, відповідно приблизно між 1,0мл та 1,5мл, як-то приблизно 1,3мл або приблизно 1,4мл або приблизно 1,5мл. Звичайний об'єм дози може також бути 2мл або нижче, як-то, наприклад, 1,1мл, 1,2мл, 1,3мл, 1,4мл або 1,5мл. Об'єми 1мл або об'єми менше 1мл, наприклад, від 200мкл до 800мкл, також розглянуті у рамках заявленого винаходу. Об'єм рідини, що можна застосовувати перорально, може також бути частково визначеним пристроєм для введення вакцини.

Імуногенну композицію винаходу можна також створювати з вмістом інших антигенів, зокрема антигенів від інших придатних живих вірусів для захисту проти інших хвороб, наприклад, поліовірусних. Вказані додаткові активні інгредієнти, придатні для перорального застосування, можна давати у суміші з ротавірусною композицією, або альтернативно можуть бути співзастосованими (тобто окремою дозою, але при тій же оказії) з ротавірусною композицією, заявленою тут.

Заявлену композицію можна також давати разом з іншими не-пероральними вакцинами, наприклад, з парентеральними вакцинами, придатними для педіатричної популяції вакцин, як-то вакцини DTPw або DTPa (вакцини проти Bordetella pertussis - коклюш, дифтерія, стовбняк), вакцини проти індукованого грипом B Hemophilus менінгіту, гепатиту B, або корі, свинки, краснухи (MMR), вакцини проти стрептококової пневмонії, для оптимізації числа візитів до доктора.

У ще одному втіленні винахід також стосується способу лікування або попередження асоційованих з ротавірусом хвороб у людей, особливо у молодших дітей, як-то немовлят або малюків, застосуванням до вказаної людини, яка цього потребує, ефективної кількості рідкої композиції, зокрема імуногенної композиції або вакцини, яку заявлено тут. Зокрема заявлена композиції попереджуватиме від ротавірусних інфекцій. В особливому втіленні, заявлені тут композиції здатні забезпечувати захист проти ротавірусного гастроентериту, зокрема проти суворого гастроентериту. Суворий гастроентерит позначено як випадок, потребуючий госпіталізації та/або регідраційної терапії (еквівалентно схемі B або C WHO) у медичних сприятливих умовах, або випадок з балом більше 11 на 20-бальній шкалі Vesikari (Ruuska T and Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for severity of diarrheal episodes. Scand J Infect Dis 1990, 22:259-67).

У ще одному наступному втіленні, винахід стосується застосування ротавірусного антигену, карбоксилату та цукру у виробленні імуногенної композиції, наприклад, вакцин, для лікування або попередження асоційованих з ротавірусом хвороб у людей, де вказана імуногенна композиція має рН між рН5,0 та рН8,0 та містить менше 5мМ фосфату. Зокрема, попередження ротавірусних інфекцій,

та/або захист проти гастроентериту, а більше конкретно проти суворого гастроентериту розглянуто особливо.

У ще одному особливому втіленні винахід також стосується застосування живого послабленого ротавірусу людини для вироблення імуногенної композиції, яку заявлено тут, для лікування або попередження асоційованих з ротавірусом хвороб, не викликаючи інтусусцепції. Зокрема, вказане лікування або попередження полягає у застосуванні двох пероральних доз або більше безпечної та ефективної кількості композиції живого послабленого ротавірусу людини для малюка у межах 4-14 або 15 тижнів віку на час дози 1. Звичайно малюк буде віком від 6 до 14 тижнів на час першої дози. У контексті заявленого винаходу малюк означає малюка віком від 4 до 14 або 15 тижнів після народження.

У ще одному втіленні винахід також стосується рідкої імуногенної композиції, що містить ротавірусний антиген, цукор, фосфат та карбоксилат, де вказана композиція має рН приблизно 5,0-8,0, та де вказаний карбоксилат вибрано з групи: адипат, малат, ацетат, пропіонат, бутират, малонат, глутарат, гліколят, глюкглуконат, пімелат та будь-яка комбінація з двох або більше їх. В особливому втіленні вказаний карбоксилат є адипатом. Звичайно фосфат буде наявним у концентрації 10мМ - 1М. Винахідником виявлено, що ці конкретні карбоксилати, котрі не асоційовані з розробкою пероральних вакцинних композицій, задовольнили усі бажані потреби стабільності, кислотостійкості, імуногенності та складу у невеликому об'ємі дози, що наведено у представленому описі для розробки придатної пероральної ротавірусної вакцини для малюків. Зокрема вказані карбоксилати не мають шкідливого впливу на титр ротавірусу у композиції. Ці карбоксилати можуть адекватно діяти як альтернативні стосовно звичайних карбоксилатів, як-то сукцинат, глутамат та цитрат, наприклад, у тих ротавірусних композиціях, що містять фосфат. Усі інші особливі втілення, які описано тут вище також застосовано для цього аспекту заявленого винаходу. Звичайно межі рН композиції, які позначено тут, представляють антацидну здатність та строк збереження стабільності. Винахід також стосується способу отримання вказаної композиції, застосування та способів попередження або лікування малюків, застосовуючи вказану композицію.

Винахід далі описано наступними, необмежувальними прикладами:

Приклад 1 - Композиція рідкої вакцини живого послабленого ротавірусу людини i) у відсутності доданого фосфату та карбоксилату, та ii) у присутності цитрату як карбоксилату у відсутності доданого фосфату

1,1. Отримання композицій

1,1,1. Композиція середовища DMEM (для отримання 1л DMEM):

Вода для ін'єкції: 0,8л

Розчиняють послідовно наступні сполуки:

Натрій хлорид: 6,40г

Калій хлорид: 0,40г

Магній сульфат, 7 H<sub>2</sub>O: 0,20г

Додають розчин ферум нітрату при 0,1г/л: 1,00мл

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 0,1412г

Натрій піруват: 0,11г

Безводна глюкоза: 4,50г

Розчин вітамінів (500× концентрований): 2,00мл

Вода для ін'єкції: 1,50мл

Хлоридна кислота (концентрована): 0,083мл

L-цистин: 0,048г

L-тирозин: 0,072г

Вода для ін'єкції: 2,00мл

Розчин амінокислот: 20,00мл

L-Глутамін: 0,5846

Кальцій хлорид-2H<sub>2</sub>O: 0,2649г

Натрій гідрокарбонат: 3,70г

Вода для ін'єкції до 1л

DMEM представляє 5%, 6% або 8% композиції, деталізованої у прикладі II. Це відповідає:

- кінцевій концентрації фосфату 0,059мМ, 0,071мМ та 0,094мМ, відповідно, та кінцевій концентрації пірувату 0,065мМ, 0,078мМ та 0,104мМ відповідно.

Розчин вітамінів (500× концентрований):

Вода для ін'єкції: 80,00л

Фолієва кислот: 200,10г

Кальцій пантеноат: 200,10г

Холін хлорид: 200,10г

Інозитол: 350,00г

Нікотинамід: 200,00г

Піридоксин хлоргідрат: 200,10г

Тіамін хлоргідрат: 200,10г

Рибофлавін: 20,002г

Вода для ін'єкції до 100л.

Розчин амінокислот:

Вода для ін'єкції: 144,00л

L-Аргінін: 755,70г

Гліцин: 270,10г

L-Пстидин: 378,00г

L-ізолейцин: 943,40г

L-Лейцин: 943,50г

L-Лізин 2 HCl: 1,315,80г

L-Метіонін: 270,00г

L-Фенілаланін: 594,10г

L-Треонін: 856,30г

L-Триптофан: 144,00г

L-Серин: 377,90г

L-Валін: 842,00г

Вода для ін'єкції: до 180л.

Розчин ферум нітрату

Вода для ін'єкції: 1,035,000мл

ферум нітрат, 9 H<sub>2</sub>O: 0,115г

Вода для ін'єкції: до 1,150л

I,1,2. Отримання ротавірусних композицій у відсутності доданого фосфату та карбоксилату

Композицію 60, представлену у таблиці 2, зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 дози 1,5мл (1,95г) кожна.

Композиція №60: до 143г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) додають: 162,5г сахарози (50мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо

на дозу. У цьому випадку об'єм дози є 1,5мл. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас. %.

Дані антацидної здатності, початкового вірусного титру та вірусної стабільності показані у таблицях 2-4.

Таблиця 2

Об'єм дози 1,5мл

№	Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* pH при t=0	PPM* час при pH≥4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0 (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)	Вірусний титр 37°C	Вірусна втрата після 1 тижня 37°C
60	50,0%	6%	7,82	Менше 1	6,3	5,4	0,9

оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2

Таблиця 3

Об'єм дози 1,5мл - Вірусна стабільність при кімнатній температурі  
n<sup>0</sup> Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (log<sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)

	1м*	2м*	3м*	4м*	5 м*	6м*	7м*	8м*	9м*	10м*
60	5,6	5,6	5,0	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ

\*= місяці; НВ=не визначено

Таблиця 4

Об'єм дози 11,5мл - Вірусна стабільність при 4°C

№	Вірусне титрування після зберігання при 4°C (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)							
	T=0	після 1 тижня 37°C	1м* 4°C	2м* 4°C	4м* 4°C	6м* 4°C	9м* 4°C	12м* 4°C
60	6,3	5,4	6,2	5,8	6,0	5,5	НВ	НВ

\* = місяці; НВ= не визначено

I,1,3. Отримання ротавірусних композицій, що містять карбоксилат

Лимонну кислоту (при наявності) та цитрат змішують у пропорціях та умовах, показаних у таблицях 5 та 6. Ротавірусну стабільність та антацидну здатність композицій вимірюють способами, даними у прикладах III,1 та III,2, відповідно.

Композиції 110-115 та 128-130 отримували так. Об'єм дози був 2,5мл для композицій 110-115 та 1,5мл для композицій 128-130. Композиції 110-115, представлені у таблиці 5, зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 100 доз по 2,5мл (3,25г) кожна.

Композицію 110 отримували так. До 123,71г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 19,29г три-натрій цитрату (Na<sub>3</sub>Цитрат·2H<sub>2</sub>O, Мм 294) (відповідно кінцевій концентрації 262мМ) та 162,50г сахарози (50мас. %). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавіру-

су, для отримання 10<sup>6,0</sup> на дозу. У цьому випадку об'єм єдиної дози є 2,5мл або 3,25г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару.

У цьому прикладі середовище DMEM представляє 6мас. %, відповідно кінцева концентрація фосфату 0,059мМ.

Композиції 111-115 отримані способом, подібним описаному для композицій 110, за винятком того, що кількість інгредієнтів адаптовано, як деталізовано у таблиці 5. Наприклад, композицію 111 отримували змішуванням наступних інгредієнтів: 123,73г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г), 19,07г три-натрій цитрату (Na<sub>3</sub>Цитрат·2H<sub>2</sub>O, Мм 294) (відповідно кінцевій концентрації 259мМ), 0,197г лимонної кислоти (Мм 192) (відповідно кінцевій концентрації 4мМ) та 162,50г сахарози (50мас. %). Решту процедур виконували, як для композиції 110.

Дані антацидної здатності, початкового вірусного титру та вірусної стабільності показані у таблицях 5-8.

Таблиця 5

Об'єм дози 2,5мл

№	Лимонна Кислота (М)	Na <sub>3</sub> Цитрат, 2H <sub>2</sub> O	Сахароза, мас. %	DMEM, мас. %	PPM* РН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0 log <sub>10</sub> уоо	Вірусний титр після 1 тижня (на дозу)	Вірусна втрата при 37°C після 1 тижня вакцини
110	0	0,262	50%	6%	8,15	14	5,7	4,8	0,9
111	0,004	0,259	50%	6%	6,95	14	5,3	5,4	0
112	0,010	0,256	50%	6%	6,51	12-13	5,6	5,6	0
113	0,014	0,249	50%	6%	6,34	12	5,6	5,4	0,2
114	0,034	0,283	50%	6%	5,94	12-13	5,6	5,3	0,3
115	0,093	0,333	50%	6%	5,37	14	5,7	5,6	0,1

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2

Композиції, представлені у таблиці 6, зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 дози 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: лимонна кислота, 1H<sub>2</sub>O (Мм 210), Na<sub>3</sub>Цитрат·2H<sub>2</sub>O (Мм 294).

Композицію 128 отримано змішуванням 110,89г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) з наступними інгредієнтами: 31,78г три-натрій цитрату (Na<sub>3</sub>Цитрат·2H<sub>2</sub>O, Мм 294) (відповідно кінцевій концентрації 432мМ), 0,328г лимонної кислоти (лимонна кислота, 1H<sub>2</sub>O, Мм 210) (відповідно кінцевій концентрації 6мМ) та 162,50г сахарози (50мас. %). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм.

У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ро-

тавірусу, для отримання 10<sup>6,0</sup> уоо на дозу. У цьому випадку доза є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі середовище DMEM представляє 6мас. %, відповідно кінцева концентрація фосфату 0,059мМ.

Композиції 129 та 130 отримані подібно способом, описаному для композиції 128 у той же час адаптуючи кількості інгредієнтів згідно з таблицею 6. H<sub>2</sub>O Композицію 130 отримано змішуванням 2,75г лимонної кислоти (лимонна кислота, 1H<sub>2</sub>O Мм 210) (відповідно кінцевій концентрації 52мМ) та 34,7г три-натрій цитрату (Na<sub>3</sub>Цитрат·2H<sub>2</sub>O (Мм 294) відповідно кінцевій концентрації 472мМ). Решта інгредієнтів та пропорції є у таблиці 6.

Таблиця 6

Об'єм дози 1,5мл

№	Лимонна Кислота (М)	Na <sub>3</sub> Цитрат·2H <sub>2</sub> O	Сахароза, мас. %	DMEM, мас. %	PPM* РН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0 log <sub>10</sub> уоо	Вірусний титр після 1 тижня (на дозу)	Вірусна втрата при 37°C після 1 тижня вакцини
128	0,006	0,432	50,0%	6%	6,97	13	6,1	5,8	0,3
129	0,015	0,426	50,0%	6%	6,55	12	5,9	5,8	0,1
130	0,052	0,472	50,0%	6%	5,92	13	5,9	5,8	0,1

\* оцінене тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2

Таблиця 7

Об'єм дози 1,5мл - Вірусна стабільність при кімнатній температурі

Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)										
	1м*	2м*	3м*	4м*	5м*	6м*	7м*	8м*	9м*	10м*
128	НВ	НВ	НВ	НВ	5,4	5,1	НВ	НВ	НВ	НВ
129	НВ	НВ	НВ	НВ	5,4	5,0	НВ	НВ	НВ	НВ
130	НВ	НВ	НВ	НВ	5,6	5,0	НВ	НВ	НВ	НВ

\* =місяці; НВ = не визначено

Таблиця 8

Об'єм дози 1,5мл - Вірусна стабільність при 4°C

№	Вірусне титрування після зберігання при 4°C ( $\log_{10}$ уоо на дозу вакцини)							
	T=0	після 1 тижня при 37°C	1м* 4°C	2м* 4°C	4м* 4°C	6м* 4°C	9м* 4°C	12м* 4°C
128	6,1	5,8	НВ	НВ	НВ	5,8	НВ	5,7
129	5,9	5,8	НВ	НВ	НВ	5,8	НВ	5,6
130	5,9	5,8	НВ	НВ	НВ	5,9	НВ	5,4

\* = місяці; НВ = не визначено

1,2 ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визначено наступним протоколом, наданим у прикладі III.2. Дані показані у таблицях 2-8.

pH для контрольної композиції 60 без карбоксилату та доданого фосфату не мав антацидної здатності, а крім того pH виявлявся впритул до верхнього обмеження pH 8,0 для вірусної стабільності.

Для усіх експериментальних композицій, тестованих у таблицях 5-8, pH підтримували у межах приблизно 5,0-7,0 за винятком композиції 110, де pH був вище 8,0. Як можна бачити з даних вірусного титру та вірусної втрати, ротавірусна стабільність у рідкій композиції пов'язана з pH цієї композиції у межах приблизно pH 5,4 (тобто композиції 115) до pH 7,0 (тобто композицій 111 та 128), вірусна втрата після 7 доби при 37°C трималася на низькому рівні (тобто нижче  $\log 0,5$ ), і це контрастувало з результатом, отриманим для композиції 110 (pH більше 8, з втратою вірусного титру  $\log 0,9$ ).

