

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043650**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.08

(51) Int. Cl. *A61K 39/15* (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990027

(22) Дата подачи заявки
2017.06.13

(54) **НЕ СОДЕРЖАЩАЯ БУФЕРА КИСЛОУСТОЙЧИВАЯ РОТАВИРУСНАЯ ВАКЦИНА
С МАЛЫМ ОБЪЕМОМ ДОЗЫ**

(31) **201641020675**

(56) US-A1-20100068227
WO-A1-2011007363
WO-A1-2013160913

(32) **2016.06.16**

(33) **IN**

(43) **2019.07.31**

(86) **PCT/IN2017/050237**

(87) **WO 2017/216808 2017.12.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БХАРАТ БИОТЕК ИНТЕРНЭШНЛ
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:
**Вадреву Кришна Мохан, Прасад Саи
Девараджулу, Элла Кришна Мурти
(IN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении предложена не содержащая буфера кислотоустойчивая ротавирусная вакцина с малым объемом дозы. Указанная вакцина доступна для перорального введения в объеме дозы, составляющем менее 1 мл на дозу, и не содержит какого-либо буфера. Для указанной вакцины также не требуется введения какого-либо антацида до или после перорального введения субъекту указанной вакцины для нейтрализации кислоты желудка. Указанная вакцина характеризуется незначительным снижением титра вакцины при pH 2-4 в течение 30 мин. Указанная вакцина является стабильной при -20°C в течение по меньшей мере 60 месяцев.

B1

043650

043650

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области ротавирусных вакцин. Более конкретно, настоящее изобретение относится к области ротавирусных вакцин, которые не содержат буфера или не требуют введения какого-либо антацида до, во время или после введения такой ротавирусной вакцины. Настоящее изобретение также относится к объему дозы на единицу вакцины, в частности ротавирусных вакцин.

Уровень техники

Хорошо известно, что ротавирусы являются основной причиной тяжелого гастроэнтерита у младенцев и детей более старшего возраста во всем мире. Даже улучшение гигиены, качества воды и санитарных условий, которые, как правило, могут способствовать борьбе со многими бактериями и паразитами, из-за которых возникают другие виды диареи, в достаточной степени не предотвращают распространение ротавируса. Таким образом, вакцинация является единственной стратегией, способной значительно снизить уровень заболеваемости ротавирусными инфекциями, в слаборазвитых и развивающихся странах по всему миру. Вакцинация имеет более важное значение для стран, в которых отсутствует необходимая экономическая поддержка и инфраструктура для борьбы с ротавирусными инфекциями у инфицированных пациентов. На сегодняшний день в мире было выпущено по меньшей мере четыре коммерчески доступные ротавирусные вакцины, первой из которых в 1999 г. стала вакцина Роташилд (Rotashield®), поставляемая Wyeth Holdings. Данная вакцина представляла собой живую пероральную тетравалентную ротавирусную вакцину, произведенную с применением вакцины на основе 1 ротавируса макаки-резус, 3 реассортированных вирусов макаки-резус и человека, лицензированной в США. Однако указанная вакцина была снята с продажи через 14 месяцев из-за ее связи с нежелательными реакциями - инвагинацией кишечника.

Вакцина Rotashield® содержала композицию, включающую сахарозу, глутамат натрия, монофосфат калия, дифосфат калия, фетальную бычью сыворотку и неомицина сульфат в среде амфотерицина. В соответствующей патентной публикации, относящейся к композициям ротавирусной вакцины WO 2000006196 A2, сообщается, что указанные композиции вакцины могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для обеспечения условий, приближенных к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты и т.п., например ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат, цитрат-бикарбонат или тому подобное. Когда композицию вводят перорально, также может потребоваться обеспечение индивидуума буферным раствором для частичной нейтрализации желудочного сока и защиты реассортированного ротавируса при поступлении в кишечник. Буферные растворы, подходящие для указанного применения, включают бикарбонат натрия, цитрат-бикарбонат или тому подобное.

Вакцина РотаТек (RotaTeq®) представляет собой пентавалентную реассортированную между вирусами человека и быка (WC3) живую аттенуированную пероральную вакцину, производимую Merck & Co., содержащую штамм ротавируса быка WC3, P7[5]G6, при этом содержащую 5 реассортированных вариантов, из которых 4 реассортированных варианта с геном VP7 от серотипа G1, G2, G3 или G4 и 1 реассортированный вариант с геном VP4 P1A[8] от родительского штамма ротавируса человека с остальными генами от родительского штамма ротавируса быка WC3. В состав вакцины (соответствующие патентные публикации Merck, а именно WO 1998/13065, WO 2001/08495 и WO 2002/011540) входят определенные стабилизаторы в средах для культур тканей наряду с присутствием буферов в самом указанном составе, при этом указанный буфер представляет собой цитрат натрия и фосфат натрия. Карбоксилат согласно формуле изобретения указанных заявок используется и действует в качестве буфера для обеспечения устойчивости ротавирусного антигена к воздействию кислой среды желудка, когда вирусный антиген вводят в желудок ребенка.