На додаток, композиції 111-115 та 128-130 показали подібну антацидну здатність до композиції 110, як оцінено дослідженням Россетта-Райса малюків (дивись Приклад III,2,2). Ця антацидна здатність добре перевищувала нижче обмеження 8 хвилин для 2,5мл, а також для об'єму дози композиції 1,5мл, та дійсно досягала мінімум 12 хвилин, та її розглядали тому високо задовільною.

Альтернативні карбоксилати тестовані також, оскільки вони можуть представляти технічно здійснені альтернативи, коли можуть бути бажаними відносно низькі кількості карбоксилатів, наприклад, працюючи з дуже невеликими об'ємами дози.

Приклади композицій, що містять такі альтернативні карбоксилати, надані у прикладі та таблицях 10-39.

Приклад II - Композиції з альтернативним карбоксилатом у відсутності доданого фосфату

Наступні карбоксилати застосовані для створення буферної здатності: ацетат, малонат, сукцинат, глутарат, адипат та малат. Згідно з  $pK_a$  карбонової кислоти та залежно від її молекулярної маси, можливо знайти кількості для досягнення цільової антацидної здатності принаймні 8 хвилин, відповідно принаймні 12 хвилин, як оцінено тестом PPM, в той час будучи в інтервалі pH 5,0-8,0.

Хімічно кажучи, "буферний" вплив отримують, при змішуванні сильної кислоти (типу HCl) та солі, похідної від слабкої кислоти (типу натрій ацетату). Величина pH відповідає середині буферного плато і дорівнює  $pK_a$  слабкої кислоти.  $pK_a$  карбонової кислоти є виміром кислотної сили, іншими словами індикатором ефективних буферувальних меж сполуки.

Оскільки ротавірус швидко розкладається нижче pH 4 (C. Weiss та H. F. Clark, 1985 J. Gen. Virol., 66, 2725-2730), буферне плато вище pH 4 є бажаним, це відповідає карбоксилатам з  $pK_a$  більше 4 або ді-карбоксилатам з середнім  $pK_a$  більше 4. Придатні карбоксилати надані у таблиці 9. Надані середні величини  $pK_a$ .

Таблиця 9: характеристики різних карбоксилатів

Карбонові кислоти	ММ	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	Сер. $pK_a$	Токсичність (ЛД50 перорально, у щурів)
Лимонна*	192	6,39	4,76	3,13	4,76	3,0 г/кг
Інші карбонові кислоти з $pK_a$ більше 4						
Пропінова*	74	4,88				2,6 г/кг
Масляна	88	4,82				
Оцтова*	60	4,76				3,3 г/кг

Дикарбонові кислоти з середнім $pK_a$ більше 4						
Малеїнова	116	6,23	1,92		4,07	
Малонова	104	5,7	2,83		4,26	1,31 г/кг
Бурштинова	118	5,6	4,21		4,90	2,26 г/кг
Адипінова*	146	5,4	4,43		4,91	5,7 г/кг
Глутарова	132	5,22	4,34		4,78	
Яблучна*	134	5,05	3,40		4,22	1,6 г/кг

\*5 карбонових кислот мають статус "харчової добавки": Лимонна E330, Оцтова E260, Пропіонова E280, Яблучна E296 та Адипінова E355.

Стандартну криву кислотно-основного титрування для чотирьох карбоксилатів (натрій малат, натрій ацетат, натрій цитрат та натрій адипат) показано у Фіг.1. Це показує, що корисну антацидну здатність між pH4,0 та pH7,0, наприклад, мають 72,50%, 68,75%, 57,70% та 41,25% натрій адипат, натрій ацетат, натрій цитрат та натрій малат, відповідно.

Композиції отримані з наступними карбоксилатами: ацетат, малонат, сукцинат, глутарат, адипат та малат. Усі композиції, показані у цьому прикладі отримані в об'ємі дози 1,5мл.

#### II,2. Композиції з ацетатом

II,2.1. Композиції, представлені у таблиці 10, зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: оцтова кислота (Мм 60), NaOH (Мм 40).

Композиція 36: до 148,84г води (кількість, достатня для досягнення кінцевих 325г) послідовно додають: 10,66г NaOH, льодяну оцтову кислоту до pH7,16 та 130г сахарози (40мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають до розчину, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є

1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиції 37 та 42: це роблять, як композицію 36, але кількості підганяють згідно з таблицею 10.

Композиція 87: до 75,00г води послідовно додають: 8,00г NaOH, 15,00г льодяну оцтову кислоту, достатню кількість 1Н розчину NaOH для досягнення pH7,00 (у цьому випадку 2г 1Н NaOH додавали), додаткову воду для досягнення достатньої кількості 325г (у цьому випадку додавали 43,00г води), та 162,50г сахарози (50мас.%). Решту процедур проводять як для композиції 36.

Приклад для композицій 88-90: це робили як для композиції №87 за винятком того, що кількості адаптовані, як згадано у таблиці 10.

Приклад для композицій 33-35: це робили як для композиції №36 за винятком того, що кількості адаптовані, як згадано у таблиці 10, а NaOH заміщено  $Ca(OH)_2$ . Композиції 33-35 не вводили у низько-термінальне дослідження стабільності внаслідок невдачі погодження з тестом стабільності 1 тиждень при 37°C. Задовільні дані у присутності додаткового іону кальцію однак представлені у адипатній серії (дивись Приклад II. 5. 4 та Таблицю 26).

Таблиця 10

№	NaOH (M)	Оцтова кислота (M)	Сахаро- за мас. %	DMEM мас. %	PPM* при t=0	pH	PPM* час при pH > 4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після тижня 37°C	Вірусна втрата після тижня 37°C
((log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)										
36	1,07	впритул до pH	40%	6%	7,2/ 7,23°	13/14°	5,8	5,3	0,5	
37	1,07	впритул до pH	50%	6%	7,62/ 7,63°	13/15°	5,8	5,4	0,4	
42	1,05	впритул до pH 7,7	50%	6%	8,06/ 8,03°	15/16°	5,9	5,1	0,8	

87	впритул до рН 7,0	1	50%	6%	7,24	13	6,2	6,1	0,1
88	впритул до рН 6,5	1	50%	6%	6,7	13	5,8	5,9	0
89	впритул до рН 6,0	1	50%	6%	6,14	12	5,9	5,5	0,4
89	впритул до рН 6,0	1	50%	6%	6,14	12	5,9	5,5	0,4
90	впритул до рН 6,0	1	55%	6%	6,10	13	6,0	5,5	0,5
	Ca(OH) <sub>2</sub>								
33	0,540	аж до	40%	6%	7,66	12	5,8	4,3	більше1
34	0,540	аж до	45%	6%	8,09	13	5,9	Менше 3,8	більше1
35	0,540	аж до	50%	6%	7,76	13	6,3	Менше 3,8	більше1

\*оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2;

°= повторення

II,2,2. Композиції, представлені у таблиці 11 зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: Натрій ацетат, 3H<sub>2</sub>O(Мм136).

Приклад для композиції 58: до 113,00г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 30,00г натрій ацетату-3 H<sub>2</sub>O та 162,50г сахарози (50мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умо-

вах 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають до розчину, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиції 59, 66, 69, та 70: це роблять подібно композиції 58 з підігнаними кількостями (дивись Таблицю 11).

Таблиця 11

№	Na Ацетат. 3H <sub>2</sub> O (М)	Сахароза мас.%	DMEM мас.%	PPM* рН у t=0	PPM* час при рН>4	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня 37°C	Вірусна втрата після 1 тижня 37°C
((log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)								
58	0,882	50%	6%	7,98	11	6,3	5,6	0,7
59	0,706	50%	6%	7,94	7	6,2	5,4	0,8
66	0,941	54%	6%	8,13/ 8,14°	13	5,9	5,3	0,6
69	0,753	55%	6%	8,15	8	6,0	5,3	0,7
70	1,338	50%	6%	8,23	20	6,0	5,4	0,6

"як оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.;

° = повторення

II,2,3. ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визна-

чено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2,2. Дані показані у таблицях 10, 11,12 та 13.

На завершення, ротавірусна стабільність у рідкій композиції ацетату пов'язана з рН. Придатні робочі межі є між рН6,0-7,5.

Таблиця 12 - Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
	1 м*	2 м*	3 м*	4 м*	5 м*	6 м*	7м*	8м*	9м*	10м*
36	5,8	5,2	4,7							
37	5,8	5,5	5,3	5,0	5,0	4,4				
42	5,2	5,4	5,1							
87		6,0	5,9			5,6		5,3	5,3	4,7
88		5,9	5,6							
89		5,2	4,7							
90		4,8	4,6							
58	5,6	5,4	4,9							
59	5,7	5,5	4,9							
66	5,8	5,4	5,5							
69	5,9	5,5	5,5							
70	5,9	5,5	5,4							

\* =місяці; Пусті комірки = критерії не визначено

Таблиця 13 - Вірусна стабільність при 4°C

Вірусне титрування після зберігання при 4°C (log<sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)

	T=0	після 1 ти- жня	1м* 4°C	2 м* 4°C	4 м* 4°C	6 м* 4°C	9 м* 4°C	12 м* 4°C	15м* 4°C
36	5,8	5,3	5,8	5,8	5,6				
37	5,8	5,4	5,9	5,8	5,8	5,7			
42	5,9	5,1	5,9	5,7	5,7				
87	6,2	6,1		6,3		6,1			6,1
88	5,8	6,0		6,0					
89	5,9	5,5		5,8					
90	6,0	5,5		5,7					
58	6,3	5,6	6,2	5,8	6,0				

59	6,2	5,4	6,2	5,7	6,0				
66	5,9	5,3	5,9	5,8					
69	6,0	5,3	6,0	5,9					
70	6,0	5,4	6,0	5,9					

\*= місяці; Пусті комірки = критерії не визначено

## II,2. Композиції з малонатом

II,2.1. Композицію 67 (дивись таблицю 14) зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: малонові кислота (Мм 104), NaOH (Мм 40).

Композицію 54 (дивись таблицю 14) зроблено у загальній кількості 44г (35мл), що представляє 20 доз по 1,75мл (2,2г) кожна. Антацидні матеріали: малонові кислота (Мм 104), NaOH (Мм 40).

Композиція №67: до 110,70г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 14,00г NaOH, 18,230г маленової кислоти та 162,5г сахарози (50мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить

обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція №54: до 16,64г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 3,1213г маленової кислоти та 19,5г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Таблиця 14

№	NaOH (М)	Маленова кислота (М)	Сахароза мас.%	DMEM мас.%	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня 37°C	Вірусна втрата після 1 тижня 37°C
(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
67	1,4	0,701	50%	6%	6,53	11-12	6,0	5,7	0,3
54	1,71	0,857	44%	6%	8,36	23	00	00	00

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом

## III,2.2.

<sup>00</sup> Композицію 54 відбракували від довго-термінового дослідження стабільності, оскільки її початковий рН вище 8,0

II,2.2. Композицію, представлену у таблиці 15, зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 147,7 доз по 1,75мл (2,20г) кожна. Антацидний матеріал: динатрій малонат (Мм 148).

Композиція №62: до 138,50г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 23,00г динатрій малонат та 144,00г сахарози (44мас.%). Після повного розчи-

нення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають до розчину, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,20г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Таблиця 15

№	Na Малонат (М)		Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* pH при t=0	PPM* час при pH > 4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після тижня 37°C	Вірусна втрата після тижня 37°C
							(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)		
62	0,601	44%	6%	8,21	12	62	6,1	5,0	0,9

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.

II,2,3. Ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

На завершення, ротавірусна стабільність у рідкій композиції малонату пов'язана з pH: pH 6,5 дає гарну стабільність протягом 1 тижня при 37°C, у той час, як спостерігають log втрати більше 0,9 при pH 8,2.

II,3 Композиції з сукцинатом

II,3,1. Композицію 127 (дивись таблицю 16) зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: бурштинова кислота (Мм 118), NaOH (Мм 40).

Композиція 51 (дивись таблицю 16) зроблено у загальній кількості 44г (35мл), що представляє 20 доз по 1,75мл (2,2г) кожна. Антацидні матеріали: бурштинова кислота (Мм 118), NaOH (Мм 40).

Композиція 127: до 120,16г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 9,10г NaOH, 13,74г бурштинової кислоти та 162,5г сахарози (50мас.%). Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 67. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 51: до 16,22г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 3,5414г бурштинової кислоти та 19,5г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Таблиця 16

№	NaOH (М)	Бурштинова кислота (М)	Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* pH при t=0	PPM* час при pH > 4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після тижня 37°C	Вірусна втрата після тижня 37°C
							(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)		
127	0,91	0,466	50%	6%	6,33	9	5,9	5,7	0,2
51	1,71	0,857	44%	6%	7,20	>20	∞	∞	∞

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.

∞ Композицію 51 відбраковували від довго-термінового дослідження стабільності, оскільки її антацидну здатність визначали надто довго

II,3,2. Композицію 56 представлено у таблиці 17 та зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: Динатрій сукцинат (Мм 162).

Композиція 56: До 122,50г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г)

послідовно додають: 20,50г динатрій сукцината та 162,50г сахарози (50мас.%). Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 62. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Таблиця 17

№	Ді-натрій сукцинат (М)	Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після тижня 37°C	Вірусна втрати після тижня 37°C
(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)								
56	0,506	50%	6%	8,12/ 8,30°	13	6,3	5,5	0,8

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.;

° = повторення

II,3,3. Ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

На завершення, ротавірусна стабільність у рідкій композиції сукцинату пов'язана з рН: рН6,3 дає гарну стабільність протягом 1 тижня при 37°C, у той час, як спостерігають втрату 0,8 log при рН8,1.

II,4. Композиції з глутаратом

II,4,1. Композиції з глутаратом представлені у таблиці 18.

Композицію 65 зроблено у загальній кількості 320,8г (246мл), що представляє 164 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: глутарова кислота (Мм 132), NaOH (Мм 40). До 114,1г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 320,8г) послідовно додають: 9,3г NaOH, 15,40г глутарової кислоти та 162,5г сахарози. (50,6мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6,08мас. %.

Композицію 50 зроблено у загальній кількості 44г (35мл), що представляє 20 доз по 1,75мл (2,2г)

кожна. Антацидні матеріали: глутарова кислота (Мм 132), NaOH (Мм 40).

До 15,8г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 3,964г глутарової кислоти та 19,5г сахарози. (44мас.%).

Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм.

У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г.

Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас. %.

Композиції 125 та 126 зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: глутарова кислота (Мм 132), NaOH (Мм 40).

Композиція 125: до 100,35г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 9,10г NaOH, 15,40г глутарової кислоти та 162,5г сахарози. Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 67. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас. %.

Композиція 126: це робили як для композиції 125, але з підігнаними кількостями (дивись Таблицю 18).

Таблиця 18

№	NaOH (М)	Глутарова кислота (М)	Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після тижня 37°C	Вірусна втрати після тижня 37°C
(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
125	0,910	0,467	50%	6%	6,17	10-11	5,8	5,7	0,1
65	0,945	0,474	50,6%	6%	6,49	11	6,0	5,6	0,4

126	0,950	0,467	50%	6%	8,13	12	6,1	5,4	0,7
50	1,71	0,858	44%	6%	8,45	більше 20	∞	∞	∞

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2.2.

<sup>∞</sup> Композицію 50 відбраковували від довго-термінового дослідження стабільності, оскільки її початковий рН (вище 8,0) та її антацидну здатність визначають надто довго

II,4.2. Ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

На завершення, ротавірусна стабільність у рідкій композиції глутарату пов'язана з рН: рН6,17 дає гарну стабільність протягом 1 тижня при 37°C, у той час, як спостерігають втрату 0,7 log при рН8,1.

II,5. Композиції з адипатом

II,5.1. Композиції з вмістом адипату, представлені у таблиці 19, зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна, виключено композицію n° 45, котрої отримано 44г (35мл), що представляє 20 доз по 1,75мл (2,2г) кожна, та №63, котрої отримано 320,8г (247мл), що представляє 164 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: адипінова кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40).

Композиція 45: до 15,38г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 4,3809г адипінової кислоти та 19,5г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 63: до 112,50г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 320,8г) послідовно додають: 9,3г NaOH, 17,00г адипінової

кислоти та 162,5г сахарози. Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6,08мас.%.

Композиція 81: до 116,70г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 9,28г NaOH, 17,00г адипінової кислоти та 162,5г сахарози (50мас.%). Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 67. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиції 82, 83, 91-97, 100-109, 122-124, 131-134, 136-145, 147, 148: До води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: NaOH, адипінову кислоту та сахарозу у кількості, як описано у таблицях 19 та 23. Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>60</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Утворену суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Кілька параметрів, показаних жирним у таблиці 19, змінені для виконання тестування утворених композицій відносно антацидної здатності та вірусної стабільності.

Таблиця 19

№	NaOH (М)	Адипінова кислота (М)	Сахароза мас.%	DMEM мас.%	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після тижня 37°C	Вірусна втрата після тижня 37°C
(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
45	1,71	0,857	44%	6%	7,29	більше 20	∞		
Вплив цукру %									
63	0,945	0,472	<b>50,6%</b>	6%	6,49	12	6,0	5,6	0,4
81	0,917	0,460	<b>50%</b>	6%	6,2	11-12	5,9	5,7	0,2
82	0,899	0,451	<b>45%</b>	6%	6,39	11-12	5,9	5,7	0,2

83	0,928	0,466	55%	6%	6,38	12	5,9	5,8	0,1
Композиції з відмінною антацидною здатністю									
91	0,71	0,358	50%	6%	6,37	8	6,0	5,7	0,3
92	0,925	0,464	50%	6%	6,24	11-12	6,0	5,7	0,3
93	1,100	0,553	50%	6%	6,5	15-16	6,1	5,8	0,3
94	1,324	0,664	50%	6%	6,11	19-20	5,9	5,8	0,1
Три повторення									
95	0,928	0,466	55%	6%	6,3	12	6,0	5,9	0,1
96	0,928	0,466	55%	6%	6,55	12-13	6,1	6,0	0,1
97	0,928	0,466	55%	6%	6,3	12-13	5,9	5,8	0,1
Вплив pH									
103	аж до pH 5,09	0,466	55%	6%	4,94	∞	∞	∞	∞
104	0,610	0,466	55%	6%	4,94	∞	∞	∞	∞
105	0,69	0,466	55%	6%	5,15	6	5,8	5,5	0,3
106	0,928	0,466	55%	6%	6,09/ 6,10°	12	6,1	6,0	0,1
107	0,928	0,466	55%	6%	∞	12	∞	∞	∞
108	0,69	0,630	53,15%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
109	0,69	0,630	55%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
131	0,93	0,466	55%	6%	6,45	12	HB	HB	HB
132	0,94	0,466	55%	6%	6,76	13	6,1	5,8	0,3
136	0,94	0,463	55%	6%	9,36	∞	∞	∞	∞
137	0,94	0,460	55%	6%	9,37	∞	∞	∞	∞
138	0,94	0,457	55%	6%	9,67	∞	∞	∞	∞
139	0,94	0,455	55%	6%	9,92	∞	∞	∞	∞
140	0,94	0,452	55%	6%	10,25	∞	∞	∞	∞
141	0,93	0,466	55%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
142	0,93	0,471	55%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
145	0,93	0,463	55%	6%	7,66/ 7,55°	13	6,1	5,8	0,3
144	0,93	0,460	55%	6%	7,73/ 7,80°	12-13	6,1	6,0	0,1
143	0,93	0,458	55%	6%	7,96/ 7,90°	13-14	6,0	5,5	0,5
124	0,95	0,466	55%	6%	9,48	13	5,9	менше2,85	більше3
Відмінні джерела комерційного адипату									
122	0,92	0,466	55%	6%	6,36	12	6,0	5,9	0,1
123	0,92	0,466	55%	6%	6,32	13	5,8	5,7	0,1

Відмінні джерела комерційної сахарози									
133	0,92	0,466	55%	6%	6,34	13	5,8	5,8	0
147	0,92	0,466	55%	6%	6,32	11-12	6,0	5,7	0,3
134	0,92	0,466	55%	6%	6,34	13	6,3	5,8	0,5
148	0,92	0,466	55%	6%	6,34	11-12	5,8	5,9	0

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2;

НВ = не визначено;

° = повторення

∞ Композицію 45 відбраковували, оскільки антацидна здатність була надто довгою

∞ Композиції 103, 104 та 108, 109 відбраковували, оскільки адипінова кислота викристалізовується при стоянні при 4-8°C

∞ Композиції № 107, 141 та 142 відбраковували, оскільки вони були подібними вже визначеній композиції

∞ Композиції № 136-140 відбраковували, оскільки початковий рН був надто високим

II,5,2. Ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прик-

ладі III,1, а антацидну здатність композиції визначено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2,2. Дані показані у таблицях 19, 20, 21 та 22.

Таблиця 20

Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі ( $\log_{10}$ уоо на дозу вакцини)							
	1м*	2м*	3м*	4м*	5м*	6м*	7м*	8м*
63	5,8	5,8	5,5	5,5	5,0			
81		5,5				4,9		
82		5,4				4,9		
83		5,6				5,1	5,0	
91		5,6			5,4	5,3	5,0	
92		5,5			5,3	5,2	5,0	
93		5,6			5,5	5,5	5,2	4,9
94		5,6			4,6			
95		5,6		5,5	5,4	5,4	5,4	5,1
96		5,8		5,8	5,5	5,7	5,7	5,2
97		5,7		5,5	5,4	5,3	5,4	4,9
105					4,8			
106						5,2	4,7	
132				5,8	5,8	5,5		

\*= місяці;

Пусті комірки= не визначено

Таблиця 21

## Вірусна стабільність при 4°C

№	Вірусне титрування		після зберігання при 4°С			С (log <sub>10</sub>	уоо на дозу вакцини)		
		після	1м*	2 м*	4 м*	6 м*	9 м*	12 м*	15м*
	T=0	1w37°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C
63	6,0	5,6	6,0	5,9	6,1	6,0		5,8	
81	5,9	5,7		5,6		5,4		6,0	
82	5,9	5,7		5,7		5,4		5,8	
91	5,9	5,8		5,8		5,7		5,9	
93	6,0	5,7		5,8		5,8		5,8	
	6,0	5,7		5,9		5,9		5,8	
95	6,1	5,8		5,7		6,1		5,7	
97	5,9	5,8		6,1		6,2		5,8	
6,0	5,9		5,9		5,8		5,8	5,9	6,0
6,1	6,0		5,7		5,9		5,9	5,8	6,1
5,9	5,8		5,7		5,8		5,8	5,9	5,9
5,8	5,5				5,9		5,7		5,8
6,1	6,0				6,0		5,8		6,1
6,1	5,8				5,8		5,8		6,1
6,0	5,9				5,8		5,9		6,0
5,8	5,7				5,9		5,8		5,8
5,8	5,8				6,0		5,8		5,8
6,3	5,8				6,0		5,7		6,3
6,0	5,5						5,5		6,0
6,1	6,0						5,4		6,1
6,1	5,8						5,4		6,1

\*= місяці;

Пусті комірки= не визначено

Антацидну здатність композицій 91-94 вимірювали способом Россетта-Райса (дивись Приклад III,2,2), це показує можливості досягнення 8, 12,16, або 20 хвилин при рН більше 4. Дані показані у таблицях 22 та у Фіг.2А.

Таблиця 22

час (хвилин)	Композиція 94	Композиція 93	Композиція 92	Композиція 91
	РН	РН	РН	РН
0	6,11	6,5	6,24	6,37
1	5,11	5,07	4,93	4,79
2	5,03	4,98	4,84	4,67
3	4,96	4,9	4,75	4,56
4	4,90	4,83	4,67	4,45
5	4,85	4,76	4,58	4,34
6	4,79	4,69	4,51	4,23
7	4,74	4,62	4,42	4,12
8	4,68	4,56	4,34	4,00
9	4,63	4,49	4,26	3,86
10	4,57	4,42	4,17	3,70
11	4,51	4,36	4,08	
12	4,46	4,29	3,98	
13	4,40	4,22	3,87	
14	4,35	4,15	3,75	
15	4,29	4,07	3,6	
16	4,23	3,98		

17	4,17	3,88		
18	4,11	3,78		
19	4,05	3,66		
20	3,98			
21	3,91			
22	3,83			
23	3,75			
24	3,65			

На завершення, як спостерігали для інших композицій карбоксилату, у адипатній серії висока величина рН не давала гарної стабільності (дивись, наприклад, композицію 124, котра має рН9,5 та показує більше 2,85 log втрати вірусу після 1 тижня зберігання при 37°C).

Найвище обмеження прийнятності рН є приблизно 8,0 (дивись, наприклад, величину рН7,96, отриману для композиції 143), для котрої спостерігають вірусну втрату 0,5 log після 1 тижня при 37°C.

Придатні межі рН є між приблизно рН5,5 та приблизно рН8 для цих композицій, з найбільш придатними межами між рН6,0 та рН7,7.

Адипатна (матеріал харчової добавки) композиція є гарним компромісом з оптимальними величинами  $pK_a$  ( $pK_{a1}$  5,4 та  $pK_{a2}$  4,43), що дає цільову антацидну здатність (наприклад,  $t=12$  хвилин) для досягнення, застосовуючи розумну кількість матеріалу (приблизно 100мг на дозу). На додаток, ця

кількість сумісна з параметрами розчинності, дозволяючи тим утворення вакцини в об'ємі дози 1,5мл. Це не є можливим з класичними цитратно-фосфатними композиціями внаслідок технічної непрактичності, як-то кристалізації фосфату (дивись порівняльний приклад IV). Вони також сумісні з параметрами токсичності, оскільки дані токсичності низькі (пероральна ЛД<sub>50</sub> у щурів: 5,7г/кг) для адипату порівняно з іншими карбоксилатами.

II,5,3. Вплив титру вірусу у дозі вакцини на вірусну стабільність

Наступний експеримент проводили для визначення впливу початкового титру ротавірусу ( $10^{60}$ ,  $10^{65}$ ,  $10^{52}$ ) у дозі вакцини 1,5мл на стабільність ротавірусу.

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, і визначено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2,2. Дані показані у таблицях 23, 24, та 25.

Таблиця 23

№	NaOH (M)	Адипінова кислота (M)	Цільовий вірусний титр $\log_{10}$ уоо	Сахароза мас. %	PPM* рН при $t=0$	PPM* час при рН > 4 (хвилин)	Вірусний титр при $t=0$ після тижня 37°C (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)		
100	0,928	0,466	6,0	55%	6,59	12	6,0	5,7	0,3
101	0,928	0,466	6,5	55%	6,96	12	6,7	6,5	0,2
102	0,928	0,466	5,2	55%	6,45	12	5,4	5,4	0

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом MI,2,2.

Таблиця 24

Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
	1м*	2м*	3м*	4м*	5м*	6м*	7м*	8м*	9м*	10м*
100					5,4	5,0				
101					6,0	5,5				
102					4,9	4,4				

\*= місяці; пусті комірки= не визначено

Таблиця 25

## Вірусна стабільність при 4°C

№	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня при 37°C	1м*	2м*	3м*	4м*	6м*	12м*
100	6,0	5,7					6,0	5,8
101	6,7	6,5					6,6	6,4
102	5,4	5,4					5,3	5,2

\*= місяці; пусті комірки= не визначено

На завершення, у визначених межах ротавірусна стабільність залишається подібною та прийнятною при будь-якому початковому вірусному титрі.

II,5.4. Композиції з адипатом у присутності іонів кальцію

Повідомлено, що кальцій може впливати на стабільність та конформацію глікопротеїну VP7 ротавірусу SA11, експресованого у *Dictyostelium discoideum* (K.R. Emslie et al., 1996, Journal of Biotechnology 50, 149-159). Може бути корисним додавати іони кальцію до ротавірусної рідкої композиції винаходу з адипатом, оскільки вона може сприяти стабілізації ротавірусу у композиції. Відповідно, різні кількості іонів кальцію тестовано у композиції з адипатом (Таблиця 26). Дві альтернативи тестовано:  $\text{CaCl}_2$  та  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Композиції 98, 116-118: до 9,28г NaOH послідовно додають: воду (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г), 17,00г адипінової кислоти,  $\text{CaCl}_2$ , як встановлено у таблиці 26, (осадження відбувається, але осад знов розчиняється через одну годину перемішування при кімнатній температурі, окрім композиції №117), та 178,75г сахарози. Решта етапів композиції ідентичні

описаним для композиції 82. У цій композиції вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 99: до води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають:  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , як встановлено у таблиці 26, 17,00г адипінової кислоти, 9,02г NaOH та 178,75г сахарози. Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 82. У цій композиції вміст DMEM 6мас.%. Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визначено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2.2. Дані показані у таблицях 26, 27 та 28.

Композиції 119-121: до  $\text{CaCl}_2$ , як встановлено у таблиці 26, послідовно додають: воду (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г), 9,28г NaOH (у цьому випадку осадження  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  відбувалося, але осад знов розчиняється після додавання адипінової кислоти окрім композиції №121), 17,00г адипінової кислоти та 178,75г сахарози. Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 82. У цій композиції вміст DMEM 6мас.%.

Таблиця 26

№	NaOH (M)	Адипінова кислота (M)	$\text{CaCl}_2$ (M)	Сахароза мас. %	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня при 37°C	Вірусна втрата після 1 тижня при 37°C
(log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
98	0,928	0,466	0,013	55%	6,59	12-13	6	5,8	0,2
118	0,928	0,466	0,004	55%	6,96	12	6,1	5,8	0,3
116	0,928	0,466	0,0129	55%	6,45	12	5,9	5,8	0,1
119	0,928	0,466	0,0132	55%	6,36	12	5,9	6	0
117	0,928	0,466	0,018	55%	∞	∞	∞	∞	∞

120	0,928	0,466	0,019	55%	6,18	11-12	6	5,8	0,2
121	0,928	0,466	0,051	55%	∞	∞	∞	∞	∞
			Ca(OH) <sub>2</sub> (M)						
99	0,902	0,466	0,0086	55%	6,54	13-14	5,8	5,7	0,1

\* оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.

∞ Композиції 117 та 121 відбраковували, оскільки відбувалося деяке осадження нерозчинного матеріалу протягом їх отримання

Таблиця 27

## Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
	1м*	2м*	3м*	4м*	5м*	6м*	7м*	8м*	9м*	10м*
98					5,5	5,7	5,5	5,2		
118					6,0	5,7				5,0
116					5,9	5,6				5,1
119					5,8	5,3				
120					5,7	5,1				
99					5,4	5,4	5,2	4,9		

\*= місяці; пусті коюмірки= не визначено

Таблиця 28

## Вірусна стабільність при 4°С

№	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня при 37°С	1м*	2м*	3м*	4м*	6м*	12м*
98	6	5,8					5,8	6,0
118	6,1	5,8					6,2	6,1
116	5,9	5,8					5,9	6,1
119	5,9	6					5,9	5,9
120	6	5,8					5,9	5,9
99	5,8	5,7		5,9	5,9	99	5,8	5,7

\*= місяці; пусті коюмірки= не визначено

Висновок: показано стабільність ротавірусу у присутності іонів кальцію: не більше 0,3 log втрати спостерігають після 1 тижня при 37°С, що подібно результату, отриманому для композицій, зроблених у тих же умовах, що містять ті ж інгредієнти крім доданих іонів кальцію (дивись, наприклад, композицію 83 у таблицях 19-21).

II,5,5 Композиції з адипатом у присутності пероральних поліо-вірусів

Деякі схеми звичайної імунізації можуть поєднувати у той же час пероральну поліо- та ротавірусну вакцинацію. Об'єктом наступного експерименту була оцінка, чи є обидві вакцинації сумісними. Експериментальна пероральна поліо/ротавірусна поєднана вакцина була тому отримана.

Композицію OPV-середовища застосовували для композицій 149,151-155

Вода для ін'єкції: 80,00л  
 Лактальбумін гідролізат: 1500,00г  
 Вода для ін'єкції: 200,00л  
 Натрій хлорид: 2040,00г  
 Калій хлорид: 120,00г  
 Магній сульфат 7·H<sub>2</sub>O: 30,00г  
 KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>: 38,00г  
 Безводна глюкоза: 1200,00г  
 Неоміцин сульфат: 15,00г  
 Твін 80: 6,00г  
 Кальцій хлорид·2H<sub>2</sub>O: 80,00г  
 Натрій гідроксид: 30,00г  
 Натрій гідрокарбонат: 660,00г  
 Фенол червоний: 6,00г  
 L-цистин: 30,00г  
 Хлоридна кислота 1N: 550,00г  
 Поліміксин В сульфат: 30,00г

Вода для ін'єкції до 300,00л  
 Композиції 149-155: До води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: NaOH та адипінову кислоту у кількості, описаній у таблиці 29, та 178,75г сахарози. Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм у стерильних умовах, та додавали кількості, як описано у таблиці 29, середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>6,5</sup> ІДКК50 на дозу та OPV-середовища, що містять обов'язкову кількість поліо-вірусів для отримання 10<sup>6,6</sup> типу I, 10<sup>5,6</sup> типу II, 10<sup>6,1</sup> типу III ІДКК50 на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Утворену суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цих прикладах вміст DMEM 6мас.%, сахарози 55мас.%, NaOH 0.92M, адипінової кислоти 0.466M.

Таблиця 29

	NaOH	Адипінова кислота	вода	Ротасередовище DMFM	Ротавірус	OPV-середовище	OPV Тип I	OPV ТипII	OPV Тип III
	г	г	г	г	г	г	г	г	г
149	9,2	17	92,55	19,5	-	8,00	-	-	-
150	9,2	17	100,55	14,24	5,26	-	-	-	-
151	9,2	17	92,55	14,24	5,26	8,00	-	-	-
152	9,2	17	92,55	19,5	-	0,07	5,30	0,53	2,10
153	9,2	17	92,55	19,5	-	2,70	5,30	-	-
154	9,2	17	92,55	19,5	-	7,47	-	0,53	-
155	9,2	17	92,55	19,5	-	5,90	-	-	2,10

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визначено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2,2. Дані показані у таблиці 30.

Таблиця 30

У цій таблиці: усі вірусні титри надані у ІДКК50/дозу\*\*

	PPM* хвилин	Цільовий Рота	Цільовий OPV Тип I	Цільовий OPV Тип II	Цільовий OPV Тип III	Рота Титр t=4°C	Рота Титр 1 тижд. 37°C	OPV I титр	OPV II титр	OPV III титр
149	12	нема	нема	нема	нема					
150		10 <sup>6,5</sup>	нема	нема	нема	10 <sup>6,2</sup>	10 <sup>6,2</sup>			
151		10 <sup>6,5</sup>	нема	нема	нема	10 <sup>6,3</sup>	10 <sup>6,3</sup>			
152		нема	10 <sup>6,6</sup>	10 <sup>5,6</sup>	10 <sup>6,1</sup>			10 <sup>6,7</sup>	10 <sup>5,6</sup>	10 <sup>6,2</sup>
153		нема	10 <sup>6,6</sup>	нема	нема					
154		нема	нема	10 <sup>5,6</sup>	нема					
155		нема	нема	нема	10 <sup>6,1</sup>					

\*оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.

\*\* Можна оцінити, що відповідність між уоо та ІДКК50 є приблизно 0,5 log (наприклад 10<sup>6,0</sup>, що виражено у ІДКК50, еквівалентна приблизно 10<sup>5,5</sup>, що виражено у уоо на дозу).

Пусті комірки: не визначено

"нема" означає, що відповідний вірус не уведено у формулу

Висновки:

1) Поліо-середовище є сумісним з антацидною здатністю (PPM 12 хвилин у композиції №149).

2) Поліо-середовище є сумісним з ротавірусом (порівнюючи композицію №150 з композицією №151, де можна бачити, що ті ж титри отримані

для обох композицій, при t=0 4°C та після одного тижня при 37°C).

3) Ротавірусна композиція є сумісною з поліо-вірусом (отримано очікуваний поліо-вірусний титр у композиції № 152).

II,5,6 Стабільності композицій з адипатом при заморожуванні

II,5,6,1. Заморожування при -20°C

Ротавірусну композицію №95, після 6 місяців зберігання між +4°C та +8°C піддавали з послідовним заморожуванням (-20°C) згідно з наступним розрахунком часу (Таблиця 31)

II,5,6,2. Заморожування при -70°C

Ротавірусну композицію №95, після 14 місяців зберігання між +4°C та +8°C піддавали одному заморожуванню при -70°C згідно з наступним розрахунком часу (Таблиця 31):

Таблиця 31

t=0 (після 6 місяців при 4-8°C)		9 пляшечок	
t=120 доби	Назад від -20: 9 пляшечки		
t=120 доби	3 пляшечки: 1x-20°C	6 пляшечок	
t=196 доби	Назад від -20: 6 пляшечки		
t=197 діб	3 пляшечки: 2x-20°C	3 пляшечки	
t=224 доби	Назад від -20: 3 пляшечки: 3x-20°C		
Тривалість при -70°C			
t=0 (після 14 місяців при 4-8°C)			3 пляшечки
t=15 діб	Назад від -70: 3 пляшечки 1x-70°C		

Зразки аналізували та порівнювали з вірусним титром при t=0 (4°C), а також з вірусним титром зразків того ж віку, що зберігали при звичайній температурі холодильника (15 місяці при +4°C у цьому випадку). Дані показані у таблиці 32.

Таблиця 32

	t=0, 4°C	t=15 місяці, 4°C
№95	6,0	5,9
№95 1x-20°C		5,8
№95 2x-20°C		5,9
№95 3x-20°C		5,9
№95 1x-70°C		5,9

На завершення, композиція №95 (з адипатом) є сумісною з принаймні 3 послідовними заморожуваннями при -20°C, а також сумісною з принаймні одним заморожуванням при -70°C.

II,6. Композиції з малатом як карбоксилатом

II,6,1. Композиції, представлені у таблиці 33 (виключено композиції 46, 64, 84, 85 та 86) зроблено у загальній кількості 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: D.L-яблучна кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40).

Композицію №46 зроблено у загальній кількості 44г (35мл), що представляє 20 доз по 1,75мл (2,2г) кожна. Антацидні матеріали: D.L-яблучна кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40).

Композиція 46: до 15,74г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 4,0211г яблучної кислоти та 19,5г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>6,0</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композицію №64 зроблено у загальній кількості 318,4г (244,5мл), що представляє 163 дози по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: D.L-яблучна кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40). Композицію №84 зроблено у загальній кількості 130г (100мл), що представляє 66,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: D-яблучна кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40). Композицію №85 зроблено у загальній кількості 130г (100мл), що представляє 66,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: L-яблучна кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40). Композицію №86 зроблено у загальній кількості 130г (100мл), що представляє 66,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Антацидні матеріали: D.L-Яблучна кислота (Мм 146), NaOH (Мм 40).

Композиція 64: до 97,3г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 318,4г) послідовно додають: 14,6г NaOH, 24,50г яблучної кислоти та 162,5г сахарози (51мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання 10<sup>6,0</sup> уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6,12мас.%.

Композиція 71: до 103,9г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325 отримання) послідовно додають: 14,90г NaOH, 25,00г адипінової кислоти та 162,5г сахароз (50мас.%). Решта етапів композиції ідентичні описаним для композиції 67. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиції 72-77. 84-86: це робили як для композиції 71, але з підігнаними кількостями (дивись таблицю 33).

Композиція 78: до 75,00г води послідовно додають: 8,00г NaOH, 25,00г яблучної кислоти, достатню кількість 1Н розчину NaOH для досягнення pH6,48, додаткову воду для досягнення 325г та 162,50г сахарози (50мас.%). Решта етапів компо-

зиції ідентичні описаним для композиції 67. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас. %.

Композиції 79 та 80: це робили як для композиції 78, але з підігнаними кількостями (дивись таблицю 33).

Таблиця 33

№	NaOH (M)	Яблучна кислота (M)	Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН>4 (хвилин)	Вірусний титр при t=0  (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)	Вірусний титр після 1 тижня при 37°C	Вірусна втрата після 1 тижня при 37°C
46	1,71	0,787	44%	6%	6,92	20	6,0	5,9	0,1
64	1,490	0,747	51%	6,12%	6,08	11-12	6,0	5,9	0,1
71	1,490	0,746	50%	6%	5,67	11	5,9	5,8	0,1
72	1,240	0,621	50%	6%	6,15/ 6,16°	8	5,8	5,8	0
73	2,00	0,918	50%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
74	1,490	0,746	53%	6%	5,19	8	5,8	5,8	0
75	1,490	0,746	56%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
76	1,79	0,896	47%	6%	5,21	14	5,7	5,8	0
77	1,79	0,896	44%	6%	5,35	15	5,8	5,9	0
78	аж до рН	0,746	50%	6%	7,1/ 7,05°	9	5,9	5,6	0,3
79	аж до рН	0,746	50%	6%	6,42/ 6,41°	9	5,9	5,5	0,4
80	аж до рН 7,05	0,746	50%	6%	7,43	9-10	6,0	5,4	0,6
86	1,490	0,746	50%	6%	5,82	11	6,1	5,8	0,3
84	1,490	0,746	50%	6%	5,82	11	5,8	5,8	0
85	1,490	0,746	50%	6%	6,03	11	5,7	5,7	0

\*оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2;

\*= повторення

∞Композицію 73 відбракували, внаслідок труднощів при стерильному фільтруванні внаслідок високої в'язкості розчину

∞Композицію 75 відбракували внаслідок повільного розчинення сахарози

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визна-

чено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2,2. Дані показані у таблицях 33, 34 та 35.

Таблиця 34

## Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі ( $10_{10}$ уоо на дозу вакцини)									
	1м*	2м*	3м*	4м*	5м*	6м*	7м*	8м*	9м*	10м*
64	5,8	5,9	5,6	5,7	5,2	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ
85	НВ	5,7	5,2	НВ	НВ	4,7	НВ	НВ	НВ	НВ

\* = місяці;

НВ = не визначено

Таблиця 35

## Вірусна стабільність при 14°C

№	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня при 37°C	1м*	2м*	3м*	4м*	6м*	12м*
64	6,0	5,9	5,8	5,8	НВ	5,8	НВ	5,5
85	5,7	5,8	НВ	5,8	НВ	НВ	5,6	5,7

\* = місяці;

НВ = не визначено

II,6,2. Ротавірусна стабільність та антацидна здатність - дані

Ротавірусна стабільність у рідкій композиції з малатом пов'язана з рН. Межі рН, що досліджували, тобто межі рН6,0-7,0, дають гарну стабільність протягом 1 тижня при 37°C

## II,7. Композиції з глутаматом

Аспартат та глутамат є амінокислотами з карбоксильною групою у їх бічному ланцюгу. Величини  $pK_a$  цих карбонових кислот з бічним ланцюгом 3,65 та 4,25, відповідно.

Таким чином, глутамат з  $pK_a$  вище 4 можна застосовувати як буфер для створення антацидної здатності. Дивись таблицю 36.

Композиції 41: До води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: NaOH, глутамінову кислоту та сахарозу у кількості, як описано у таблиці 36. Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ро-тавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Утворену суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 43: До води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 7,1г моноватрий глутамату  $1H_2O$  та 19,50г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах 2,64г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають до розчину, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл

або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 61: До води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 52,43г моноватрий глутамату  $1H_2O$  та 144г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають до розчину, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 68: До води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 250г) послідовно додають: 0,2г моноватрий глутамат  $1H_2O$ , 2,5г альбумін сироватки корови, 0,250г  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,125г  $KH_2PO_4$ , 0,5г ЕДТА та 18,75г сахарози (7,5мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають до розчину, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або близькою до 1,5г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 7,8мас.%.

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визначено наступним протоколом, наданим у прикладі III,2,2. Дані показані у таблицях 36, 37 та 38.

Таблиця 36

№	NaOH (M)	глю- тамі- нова кис- лота (M)	Сахароза мас. %	DMEM мас. %	PPM* рН при t=0	PPM* час при рН бі- льше 4 (хви- лин)	Вірус- ний титр при t=0  (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)	Вірусний титр після 1 тижня при 37°C	Вірусна втрата після 1 тижня при 37°C
41	1,06	0,542	51%	6%	10,36	15	∞	∞	
	Na глутамат								
43	1,088		44%	6%	6,92	12	6,0	5,8	0,2
61	1,085		44%	6%	6,93	11-12	6,1	6,1	0
68	0,0043		7,5%	7,8%	6,85	менше 1	6,0	менше 3	більше 3

\*оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2.

∞ Композицію 41 відбракували, оскільки її початковий рН був високим

∞ Композицію 68 відбракували від довго-термінового дослідження стабільності внаслідок її незадовільної вірусної втрати після 1 тижня при 37°C

Таблиця 37

Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (log <sub>10</sub> уоо на дозу вакцини)									
	1м*	2м*	3м*	4м*	5м*	6м*	7м*	8м*	9м*	10м*
41										
43										
61	6,1	5,7	5,6							
68										

\*= місяці;  
пусті комірки= не визначено

Таблиця 38

Вірусна стабільність при 4°C

№	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр після 1 тижня при 37°C	1м*	2м*	18м*
41					
43					
61	6,1	6,1	6,1	6,0	5,6
68					

\*= місяці;  
пусті комірки= не визначено

Ротавірусна стабільність у рідкій композиції з глутаматом подібна стабільності, отриманій з іншими карбоксилатами, описаними вище. Коротше:

- стабільність є кращою при рН приблизно 7 (6,93 у композиції №61) порівняно з більш лужним середовищем (рН10,36 у композиції №43)
- стабільність є також кращою при високому вмісті сахарози (44% сахарози у композиції №61 порівняно з 7,5% сахарози у композиції №68)

- криві профілю стабільності при 1 тижні при 37°C, при кімнатній температурі та при 4-8°C подібні до інших карбоксилатів, описаних вище.

#### II.8. Композиції з фумаратом

Композиція 44: до 16,28г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 3,4811г фумарової кислоти та 19,5г сахарози (44мас.%). Після години

перемішування при кімнатній температурі нерозчинний матеріал залишається у суспензії. Препарат відбраковували.

#### II.9. Композиції з лактобіонатом

Композиція 47: до 16,02г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 1,2г NaOH, 10,7414г лактобіонової кислот та 13,7г сахарози (31мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

#### II.10. Композиції з малеатом

Композиція 48: до 16,88г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 2,8821г малеїнового ангідриду та 19,5г сахарози (44мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

Композиція 57: до 110,3г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) послідовно додають: 32,7г динатрій малеату та 162,5г сахарози (50мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 19,5г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,5мл або 1,95г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

#### II.11. Композиції з глюкоронатом

Композиція 49: до 16,14г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 1,2г NaOH, 5,8211г глюкуронової кислот та 18,5г сахарози (42мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

#### II.12. Композиції з галактуронатом

Композиція 52: до 16,14г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 1,2г NaOH, 5,8218г галактуронової кислот та 18,5г сахарози (42мас.%). Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл

або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

#### II.13. Композиції з галактаратом

Композиція 53: до 15,96г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 6,3008г галактарової кислот та 17,0г сахарози (38мас.%). Після години перемішування при кімнатній температурі нерозчинний матеріал залишається у суспензії, препарат відбраковували.

#### II.14. Композиції з тартратом

Композиція 55: до 15,26г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 44г) послідовно додають: 2,4г NaOH, 4,4996г винної кислот та 19,5г сахарози (44мас.%).

Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. У стерильних умовах додають 2,34г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. У цьому випадку дозою є 1,75мл або 2,2г. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому прикладі вміст DMEM 6мас.%.

II.15. Загальний висновок для композицій, що містять карбоксилат у відсутності доданого фосфату

Кілька стабільних композицій отримані з різними карбоксилатами у відсутності доданого фосфату. Тільки фосфат наявний у цих експериментальних композиціях, похідних від буферу DMEM та ніколи не перевищує 0,059мМ (5мас.% DMEM), 0,071мМ (6мас.% DMEM), або 0,094мМ (8мас.% DMEM). Усі тестовані карбоксилати показали здатність діяти як буферувальні засоби у нейтралізації шлункової кислотності, тим попереджуючи або мінімізуючи інактивацію активного інгредієнту, тобто ротавірусного антигену, наявного у композиції. Усі тестовані композиції, зроблені при різних об'ємах дози (тобто 1,5мл, 2,0мл та 2,5мл), виявляли рН між приблизно 5,0 та 8,0, а для більшості композицій рН приблизно 5,5 -7,5. Ці композиції добре працюють при тестуванні стабільності при трьох тестованих температурах зберігання (тобто 37°C, кімнатна температура або 4°C). На додаток, ці композиції виявляли задовільну антацидну здатність, тобто антацидну здатність принаймні 8 хвилин, а для більшості композицій принаймні 12 хвилин, як оцінено тестом PPM (дивись спосіб у прикладі III,2,2).

У наступній таблиці 39 представлено короткий перелік даних стабільності, отриманих для вибраних композицій з адипатом згідно з рН композиції. Наступні критерії були оцінено: i) вірусну втрату після зберігання протягом одного тижня при 37°C (прискорена стабільність) (\*), ii) час, виражений у місяцях, у межах котрого втрата вірусного титру залишається нижче 1,0log (після зберігання при кімнатній температурі) разом з вірусним титром, досягнутим при згаданому часі (\*\*), iii) вірусний титр у уоо/дозу вакцини досягнутий після зберігання протягом одного року (12 місяців) при 4°C (\*\*\*).

Таблиця 39

	pH <sup>s</sup>	Вірусна втрата після 1 тижня 37°C	*		Кімнатна T° менше 1 log	**	4°C 12M	***		****
сахароза 45%										
82	6,39	0,2			6M4,9		5,8			
сахароза 50%										
63	6,49	0,4			5M5,0		5,8			
81	6,2	0,2			6M4,9		6			
сахароза 55%										
124	9,48	>3			не зробл.					
143	8	0,5	////		не зробл.		5,5	////		////
144	7,75	0,1			не зробл.		5,4	////		////
145	7,35	0,3			не зробл.		5,4	////		////
132	6,76	0,3			6M5,5		5,8			
96	6,55	0,1			8M5,2		5,9			
83	6,38	0,1			7M5,0		5,9			
95	6,3	0,1			8M5,1		5,8			
97	6,3	0,1			8M4,9		5,8			
106	5,97	0,1			6M5,2		5,8			
105	5,98	0,3			5M4,8	//////////	5,7			
104	5,12	0,2		Кристаліз. ■						
103	5,09	0,4		Кристаліз. ■						

M=місяці

<sup>s</sup> = pH, як оцінено при T=0 (4°C) тестом PPM згідно з прикладом III,2,2

\* найкращі дані на основі тесту стабільності протягом 1 тижня при 37°C - максимум втрати вірусного титру 0,5 log є дозволеним

\*\* найкращі дані на основі тесту стабільності при кімнатній температурі - максимум втрати вірусного титру 1,0 log є дозволеним

\*\*\* найкращі дані на основі тесту стабільності при 4-8°C - максимум втрати вірусного титру 0,5 log є дозволеним

\*\*\*\* сукупні найкращі дані - втрата вірусного титру  $\geq 0,5$  log, але менше 1,0 log, а втрата титру менше 0,5 log є дозволеними та прийнятними згідно з цими критеріями

Сіре штрихування: прийнятна композиція стосовно критеріїв, оцінених (\*, \*\*, \*\*\* або \*\*\*\*) з вірусною втратою менше 0,5 log;

Штрихова комірка: прийнятна композиція стосовно критеріїв, оцінених (\*, \*\*, \*\*\* або \*\*\*\*) з вірусною втратою  $\geq 0,5$  log, але менше 1,0 log;

Зрозуміло, у тестованій композиції з адипатом межі pH приблизно 6,0-8,0 виявляли гарний, при-

йнятний профіль стабільності, сумісний з максимумом втрати вірусного титру 1,0 log, а pH - приб-

лизно 6,0-6,8 гарний, прийнятний профіль стабільності, сумісний з максимумом втрати вірусного титру 0,5 log.

#### Приклад III - Способи

##### III,1 Вірусне титрування ротавірусу

Визначення інфекційних ротавірусів роблять інкубацією композиції, що містить ротавірус та різні компоненти на рекомендованих клітинах MA104 (ATCC CRL 2378).

Ротавірус (наприклад, ротавірус P43, ЕКАСС 99081301) створювали, як описано у прикладах вище. Після окулірування вірусних зразків, клітини інкубують протягом 16-18 годин. Клітини тоді фіксують та промивають 80% ацетоном. Інфіковані клітини ідентифікують опосередкованою імунофлуоресценцією, застосовуючи моноклональне антиротавірусне антитіло, специфічне до білку VP6 (Mab 9F6), визначуване флуоресцеїн-супраженим IgG, та перевіряють під УФ-мікроскопом. Будь-які комерційно доступні моноклональні антитіла проти білку ротавірусу VP6 придатні, а доречні робочі розбавлення визначають звичайним експериментом. Наприклад, придатні наступні моноклонілі:

- RV 11-2 (IgG2a, рідина, спряжена з флуоресцеїн-ізотіоціанатом) від Rural Technologies Inc (www.ruraltechinc.com)

- 5F8 F9 (IgG1, номер за каталогом RVM-1601 A-5) або 2F2 19 (IgG2b, номер за каталогом RVM-1601 B-5) від Austral Biologicals (www.australbiologicals.com)

- MABR10 (фракція IgG) від Immunological and Biochemical testsystems GmbH (www.afsbio.com)

Анти-Vp6 ротавірусні поліклональні антитіла, наприклад, AB1129F від Chemicon (www.chemicon.com) також придатні.

Кожний флуоресцентний осередок відповідає одному інфекційному вірусу. Титри виражають як логарифм утворюючих осередки одиниць на мл (log (уоо/мл)). Точність вірусного титрування є приблизно + або - 0,2 log. Дані вірусного титрування в уоо/мл перетворюють в уоо/дозу згідно з початковим об'ємом дози зразку. Усі дані представлені у таблицях у log з основою 10 (log<sub>10</sub>) уоо на дозу.

Гарними є результати, де досягають зниження менше 0,5 log протягом "1 тижня при 37°C" (прис-

корений тест стабільності). Композиції, котрі виявляють вірусну втрату 1 log або вище, відбраковують від наступних тестувань стабільності.

##### III,2 Спосіб антацидного виміру: Титрування Россетта-Райса малюків (PPM)

###### III,2,1. Уведення

Тест-титрування Россетта-Райса малюків (PPM) адаптовано для популяції малюків від тест-титрування Россетта-Райса, спочатку розроблено-го для популяції дорослих.

Титрування Россетта-Райса є добре відомим тестом, застосовуваним у сфері антацидів (дивись N. E. Rossett та Marion L. Rice у Gastroenterology, 1954 об'єм 26 pages 490-495: 'An in vitro evaluation of the efficacy of the more frequently used antacids with particular attention to tablets'). Титруванням Россетта-Райса вимірюють швидкість реакції антацидної речовини при тестуванні з 0,1N хлоридною кислотою та тривалість підвищеного pH. Для імітації умов у пустому шлунку, нову хлоридну кислоту додають безпосередньо на початку виміру. Для імітації умов у шлунку протягом процесу травлення, нову хлоридну кислоту додають при постійній швидкості до реакційної суміші при тестуванні.

Коротше, титрування дорослих Россетта-Райса поділяють на дві частини:

- початкове додавання 30мл 0,1N HCl, що представляє вміст кислоти у пустому шлунку;

- потім безперервне додавання при швидкості 4мл/хвилини 0,1N HCl, що є імітацією секреції кислоти у шлунку протягом травлення.

Ці експериментальні умови звичайно розглядають як показові стосовно середнього шлунка дорослого.

###### III,2,2. Дослідження малюків титруванням Россетта-Райса

На основі стандартних умов Россетта-Райса, як описано в оригінальному способі, тест адаптували для шлунка малюка віком 6 місяців, і він є нижче визначеним Дослідженням малюків титруванням Россетта-Райса (PPM).

Згідно з Geigy Scientific Tables (Volume 1 page 126, Ciba-Geigy 1981, eds), наступні дані представляють інтерес, оскільки розглянуто екскрецію HCl у шлунку (дивись таблицю 40):

Таблиця 40

	Основний вихід кислоти		Максимальний вихід кислоти	
Діти	Середні	Екстремальні межі	Середні	Екстремальні межі
9-11 тижнів	0,149ммоль/годину	0,05-0,30ммоль/годину	0,56ммоль/годину	0,39-0,84ммоль/годину
6-7 місяці	0,193ммоль/годину	0,07-0,40ммоль/годину	2,08ммоль/годину	1,33-2,88ммоль/годину

Таким чином, на основі цих даних, ми вибрали найбільш суворі умови для охоплення усіх ситуацій:

- Початкова кількість HCl: 0,40ммоль (4мл 0,1N HCl)

- Безперервне додавання 0,1N HCl: 2,90ммоль/годину (або 0,048ммоль/хвилину). на

практиці застосовують швидкість 0,5мл/хвилину 0,1N HCl.

Схему експериментальної структури PPM показано у Фіг.2В.

Таблиця 41 підсумовує відмінність між PPM порівняно з оригінальним опублікованим способом.

Таблиця 41

Посилання	- Gastroenterology 1954 vol. 26 pages 490-495. - дивись також Антацидний тест у Фармакопеї	- неопубліковані дані GSK - Величини для швидкості секреції шлункової HCl для немовлят узяті від Geigy Scientific Tables (Volume 1 page 126).
Застосування для:	Дорослих	немовлят 6 місяців
Температура протягом тесту	37°C	37°C
Об'єм мензурки	400мл	50мл
Початковий об'єм води	70мл	8,5мл якщо антацидний зразок 1,5мл 8,0мл якщо антацидний зразок 2,0мл 7,5мл якщо антацидний зразок 2,5мл
Антацидна кількість	Еквівалент - 0,330г Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Змінна згідно з тестованим зразком, а об'єм дози, звичайно між 0,8 та 1,8 мілі-еквівалентом HCl
Початкова 0,1N HCl кількість додана при t=0	30мл	4мл
Швидкість додаткової доданої 0,1 N HCl протягом виміру	4мл/хвилину	0,5мл/хвилину
Час виміру для досягнення pH:	pH=3	pH=4
Звичайні дані	3-4 години вище pH3	8-20 хвилин вище pH4

III,2,2,1. Робочий спосіб дослідження PPM  
Структуру експерименту представлено у Фіг.2B.

1° застосовуючи мензурку 50мл, поміщають у ній достатню кількість води для ін'єкції, щоб мати після етапу №4 (тут після) кінцевий об'єм рідини 10мл.

2° Розміщення мензурки у водяній бані.

3° Температуру водяної бані підганяють для отримання 37°C у мензурці.

4° Зразок антациду для виміру додають до мензурки.

5° Вимір величини pH на цьому етапі представляє "початковий pH" (the t=0 у даних таблиць).

6° Додають 4мл 0,1N HCl (0,40ммоль), а у той же час запускають годинник та насос (безперервне додавання 0,5мл/хвилину 0,1N HCl). Ці три дії повинні відбуватися у межах 5 перших секунд від початку.

7° Реєструють величину pH у часі, доки не отримують pH4. За вибором оператора зниження pH можна продовжити до pH3 (як у оригінальному способі Россетта-Райса), але доречно антацидну здатність реєструють після pH4.

8° Зупиняють годинник та насос. N1,2,2,2. Експериментальні дані

Експериментальні дані представлені у Таблиці, наприклад, дивись таблицю 22, з котрої можна створити графік, наприклад, дивись Фіг.2A.

III,2,2,3. Інтерпретація даних

Ротавірус руйнується при pH нижче 4. Тоді для захисту вірус розглядають час, коли pH вище pH4. Результат титрування малюків способом Россетта-Райса (PPM) виражають у хвилинах. Це час,

для котрого величина pH вище 4, тобто таким чином він має назву антацидна здатність композиції. У деяких випадках реєструють дві величини (наприклад, 11-12 хвилин як-то у таблиці 22 композиції №92, де при 11 хвилині pH був 4,08, а при 12 хвилині pH3,98, вказуючи, що результат при pH4,00 був ближче до 12 хвилин ніж до 11 хвилин.).

III,2,2,4. Калібрування

Температуру вимірюють каліброваним термометром (-10°C - +50°C). pH метр калібрують, застосовуючи стандартні буфери при pH7 та pH4, що комерційно доступні.

Швидкість насоса підганяють вимірами об'єму проти часу для отримання 0,5мл/хвилину. Перистальтичний насос є 8-роlikовою моделлю від Ismatec S.A. Модель MS-Reglo. Для запобігання утворення крапель кінець трубки розміщають вздовж стінки мензурки вище рівня рідини.

Хлоридною кислотою 0,1N є комерційний стандартний розчин для титрування.

Відомий стандартний буферний розчин застосовують для перевірки експерименту перед аналізом невідомих антацидних зразків. Цей стандартний буферний розчин зроблено розчиненням 24,066г тринатрій фосфат додекагідрату (продукт Merck №1,06578,1000) у достатній кількості води для отримання 1л розчину. Звичайно, 10мл цього розчину даватиме pH9,0, що відбувається між хвилинами n° 6 та 7 (перший перехід pH фосфату) та pH4,0, що відбувається між хвилинами №19 та 20 (другий перехід pH фосфату) у таким чином описує титрування малюків способом Россетта-Райса. Дані показані у таблиці 42.

Таблиця 42

	Час (хвилин)	10мл при 24,066г/л Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O РН	10мл води без анта- циду РН
	0	12,4	5,94
	1	11,7	1,31
	2	11,58	1,23
	3	11,44	1,18
	4	11,27	1,14
	5	11,02	1,11
перший перехід рН	6	10,6	1,10
	7	8,86	1,07
	8	7,95	1,05
	9	7,6	1,03
	10	7,38 j	1,01
	11	7,19	0,99
	12	7,03	0,98
	13	6,88	0,97
	14	6,74	0,96
	15	6,58	0,95
	16	6,41	0,95
	17	6,21	0,94
	18	5,93	0,93
другий пе- рехід рН	19	5,45	0,92
	20	3,47	0,91
	21	2,88	0,90
	22	2,62	0,89
	23	2,44	0,88
	24	2,3	0,87
	25	2,18	0,87
	26	2,09	0,86
	27	2,01	0,86
	28	1,93	0,86
	29	1,87	0,85
	30		

## III,3 Вимір індексу рефракції даної композиції

Кілька композицій, показаних у заявленому винаході отримані у невеликому об'ємі (об'єм дози 1,5мл, наприклад, та нижче), містять високу концентрацію сахарози (наприклад, 55%) та ще повинна погоджуватися з потребами стабільності та антацидної здатності. Може бути суттєвим тому, щоб композиція було успішно отримано, та щоб було досягнуто повне розчинення кожної складо-

вої. Одним простим шляхом до цього є вимір індекс рефракції композиції. Індекс рефракції є добре відомим простим виміром, котрий можна застосовувати на етапі карбоксилатного буферу (перед додаванням ротавірусу), а також на етапі кінцевої композиції (після додавання ротавірусу).

## III,3,1. Спосіб

Індекс рефракції водних розчинів є стандартним способом визначення концентрації сахарози у розчині. Таблицю індексів рефракції у порівнянні з концентрацією сахарози можна знайти у довіднику Chemistry та Physics 70<sup>th</sup> edition 1989-1990 CRC Press page E 386.

Застосовуючи рефрактометр GPR 11-37, краплю розчину розміщують на приладі та реєструють індекс рефракції. Воду застосовують як стандарт для перевірки приладу (індекс рефракції 1,3330).

Кілька композицій з адипатом, що містять різні кількості сахарози отримували та піддавали виміру індексу рефракції. Повторювали вимір.

## III,3,22. Дані

Дані цих виміри показані у Фіг.Фіг.3А та 3В. На завершення, у вікні тестованих концентрацій є лінійна кореляція між концентраціями цукру та інших розчинних інгредієнтів та виміряним індексом рефракції.

Наприклад, у композиції №95, після повного розчинення інгредієнтів на етапі карбоксилатного буферу (перед додаванням ротавірусу) буде отримано індекс рефракції 1,4578 (цільова концентрація сахарози 58,5мас.% у цьому випадку); у той час, як на кінцевому етапі композиції (після додавання ротавірусу або додавання 6мас.% DMEM у випадку плацебо) буде отримано індекс рефракції 1,4480 (цільова концентрація сахарози 55мас.% у цьому випадку). В обох випадках виміряний індекс рефракції є вищим від отриманого для індексу 58,5% (індекс рефракції 1,4385) або 55% (індекс рефракції 1,4307) розчину сахарози у воді, вказуючи на внесок до індексу рефракції інших інгредієнтів буферу.

## III,3,3. Висновок

Таким чином, вимір індексу рефракції можна швидко застосовувати для перевірки протягом процесу повного розчинення усіх доданих інгредієнтів композиції.

Приклад IV - Композиція з цитратно-фосфатним буфером - порівняльний приклад

IV, 1. Отримання композицій (Таблиці 43 та 44)

Таблиця 43

№	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O (M)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O (M)	Na <sub>3</sub> Цит- рат. 2 H <sub>2</sub> O	Саха- роза мас.%	DMEM мас.%	PPM <sup>*</sup> рН при t=0	PPM <sup>*</sup> час при рН>4 (хви- лин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр піс- ля 1 ти- жня	Вірусна втрата при 37°C після 1 тижня
2,5 мл застосування об'єм дози - концентрація фосфату = 0,390 M										
1	0,195	0,195	0,135	50%	3,33%	6,66	9	5,9	5,4	0,5

2	0,195	0,195	0,135	50%	5%	6,65	10	5,8	5,4	0,4
3	0,195	0,195	0,135	50%	8%	6,67	9	5,6	5,3	0,3
4	0,195	0,195	0,135	45%	3,33%	6,67	10	5,8	5,3	0,5
5	0,195	0,195	0,135	40%	3,33%	6,69	11	5,8	5,5	0,3
6	0,195	0,195	0,135	30%	3,33%	6,71	10	5,7	5,5	0,2
7	0,195	0,195	0,135	20%	3,33%	6,75	11	5,6	4,1	1,5
8	0,195	0,195	0,135	45%	8%	6,69	12	5,7	5,4	0,3
9	0,195	0,195	0,135	40%	8%	6,70	12	6,1	5,6	0,5
10	0,195	0,195	0,135	30%	8%	6,72	11	6,1	5,4	0,5
11	0,195	0,195	0,135	20%	8%	6,73	11	6,1	4,4	1,7
об'єм дози 2 мл, концентрація фосфату = 0,488 M**										
17	0,244	0,244	0,162	50%	6%	6,68	10	5,7	5,5	0,2
1,5 мл застосування об'єм - концентрація фосфату = 0,650M**										
12	0,325	0,325	0,216	40%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
13	0,325	0,325	0,216	40%	8%	∞	∞	∞	∞	∞
14	0,325	0,325	0,216	40%	10%	∞	∞	∞	∞	∞
15	0,325	0,325	0,216	45%	6%	∞	∞	∞	∞	∞
16	0,325	0,325	0,216	45%	8%	∞	∞	∞	∞	∞

<sup>§</sup> оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2, 2;

\*\* Це еквівалентно 0,390 M в об'ємі дози 2,5 мл

<sup>∞</sup>Композиції 12-16 відбракували, оскільки кристалізація відбувалася при стоянні при 4-8°C

Таблиця 44 - знижена кількість фосфату в об'ємі дози 1,5 мл

№	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O (M)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O (M)	Na <sub>3</sub> Цит- рат. 2 H <sub>2</sub> O	Саха- роза мас. %	DMEM мас. %	PPM* pH при t=0	PPM* час при pH>4 (хви- лин)	Вірусний титр при t=0	Вірусний титр піс- ля 1 ти- жня	Вірусна втрата при 37°C після 1 тижня
об'єм дози 1,5 мл - знижена кількість фосфату (0,450 M для композицій 25-29)**										
25	0,225	0,225	0,285	40%	6%	6,69	12	6,2	5,8	0,4
26	0,225	0,225	0,285	40%	8%	Відбувається кристалізація - дані недоступні				
27	0,225	0,225	0,285	40%	10%	6,67	12	6,2	6,0	0,2
28	0,225	0,225	0,285	45%	6%	Відбувається кристалізація - дані недоступні				
29	0,225	0,225	0,285	45%	8%	6,69/ 6,72°	12/ 13°	6,1	6,1	0

об'єм дози 1,5 мл - знижена кількість фосфату (0,0085 М для композицій 30-32, 38-40)***										
30	0,00424	0,00424	0,438	40%	6%	7,75	12-13	6,2	5,3	0,8
31*	0,00424	0,00424	0,438	45%	6%	7,9	13	6,1	5,8	0,3
32*	0,00424	0,00424	0,438	50%	6%	7,76	13-14	6,0	5,7	0,3
38	0,0042	0,0042	0,435	45%	6%	7,76	14	5,7	5,2	0,5
39	0,00424	0,00424	0,446	50%	6%	7,74	14	5,6	5,3	0,3
40	0,0043	0,0043	0,448	54%	6%	7,73	15	5,6	5,4	0,2
об'єм дози 1,5 мл - фосфат не додано										
18	-	-	0,438	40%	6%	8,42	12	5,7	4,5	1,2
19			0,437	40%	8%	8,42	11	5,7	4,3	1,4
20			0,437	40%	10%	8,31	11	5,7	4,4	1,3
21			0,437	45%	6%	8,35	11	5,9	4,7	1,2
22			0,437	45%	8%	8,35	10	5,8	4,9	0,9
23			0,437	45%	10%	8,37	12	5,7	4,7	1,0
24	-	-	0,438	50%	6%	8,31	11	5,7	4,9	0,8

° = повторення

<sup>s</sup> оцінено тестом Россетта-Райса малюків (PPM), адаптованим згідно з прикладом III,2,2; \*

Композиції 31 та 32 повторювали спочатку у відмінному тесті з подібними даними (композиції 38 та 39, відповідно, не показані).

\*\* це еквівалентно 0,271 М в об'ємі дози 2,5 мл; тобто зниженому фосфату

\*\*\* це еквівалентно 0,0051 М в об'ємі дози 2,5 мл; тобто зниженому фосфату

Зауваження до даних композицій 18-24. 26-30 у таблиці 44

Композиції 18-24 та 30 відбраковували від довготермінового дослідження стабільності внаслідок незадовільних результатів, отриманих протягом 1 тижня у тесті стабільності при 37°C. Композиції 26 та 28 відбраковували, оскільки кристалізація відбувалася при стоянні при 4-8°C. Композиції 25, 27 та 29 відбраковували внаслідок високого ризику кристалізації при стоянні при 4-8°C.

IV,1,1. Композиції 1-11: об'єм дози композиції 2,5мл

Композицію 1-11 (дивись таблицю 43) робили у кількості 325г (250мл), що представляє 100 доз по 2,5мл (3,25г) кожна. Антацидні матеріали:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Мм 156);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Мм 178);  $\text{Na}_3\text{Цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Мм 294).

Рідку композицію 1 отримували так. До 125,84г води (кількість визначено таким чином, щоб досяг-

ти кінцевих 325г) послідовно додають: 7,605г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 8,677г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 9,555г  $\text{Na}_3\text{цитрату} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  та 162,5г сахарози. Після повного розчинення розчин стерилізують фільтруванням на мембрані 0,2мкм. 10,82г середовища DMEM, що містить обов'язкову кількість ротавірусу, додають у стерильних умовах для отримання  $10^{6,0}$  уоо на дозу. Суміш гомогенізують та розподіляють у доречну тару. У цьому випадку одна доза містить 2,5мл або 3,25г кінцевого препарату. У цьому прикладі середовище DMEM представляє 3,33мас.%.

Композиції 2-11 отримували подібно (дивись інгредієнти та пропорції у таблиці 43) У цій серії тестували відмінні кількості сахарози та DMEM. Подібні дані отримували за винятком композицій 7 та 11, отриманих з низькою (20%) концентрацією сахарози, вони неадекватно стабілізують ротавірус.

IV, 1,2. Композиція 17: об'єм дози композиції 2,0мл

Композицію 17 (дивись таблицю 43) робили у кількості 325г (250мл), що представляє 125 доз по 2,0мл (2,60г) кожна. Антацидні матеріали:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Мм 156);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Мм 178);  $\text{Na}_3\text{Цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Мм 294). Коротше, 110,7г води (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г) зважують та додають послідовно 9,51г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10,84г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 11,94г  $\text{Na}_3\text{цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  та 162,5г сахарози (50мас.%). У цьому прикладі застосовують 19,5г DMEM, що представляє 6мас.%.

Таблиця 45

Теоретичне обмеження розчинності для фосфату та цитрату

	Розчинність у воді
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,44М (20°C)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,52М (20°C)
$\text{Na}_3\text{Цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,44М (25°C)

Згідно з цими параметрами, намагання створити композицію 17 в об'ємі дози 1,5мл могло б теоретично дати кінцеву концентрацію фосфату 0,65М ((0,244М+0,244М)\* 2/1,5), котра є вище розчинності  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,52М).

До запобігання цій проблемі низької розчинності фосфату треба не застосовувати додатковий фосфат, а підганяти рН балансом між карбоновою кислотою ( $\text{R-COOH}$ ) та карбоксилатом ( $\text{R-COO}^-$ ). Приклад цього надано у композиціях 100-115, зроблених у об'ємі 2,5мл (дивись таблицю 5) або композиціях 128-130, зроблених у об'ємі 1,5мл (дивись таблицю 6).

IV,1,4. Композиції 25-32 та 38-40: об'єм дози 1,5мл композиції та знижена кількість фосфату

Кілька композицій (дивись таблицю 44 стосовно деталей), що містять знижену кількість фосфату, отримували при 325г (250мл), що представляє 166,6 доз по 1,5мл (1,95г) кожна. Для компенсації цього зниження фосфату, підтримуючи прийнятну антацидну здатність було збільшено, концентрацію цитрату. Коротше, композицію 25 отримували змішуванням послідовно 8,76г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10,00г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 21,00г  $\text{Na}_3\text{цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  та 130г сахарози (40мас.%). У цьому прикладі DMEM представляє 6мас.%. Композиції 26-29 робили подібно, очікувано, що концентрації сахарози та DMEM були слабко модифікованими (дивись таблицю 44). Композицію 30 отримували змішуванням 0,1653г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1884г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 32,16г  $\text{Na}_3\text{цитрат} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  та 130г сахарози (40мас.%) додають послідовно. У цьому прикладі DMEM представляє 6мас.%. Композиції 31 та 32 робили подібно, очікувано, що концентрації сахарози та DMEM були слабко модифікованими (дивись таблицю 44).

Незважаючи на факт, що у композиціях 25-29, загальна концентрація фосфату була 0,45М, тобто нижче теоретичного обмеження розчинності 0,52М для  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , деякі з композицій (наприклад ком-

IV,1,3. Композиції 12-16: об'єм дози композиції 1,5мл

Наступні намагання зменшити об'єм дози цих цитрат/фосфатних композицій (стосовно деталей дивись таблицю 43) до об'єму нижче 2мл невдалі.

Концентрації інгредієнтів, застосовувані для композиції 17 (об'єм дози 2мл) були підігнані до об'єму дози 1,5мл. Кристалізація фосфату швидко відбувалася при зберіганні композиції при 4°C. Це є наслідком низької розчинності  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  у межах фосфатно-цитратного компонента (дивись таблицю 45).

позиції 26 та 28) виявляли кристалізацію протягом зберігання при +4°C. Ця практична відмінність між теоретичною та практичною величинами розчинності ймовірно є наслідком присутності інших сполук, розчинених у середовищі (сахароза, цитрат або інші, введені у середовищі DMEM), хоча для подібних композицій отримували суперечливі дані (порівняно, наприклад, з композиціями 26 та 27). Мінливість, що спостерігають з такими композиціями, не є сумісною з потрібною надійністю, при отриманні великої кількості композиції, що залишається фізично стабільною зверх мінімального періоду часу.

Зниження навіть ще кількості фосфату у формулі (дивись №30-32 та 38-40 у таблиці 44) дає погані дані для вірусної стабільності при 4-8°C (дивись таблицю 47).

Інші композиції з об'ємом дози 1,5мл (18-24) також зроблені у відсутності доданого фосфату (дивись таблицю 44 стосовно деталей). Антацидну здатність для цих композицій підтримували при цільовій величині 12 хвилин, застосовуючи тринатрій цитрат при вищій концентрації (438мМ). Коротше, композицію 18 отримували змішуванням послідовно води 143,34г (кількість визначено таким чином, щоб досягти кінцевих 325г), 32,16г  $\text{Na}_3\text{цитрату} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  та 130г сахарози (40мас.%). Для композицій №19-23 тестували різні кількості сахарози та DMEM (дивись таблицю 44). Для композиції 24, сахарозу застосовували при концентрації 50мас.% (162,5г). У цих композиціях DMEM представляє 6мас.%.

рН цих композицій (№18-24) перевищувало 8,3, при котрому ротавірусна стабільність є порушеною як свідчить вірусна втрата вище 0,8 після одного тижня зберігання при 37°C.

Погана стабільність цих композицій у швидкому тесті при 37°C, не проводили середньо-термінову схему стабільності при кімнатній температурі або 4°C.

Ці дані показують, що коли менше і менше фосфату вводять у композиції, з більше і більше цитратом (для підтримки антацидної здатності), тоді утворений рН композиції збільшується більше та більше:

- рН приблизно 6,7 у композиціях 25-29
- рН приблизно 7,7 у композиціях 30-32 та 38-40, та
- рН приблизно 8,3 у композиціях без фосфату №18-24

Як показано далі (Таблиці 46 та 47) ці вищі величин рН не є сприятливими стосовно гарної ротавірусної стабільності.

Додатково, ці дані узгоджуються з даними, отриманими для композицій 110-115 (дивись таблицю 5) та 128-130 (дивись таблицю 6), де рН коректували тільки співвідношенням лимонна кислота/натрій цитрат (таким чином без додаткового фосфату).

IV,2. Вірусне титрування ротавірусу та антацидна здатність

Вірусне титрування ротавірусу у відмінні моменти часу визначено способом, наданим у прикладі III,1, а антацидну здатність композиції визначено протоколом, наданим у прикладі III,2. Дані показані у таблицях 46 та 47.

Таблиця 46

## Вірусна стабільність при кімнатній температурі

№	Вірусне титрування після зберігання при кімнатній температурі (20-22°C) ( $\log_{10}$ уоо на дозу вакцини)					
	1 місяць	2 місяці	3 місяці	4 місяці	5 місяців	6 місяців
1	6,0	6,0	5,8	5,6		5,1
2	6,3	5,9	6,0	5,6		5,0
3	6,2	6,0	5,9	5,5		5,0
4	6,0	6,0	5,5	5,0		
5	6,0	5,7	5,3	4,5		
6	5,5	5,1	4,8			
7	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
8	6,0	5,6	5,5	4,9		
9	5,9	5,6	5,1			
10	5,6	5,1	4,6			
11	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
17	6,0	5,8	5,8	5,7		5,0
25	5,9	5,5	4,8			
27	5,8	5,1	4,7			
29	6,1	5,7	5,5	5,4		3,9
31	5,7	5,3	4,7			
32	5,9	5,5	5,0			
38	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
39		5,3	5,5	4,5		
40		5,5	5,2	4,8		4,6

Пусті комірки = не визначено

$\infty$  Композиції 7, 11 та 38 відбракували від довготермінової стабільності внаслідок поганих даних, отриманих протягом 1 тижня при 37°C

Таблиця 47 - Вірусна стабільність при 4°C

№	Вірусне титрування після зберігання при 4°C ( $\log_{10}$ уоо на дозу вакцини)								
	після 1 м* 4°C	2 м* 4°C	4 м* 4°C	6 м* 4°C	7 м* 4°C	9 м* 4°C	12 м* 4°C	T=0 1 тиждень 37°C	
1	5,9	5,4	5,9	6,0	6,1	6,1		5,9	5,9
2	5,8	5,4	5,9	6	6	6		5,9	5,8
3	5,6	5,3	6	6	6,2	6		6	5,9
4	5,8	5,3	5,7	6,0	6,1		5,9	5,9	5,7
5	5,8	5,5	6,1	6,1	6,1		5,8	6,0	5,7

6	5,7	5,5	6,0	6,0	5,9		5,4	5,6	4,9
7	5,6	4,1							
8	5,7	5,4	5,9	6,0	5,9		5,8	5,9	5,6
9	6,1	5,6	6,1	6,1	5,8		5,7	5,6	5,5
10	6,1	5,4	6,0	5,5	5,5				
11	6,1	4,4							
17	5,7	5,5	5,7	5,9	6	5,8		5,9	5,9
25	6,2	5,8	5,9	5,9	НП*	НП*		НП*	НП*
27	6,2	6,0	6	5,8	НП*	НП*		НП*	
29	6,1	6,1	6,1	5,9	5,9	6,2			
31	6,1	5,8	5,7	5,7	5,6	5,6			
32	6,0	5,7	6	5,8	5,6	5,6			
38	5,7	5,2							
39	5,6	5,3		5,7	5,4				
40	5,6	5,4		5,7	5,3				

\* НП = не придатні - невдалі при тестуванні стабільності при кімнатній температурі

Пусті комірки = не визначено

#### IV.3. Дані та висновки

##### IV, 3. Дані та висновки

Композиції 2-3 (об'єм дози 2,5мл) та композиція 17 (об'єм дози знижено від 2,5мл до 2мл):

Як показано у таблицях 46 та 47, втрата 1-log вірусного титру відбулася від 6-місяців зберігання при кімнатній температурі для композицій 2, 3 та 17. При 4°C, не спостерігали значної втрати вірусного титру протягом зберігання до 12 місяців.

Композиції 25, 27, 29 та 31-32 (об'єм дози знижено до 1,5мл):

При кімнатній температурі, втрати 1-log вірусного титру загалом досягали за 3 місяці або раніше, за винятком композиції 29, для котрої проходило 4 місяці. Композиції 25-27 кристалізувалися при зберіганні при 4°C, таким чином вказуючи, що зниження концентрації фосфату не є достатнім, як вказано вище. Тому такі композиції непридатні для періодів зберігання, котрі повинні бути принаймні один рік при 4°C.

При зниженні концентрації фосфату ще (композиції 30-32), рН кінцевої композиції збільшується внаслідок відносного збільшення кількості цитрату, котрий є потрібним для підтримки тої ж величини антацидної здатності. Це збільшення рН впливає на стабільність ротавірусу та може бути швидко

визначене протягом дослідження стабільності при кімнатній температурі. Ці тенденції підтверджуються, коли повністю позбавляють композицію фосфату (композиції 18 та 24).

##### Загальний висновок прикладу IV

Ці дані показують, що для досягнення об'єму дози нижче 2мл, порівняно з об'ємом дози 2,5мл, кількість фосфату у композиції повинна бути зниженою, внаслідок його низької водорозчинності та його схильності до перекристалізації. Як наслідок, для підтримки тої ж цільової величини антацидної здатності (тобто мінімум принаймні 8 хвилин, допустимо принаймні 12 хвилин, як оцінено тестом РРМ), кількість цитрату повинна бути збільшеною. Це створює збільшення кінцевого рН композиції, котрий є шкідливим для стабільності ротавірусу у рідкій композиції.

##### Приклад V - Додаткові композиції

Наступні композиції отримували (Таблиця 48), але не вводили у проект довго-термін стабільності внаслідок невідповідності принаймні одному з критеріїв. Специфічні причини для відбраковування деяких композицій наведено у колонці коментаріїв таблиці 48.

№	Короткий опис композиції	Композиції посилання + Таблиця	Коментарії
7	2,5 мл; Цитрат; фосфат; 20% сахарози	IV. 1 таблиця 43	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
11	2,5 мл; Цитрат; фосфат; 20% сахарози	IV. 1 таблиця 43	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
12	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 43	Кристалізуються при стоянні при +4°C
13	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 43	Кристалізуються при стоянні при +4°C
14	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 43	Кристалізуються при стоянні при +4°C
15	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 45% сахарози	IV. 1 таблиця 43	Кристалізуються при стоянні при +4°C
16	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 45% сахарози	IV. 1 таблиця 43	Кристалізуються при стоянні при +4°C
18	1,5 мл; Цитрат; 40% сахарози; рН 8,42	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
19	1,5 мл; Цитрат; 40% сахарози; рН 8,42	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
20	1,5 мл; Цитрат; 40% сахарози; рН 8,31	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
21	1,5 мл; Цитрат; 45% сахарози; рН 8,35	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
22	1,5 мл; Цитрат; 45% сахарози; рН 8,35	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
23	1,5 мл; Цитрат; 45% сахарози; рН 8,37	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
24	1,5 мл; Цитрат; 50% сахарози; рН 8,31	IV. 1 таблиця 44	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
25	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 44	Ризик кристалізації при +4°C
26	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 44	Кристалізуються при стоянні при +4°C
27	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 44	Ризик кристалізації при +4°C
28	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 45% сахарози	IV. 1 таблиця 44	Кристалізуються при стоянні при +4°C
29	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 45% сахарози	IV. 1 таблиця 44	Ризик кристалізації при +4°C
30	1,5 мл; Цитрат; фосфат; 40% сахарози	IV. 1 таблиця 44	0,8 log втрат протягом 1 тижня при 37°C
33	1,5 мл; Ацетат + Кальцій	II, 1 таблиця 10	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
34	1,5 мл; Ацетат + Кальцій	II, 1 таблиця 10	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
35	1,5 мл; Ацетат + Кальцій	II, 1 таблиця 10	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
41	1,5 мл; Глутамат; 50% сахарози	II, 7 таблиця 36	рН занадто високий: 10,36
44	1,75 мл; Фумарат; 44% сахарози	II, 8	Нерозчинні матеріали

45	1,75 мл; Адипат; 44% сахарози	II,5 таблиця 19	PPM занадто довгий: >29 хвилин.
47	1,75 мл; Лактобонат; 31% сахарози	II,9	PPM занадто короткий: менше 1 хвилини.
48	1,75 мл; Малєат; 44% сахарози	II,10	pH занадто високий: 10,4, PPM занадто довгий: 24 хвилини.
49	1,75 мл; Глюкуронат; 42% сахароз I	II,11	pH занадто високий: 8,45; PPM занадто короткий: менше 1 хвилини.
50	1,75 мл; Глутарат; 44% сахарози	II,4 таблиця 18	PPM занадто довгий: >29 хвилин.
51	1,75 мл; Сукцинат; 44% сахарози	II,3 таблиця 16	PPM занадто довгий: >29 хвилин.
52	1,75 мл; Галактуронат; 42% сахарози	II,12	pH занадто високий: 10,69, PPM занадто короткий: менше 1 хвилини.
53	1,75 мл; Галактарат; 38% сахарози	II,13	Нерозчинні матеріали
54	1,75 мл; Малонат; 44% сахарози	II,2 таблиця 14	pH занадто високий: 8,36
55	1,75 мл; Тартрат; 44% сахарози	II,14	PPM занадто короткий: менше 1 хвилини.
57	1,75 мл; Малєат; 44% сахарози	II,10	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
68	1,5 мл; Глутамат; 7,5% сахарози	II,7 таблиця 36	втрата > 1 log протягом 1 тижня при 37°C
73	1,5 мл; Малат 0,597M; 50% сахарози	II,6 таблиця 33	Стерильне фільтрування занадто важке
75	1,5 мл; Малат; 56% сахарози	II,6 таблиця 33	Труднощі у розчиненні сахарози
103	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози; pH 5,09	II,5,1 таблиця 19	Адипінова кислота кристалізується при стоянні при +4°C
104	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози; pH 5,12	II,5,1 таблиця 19	Адипінова кислота кристалізується при стоянні при +4°C
107	1,5 мл; Адипат 0,466M; 55% сахарози	II,5,1 таблиця 19	Добре, але подібні дані стабільності вже є
108	1,5 мл; Адипат 0,63M; 53,15% сахарози; pH 5,38	II,5,1 таблиця 19	Адипінова кислота кристалізується при стоянні при +4°C
109	1,5 мл; Адипат 0,63M; 55% сахарози; pH 5,38	II,5,1 таблиця 19	Адипінова кислота кристалізується при стоянні при +4°C
117	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози;	II,5,4 таблиця 26	Осадження кальцій адипату
121	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози; Ca <sup>++</sup>	II,5,4 таблиця 26	Осадження кальцій адипату
135	1,5 мл, адипат; 55% сахарози	як №134	Плацебо без ротавірусу

136	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози	II, 5, 1 таблиця 19	pH занадто високий: 9,36
137	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози	II, 5, 1 таблиця 19	pH занадто високий: 9,37
138	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози	II, 5, 1 таблиця 19	pH занадто високий: 9,67
139	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози	II, 5, 1 таблиця 19	pH занадто високий: 9,92
140	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози	II, 5, 1 таблиця 19	pH занадто високий: 10,25
141	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози; pH 6,47	II, 5, 1 таблиця 19	Добре, але подібні дані стабільності вже є
142	1,5 мл; Адипат; 55% сахарози; pH 6,30	II, 5, 1 таблиця 19	Добре, але подібні дані стабільності вже є
146	1,5 мл, адипат; 50% сахарози	як №93	Плацебо без ротавірусу
149	1,5 мл, адипат; 55% сахарози	як №151	Плацебо без вірусів

Приклад VI - Імуногенність фази II, реактогенність та безпечність двох пероральних доз моновалентної рідкої вакцини ротавірусу людини у здорових малюків

Приклад VI - Імуногенність фази II, реактогенність та безпечність двох пероральних доз моновалентної рідкої вакцини ротавірусу людини у здорових малюків

#### VI.1. Уведення

Фазо-II-рандомізоване, подвійно-сліпе, плацебо-контрольоване дослідження фази II проводили для визначення імуногенності, реактогенності та безпечності вакцин, що містять послаблений ротавірусний штам G1 P8 людини (депонований у ЕКААС під депозитним номером 99081301 - дивись WO 01/12797), для імунізації малюків. Дослідження проводили у багатьох центрах у Фінляндії. Огляд схеми дослідження надано у Фіг.4.

Протягом цього дослідження, першу дозу вакцини, рідку композицію кандидатної вакцини HRV (ротавірус людини) (N=100) або ліофілізовану композицію вакцини HRV (N=100) та відповідне плацебо (2 групи, для кожної N=25) застосовували приблизно при 2,5 місяців віку (між 6 та 12 тижнів віку), підчас першого візиту до доктора. Другу дозу застосовували приблизно при 3,5 місяців віку (протягом другого візиту до доктора, звичайно через 4 тижні після першої дози). Наступний візит проводили через 1 місяць після другої дози, приблизно при 4,5 місяців віку для відбору крові та визначення імуногенності.

Клінічне дослідження було рандомізованим, плацебо-контрольованим та незалежним. Загалом 250 осіб, 100 на HRV-групу та 25 на плацебо-групу, були задіяні. Це проводили у подвійно-

сліпому режимі між кожною вакцинною композицією HRV та її відповідним плацебо. Однак, між 2 відмінними композиціями засліплення було технічно неможливим.

Звичайні вакцинації дітей проводили згідно з локальною практикою, але принаймні 14 діб нарізно від кожної дози вакцини HRV.

#### VI.2. Опис вакцини

Конкретно застосовувана вакцина містить як ротавірусний компонент послаблений штам G1 людини, депонований як депозит ЕКААС 99081301 (WO 01/12797).

Вакцина є послабленим ротавірусом людини (HRV) кандидата вакцина похідна від штаму 89-12 HRV, що належить до серотипу G1 P1A та генотипу [P8], що виділяли зі стулу 15-дітей віком місяців у Цинцинатті, США. Природна інфекція штаму 89-12 була показана як придатна для забезпечення захисту проти наступних хвороб та проти реінфекції у дворічному перспективному дослідженні (Bernstein DI, et al. Protection from rotavirus reinfection: 2 years prospective study. J Infect Dis. 1991 ; 164: 277-83).

Антацид попереджуватиме інактивацію HRV протягом проходження через шлунок.

Таблиця 49 порівнює рідкі композиції з адипатом та ліофілізовані композиції, отримані згідно з WO 01/12797, та демонструє ефективність у велико-масштабному клінічному дослідженні (De Vos et al. Pediatr Infect Dis J. 2004 Oct 23 (10 Suppl): S179-82).

Таблиця 49

Кількість рідкої композиції з адипатом та ліофілізованої композиції вакцини HRV (номінальна доза)

	Рідка композиція з адипатом	Ліофілізована композиція (після розбавлення)
Активна речовина	штам Р43 - принаймні $10^{6,0}$ ІДКК <sub>50</sub> на дозу у кінці строку збереження (1,5мл об'єм	Р43 штам - принаймні $10^{6,0}$ ІДККю на дозу у кінці строку збереження (1,0мл об'єм до-

Стабілізатор	Сахароза 55мас.% (1,073g)	Сахароза 9мг Декстран 18мг Сорбітол 13,5мг Амінокислоти 9мг
Антацид	Динатрій Адипат 132,74мг	Кальцій карбонат 60мг
Загусник	-	Ксантан 2,5мг
Розріджувач маси	DMEM** 6мас.%	DMEM** 2,25мг
Розчинник	Вода для ін'єкції 1,5мл	Вода для ін'єкції 1мл

\*\* Модифіковане Дульбекко середовище Ігла

Зведення об'єму та антацидної здатності від двох композицій вакцини HRV представлено у таблиці 50.

Таблиця 50

Об'єм та антацидна здатність рідкої композиції з адипатом та ліофілізованої композиції вакцини HRV

Композиція	Об'єм заповнення на дозу	Антацидна здатність (PPM* у хвиликах)
Рідка вакцина HRV з адипатом	1,5мл	12
Ліофілізована композиція	1,3мл	17

\* PPM = Тест титрування Россетта-Райса для малюків (PPM): для виміру швидкості реакції антацидної речовини з 0,1 Н хлоридною кислотою та тривалості підтримки рН вище 4. Дивись спосіб у прикладі III,2,2.

Монодозами створеної рідкої композиції HRV-вакцини з адипатом заповнюють згідно з практикою гарного вироблення (GMP) монодозові скляні шприци.

Вірусний титр ротавірусу (тобто ротавірусну потужність) можна вимірювати способом, деталізованим у прикладі III,1, з інфікованими клітинами MA104, ідентифікованими опосередкованою імунофлуоресценцією. Альтернативно це вимірюють титруванням *in vitro* вірусу на клітинах MA104 з вірусом, визначеним опосередкованою імунофлуоресценцією, застосовуючи специфічні антиротавірусні антитіла. Спосіб визначає дозу, інфікуючу 50% культури клітин, а титри ротавірусу виражають середньою інфекційною дозою культури клітин (ІДК<sub>50</sub>). Між- та внутрішньо-дослідження відтворюваності визначене та дає еквівалентні дані (мінливість оцінено у 0,3 log).

#### VI.3. Застосування

VI.3.1. Ліофілізована композиція HRV-вакцини або плацебо

Для отримання вакцини або плацебо для застосування, суцільний вміст одного попередньо заповненого шприца, що містить кальцій карбонатний буфер, вводили у пляшечку ліофілізованого продукту (вакцина або плацебо), а ресуспендований продукт було тоді застосовано як єдину пероральну дозу.

VI.3.2. Рідка композиція HRV-вакцини або плацебо

Попередньо заповнений скляний шприц струшували перед застосування. Продукт (вакцину або плацебо) було тоді застосовано як єдину пероральну дозу.

#### VI.4. Безпечність та реактогенність

Застосовано наступні критерії безпечності та реактогенності: розпитують про загальні шкідливі

випадки, якими були лихоманка, подразливість/метушливість, діарея, блювання, втрата апетиту та кашель/нежить. Це реєстрували протягом 15 діб після кожного дослідження дози вакцини, застосовуючи щоденник, запропонований батькам/попечителям для реєстрування спостережених симптомів. Усі випадки гастроентериту (діареї), що відбувалися між візитами, були документовані, а зразки екскрементів збирали (в останні 7 діб після початку гастроентериту). Добровільно повідомлені шкідливі випадки, що відбувалися у межах 31 доби після кожної дози, реєстрували. Серйозні шкідливі випадки реєстрували протягом усього дослідження.

#### VI.5. Лабораторні дослідження

##### VI.5.1. Аналіз екскрементів

Зразки екскрементів, що збирали від усіх осіб на добу кожного дослідження дози вакцини або за одну добу до цього, на добу 7+1 та на добу 15+1 після кожної дози, та на добу візиту 3 аналізу за одну добу до цього, аналізували у GSK Biologicals або лабораторії, призначеній GSK Biologicals, для визначення присутності вакцини PB, застосовуючи імуноферментний твердофазний аналіз (ELISA - дивись розділ VI,6,1) для оцінки зниження вірусу.

Присутність ротавірусного антигену продемонстровано за допомогою ELISA у будь-яких екскрементах, зібраних при попередньо визначеному часі після дози 1 до візиту 3, розглядають як зниження вірусу у вакцині та беруть як свідчення реакції вакцини (тобто вакцинного подолання), якщо особа була негативною стосовно ротавірусу на добу дози 1 HRV-вакцини або плацебо. Для плацебо-осіб у цьому випадку проводять секвенсування.

Особу, спочатку негативну стосовно рота вірусу, позначено як особу, яка була негативною сто-

совно антитіл проти ротавірусу IgA у сироватці та стосовно ротавірусного антигену у зразку екскрементів під час попередньої вакцинації, якщо ці дані доступні, або негативною стосовно принаймні одного з цих маркерів якщо тільки один результат є доступним.

Також, зразки екскрементів, що збирали протягом кожного випадку GE від візиту 1 до візиту 3 тестували у GSK Biologicals або лабораторії, призначеній GSK Biologicals, застосовуючи ELISA для визначення РВ. Якщо результати позитивні, G-тип визначають, застосовуючи підходи на основі PCR. Ці молекулярні способи націлені на регіони у межах гена VP7, котрі є дуже відмінними серед відмінних G-типів та є високо збереженими у межах кожного даного G-типу. Наприклад, спосіб RT-PCR, розроблений Gouvea et al. (1990, J Clin Microbiol., 28:276-282) застосовує суміш відмінних генотип-специфічних праймерів, локалізованих у відмінних регіонах гена VP7. Розмір утворених продуктів PCR, що оцінювали гелелектрофорезом, стосується інформації для ідентифікації відповідних G-генотипів. Якщо будь-який G1 РВ визначено, вірус вакцини відрізняється від серотипу дикого типу аналізом послідовностей або еквівалентним підходом.

Будь-як визначення вірусу вакцини у будь-яких екскрементах, зібраних до візиту 3, приймають як свідчення реакції на вакцину (тобто вакцинне реагування).

#### VI.5.1. Аналіз сироватки

Сироватку, отриману зі зразків незбираної крові, що збирали від осіб при кожному візиті у дослідженні, тестували за допомогою ELISA у призначеній лабораторії GSK Biologicals для виміру концентрації у сироватці антитіла проти ротавірусу IgA. Відсічка дослідження є 20 од./мл. Серонегативну особу стосовно антиротавірусних антитіл IgA було позначено як особу, яка мала концентрацію антитіл нижче величини відсічки дослідження. Серопозитивну особу стосовно антиротавірусних антитіл IgA було позначено як особу, яка мала концентрацію антитіл більше ніж або рівну величині відсічки дослідження.

#### VI.6. Імуногенність: Аналіз сироватки

##### VI.6.1. Вимір антитіл IgA за допомогою ELISA

Це дослідження дозволяє визначення IgA ротавірусу у сироватці людини та було спочатку розроблено R. Ward (1, 2) та адаптовано GSK Biologicals. Це застосовували для виміру імунної реакції після вакцинації та/або інфекції. Зразки аналізували у GSK Biologicals, Rixensart, Belgium (або призначеній лабораторії).

##### Опис дослідження ELISA

На 96-лункові планшети наносять протягом ночі інкубації розбавлення антиротавірусних антитіл. Лунки промивають та додають лізат клітин, інфікований вакцинним штамом (позитивні лунки) або неінфікований (негативні лунки). Після інкуба-

ції на обертовій платформі, планшети промивають та розбавлення зразків сироватки або стандартної сироватки інкубують в обох різновидах лунок (позитивних та негативних). Застосування негативних лунок дозволяє оцінку неспецифічного зв'язування IgA.

Планшети промивають та зв'язаний IgA людини визначають додаванням біотинілового кролячого IgA проти людини (30 хвилин з струшуванням). Після промивки планшетів спряжений з пероксидазою авідин-біотин при оптимальній концентрації додають до кожної лунки та інкубують (30 хвилин при кімнатній температурі з струшуванням). Планшети знов промивають та додають ортофенілдіамін (OPD). Планшети тоді інкубують (30 хвилин при кімнатній температурі у темряві) перед зупинкою реакції 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптичне поглинання вимірюють при 490/620 нм. Питому оптичну густину розраховують для кожного зразку/стандарту виміром відмінності між позитивними та негативними лунками. Концентрації зразків визначають застосуванням чотирьох-параметричної логістичної функції, створеної за стандартною кривою. Визначають найбільш точну частину стандартної кривої (робочі межі) для розрахунку даних. Концентрації антитіл у одиниці на мл (од./мл) розраховують відносно стандарту (концентрація = 100 од./мл) усередненням величини для кожної невідомої, що знаходиться у робочих межах стандартної кривої, а тоді коректують за фактором розбавлення. Кожний експеримент охоплює негативний та позитивний контроль.

Для усіх реагентів попередньо визначені оптимальні концентрації.

#### Посилання

1. Bernstein DI, Smith VE, Sherwood JR et al. Safety and immunogenicity of a live attenuated human rotavirus 89-12 vaccine. *Vaccine*. 1998; 16:381-7.

2. Bernstein DI, Sack DA, Rothstein E et al. Efficacy of live attenuated human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 1999; 354:287-90.

#### VI.7. Дані: Антиротавірусна реакція антитіл IgA

Таблиця 51 представляє GMC антиротавірусних антитіл IgA та швидкості сероконверсії (Загальна вакцинована група стосовно імуногенності). Таблиця 52 представляє GMC антиротавірусних антитіл IgA, розрахований на особах, серопозитивних стосовно антиротавірусних антитіл IgA, що розраховано на загальну вакциновану групу.

Реакція антитіл на HRV-вакцину у терміни швидкості сероконверсії була подібною в обох вакцинних групах один місяць після другої дози (82,2% у групі HRV\_Lyo та 90. 1% у групі HRV-Liq). В поєднаній групі плацебо, 0% осіб, сероперетворених через один місяць після другої дози, вказуючи, що дослідження проводили у час, коли не було інфекції дикого типу у спільноті.

Таблиця 51

GMC антиротавірусних антитіл IgA та швидкості  
серопозитивності - Загальна вакцинована група стосовно імуногенності

Група	Вимір часу	N	≥20од./мл		95% CI		GMC значення	95% CI	
			n	%	LL	UL		LL	UL
HRV_LYO	PRE	98	0	0,0	0,0	3,7	<20		
	PI(M1)	96	68	70,8	60,7	79,7	191,3		
	PII(M2)	90	74	82,2	72,7	89,5	330,4	122,7 217,5	298,2 502,0
HRV_LYQ	PRE	98	0	0,0	0,0	3,7	<20 172,9		
	PI(M1)	87	66	75,9	65,5	84,4		112,1	266,7
	PII(M2)	81	73	90,1	81,5	95,6	292,3	199,3	428,8
PL_POOL	PRE	49	0	0,0	0,0	7,3	<20		
	PI(M1)	46	0	0,0	0,0	7,7	<20		
	PII(M2)	48	0	0,0	0,0	7,4	<20	-	-

1. N= число осіб з придатними даними
2. n/%= число/процент осіб з концентрацією вище граничної
3. 95% CI=95% інтервал певності; LL= нижче обмеження, UL= верхнє обмеження
4. PRE= попередня вакцинація
5. PI(M1)= один місяць після першої дози HRV-вакцини або плацебо (візит 2)
6. PII(M2)= один місяць після другої дози HRV-вакцини або плацебо (візит 3)
7. Реліз бази даних=07PEK2005

Таблиця 52

GMC антиротавірусних антитіл IgA, що розраховано на особах, серопозитивних  
стосовно антиротавірусних антитіл IgA - Загальна вакцинована група стосовно імуногенності

Група	Вимір часу	N	GMC значення	95% CI	
				LL	UL
HRV_LYO	PI(M1)	68	644,7	471,	881,8
	PII(M2)	74	703,8	25,0	943,6
HRV_LIQ	P1(M1)	66	428,1	302,1	606,8
	PII(M2)	73	423,1	305,9	585,2

1. N= число осіб, які були серопозитивними стосовно антиротавірусних антитіл IgA
2. 95% CI=95% інтервал певності; LL= нижче обмеження, UL= верхнє обмеження
3. PI(M1)= один місяць після першої дози HRV-вакцини або плацебо (візит 2)
4. PII(M2)= один місяць після другої дози HRV-вакцини або плацебо (візит 3)
5. Реліз бази даних=07OEK2005

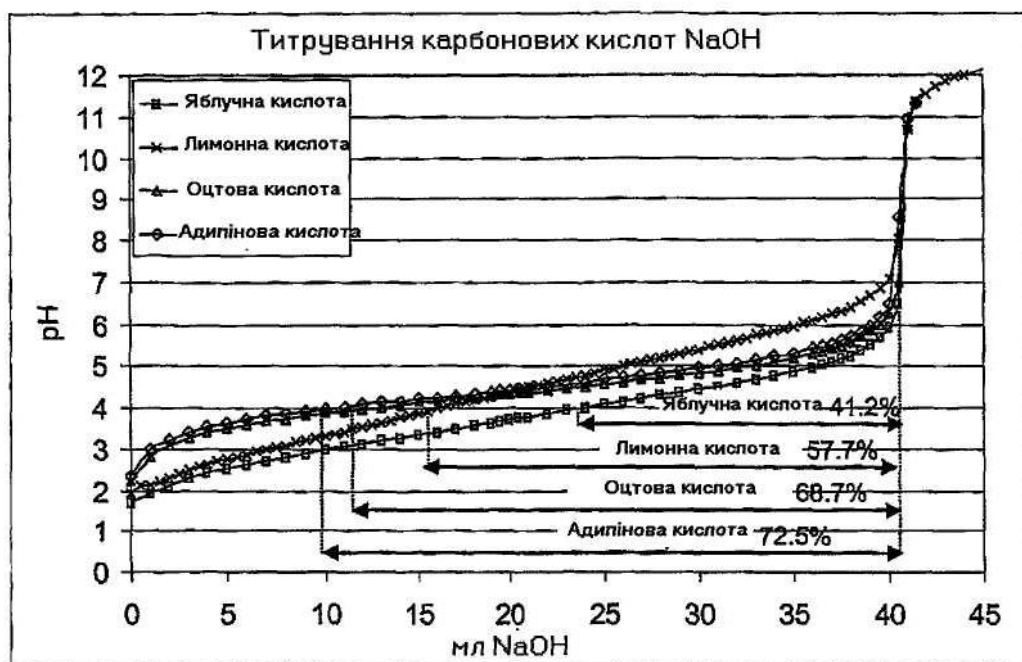
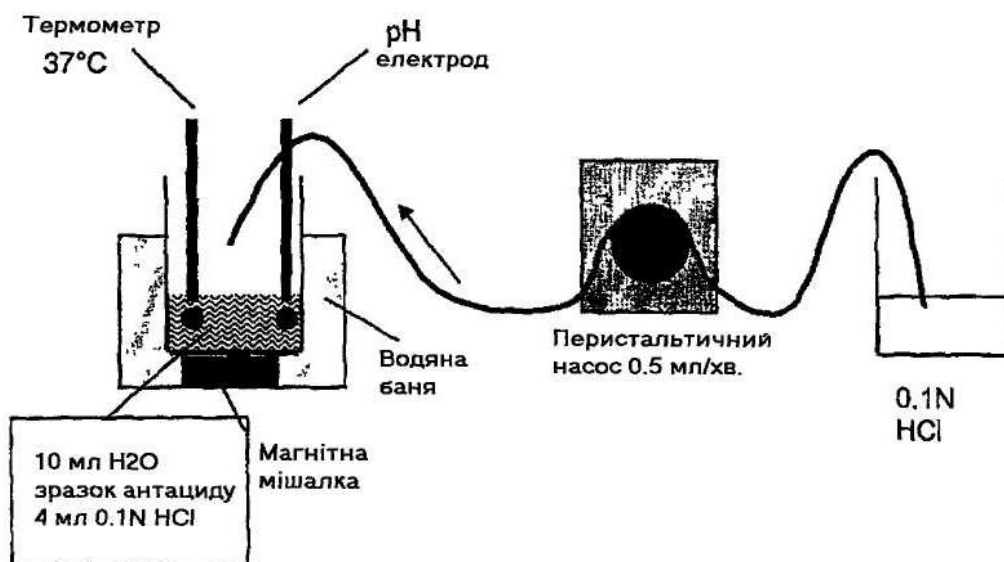


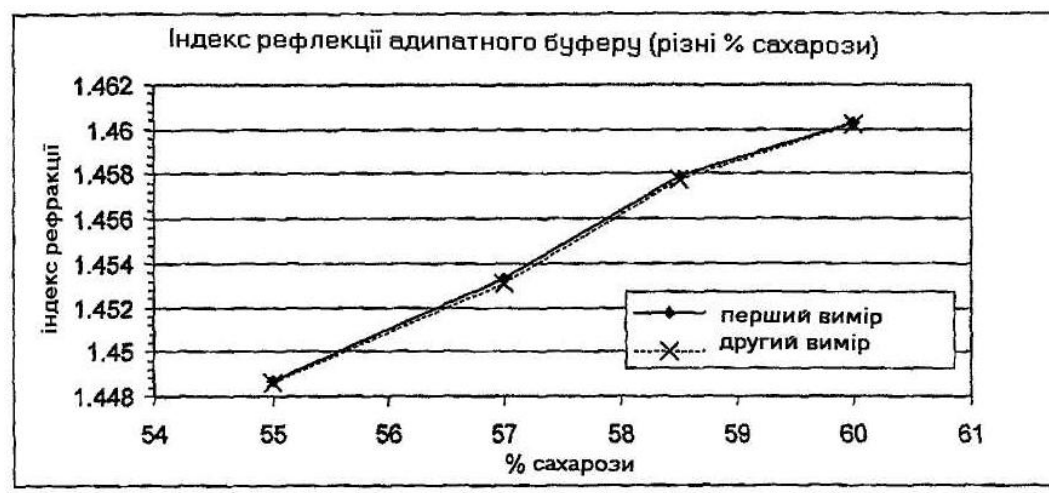
Fig. 1



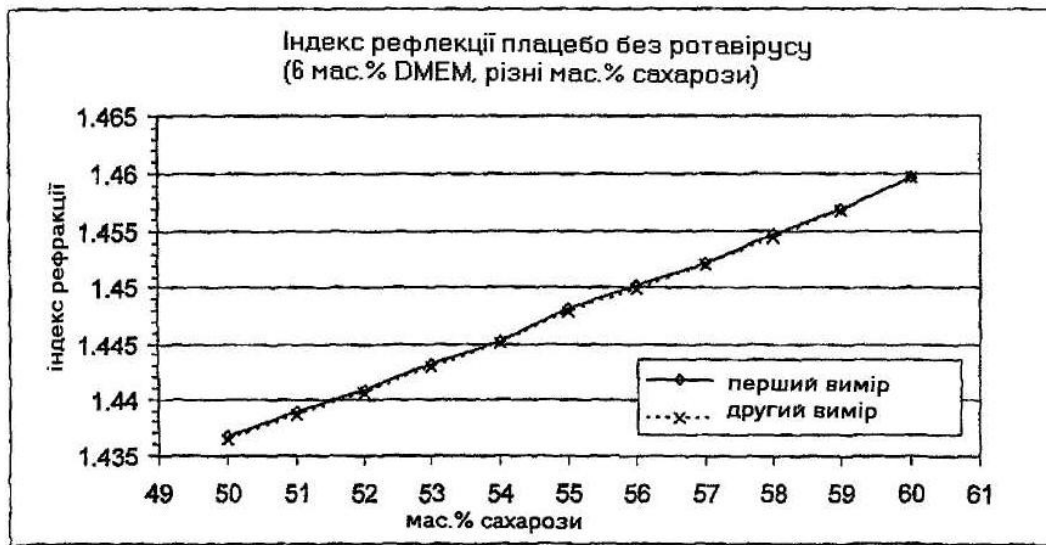
Fig. 2A



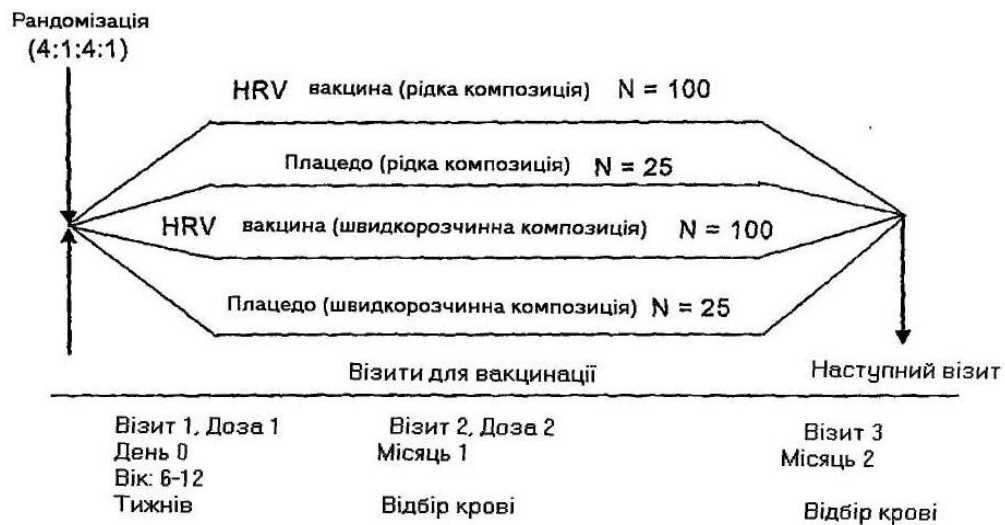
Фіг. 2В



Фіг. 3А



Фіг. 3В



N = число осіб, запланованих для реєстрації

Фіг. 4