Далее вакцина Ротарикс (Rotarix®) представляет собой моновалентную вакцину, содержащую пасивированный штамм ротавируса человека RIX4414, полученный из штамма 89-12. Вакцина Rotarix® (производимая GlaxoSmithKline Biologicals (GSK)) представляет собой живую вакцину, которая содержит аттенуированный моновалентный штамм ротавируса человека G1P[8]. Указанная вакцина доступна в лиофилизированной форме, смешанной со стабилизаторами, для восстановления с применением буферного разбавителя на основе карбоната кальция перед введением вакцины субъектам.

Rotarix получали путем восстановления лиофилизированного активного ингредиента (штамм RIX4414 + вспомогательные вещества) с применением 1,0 мл буфера на основе CaCO₃ от GSK, содержащегося в предварительно наполненном шприце. После введения указанного буфера во флакон, содержащий лиофилизированную вакцину, указанный флакон хорошо встряхивали для ресуспендирования указанной вакцины. Затем весь объем ресуспендированного продукта набирали в тот же шприц, иглу (или устройство для переноса) указанного шприца удаляли, и указанный продукт быстро вводили в виде однократной пероральной дозы. В качестве альтернативы восстановление коммерчески доступной лиофилизированной вакцины будет осуществляться согласно тем же методикам с применением перорального аппликатора, наполненного буфером, и адаптера для переноса вместо шприца и иглы. Внешне восстановленная вакцина должна выглядеть молочно-белой. Следует производить визуальный осмотр указанной вакцины на предмет наличия твердых частиц и/или обесцвечивания и не вводить при любом из ука-

занных условий. Rotarix следует вводить перорально. Ребенок должен находиться в полулежачем положении, и все содержимое аппликатора для перорального введения, содержащего указанную восстановленную вакцину, следует вводить на внутреннюю поверхность щеки. Rotarix не следует вводить путем инъекции. Следовательно, понятно, что, восстановление с применением буферного разбавителя включает очень много стадий, начиная от обеспечения того, что восстановление было выполнено надлежащим образом до момента введения указанной вакцины. Все указанные факторы, несомненно, вызывают снижение соблюдения режима вакцинации, что означает частичную защиту от ротавирусной инфекции, а не обеспечение полной защиты.

Соответствующие патентные заявки GSK WO 2001/012797, WO 2005/02133, WO 2006/087205 относятся к составам ротавирусной вакцины, которые содержат серийно пассированный живой аттенуированный штамм ротавируса Р43 со специфическими мутациями, также дополненный антацидным буфером для восстановления. G-белок (VP4 и VP7) указанного штамма ротавируса способен обеспечивать индуцирование иммунного ответа на по меньшей мере 4 других штамма ротавируса серотипов G1 и по меньшей мере одного из G2-G14.

Также известны другие запатентованные композиции ротавирусной вакцины со стабилизаторами и буферами от Bharat Biotech International Limited с индийским «бессимптомным» штаммом 116E, выделенным из организма ребенка. В случае указанных композиций требуется отдельное введение антацидного буфера реципиенту вакцины для повышения pH желудка до введения указанной вакцины, при этом указанный антацидный буфер представляет собой цитратно-фосфатный буфер, необходимый для нейтрализации кислотности желудка во время введения антигена ротавирусной вакцины. В патентной публикации WO 2013160913 предложены композиции ротавирусной вакцины, содержащие ротавирусные антигены, стабилизаторы и некоторые новые комбинации буферов. Буферы согласно указанному изобретению предварительно смешивают с композициями ротавирусной вакцины для нейтрализации сильно-кислого pH желудка без необходимости отдельного введения антацида перед введением вакцины.

Таким образом, понятно, что разработаны различные ротавирусные вакцины с применением различных штаммов, как вирусов человека, так реассортированных вирусов животных. Существует несколько важных различий в характеристиках указанных штаммов, наиболее типичные из которых перечислены ниже.

Таблица 1. Различия между моновалентными вакцинами человека и вакцинами с применением реассортированных вирусов животных

Ротавирусные вакцины с штаммами человека	Животные реассортированные ротавирусные вакцины
Естественная инфекция обеспечивает защиту от последующего ротавирусного заболевания.	Ротавирусы животных представляют собой естественно аттенуированные штаммы, что снижает репликацию у людей.
Вирусы человека обладают высокой способностью к репликации в инфицированном организме и, таким образом, аттенуируются путем многократного пассирования в культурах тканей множества инфицированных хозяев. Поскольку это штаммы человека, титра вакцины 10^4 ФОЕ/0,5 мл достаточно для того, чтобы вызвать необходимую иммуногенность в отношении ротавирусных инфекций у людей.	Ротавирусные вакцины с реассортированными штаммами вирусов животных требуют очень высоких титров вакцины, чтобы иметь возможность вызвать требуемый иммунный ответ.
Иммунитет широкого спектра приобретается путем различных иммунных эффекторных механизмов.	Требуется ожидание того, когда нейтрализующее антитело окажется в просвете кишечника. Полученный иммунитет не так высок, как в случае вакцин с штаммами человека.
Гетеротипная защита достигается благодаря широкому иммунному ответу. Это означает, что он обеспечивает перекрестную защиту от различных штаммов.	Конструкции реассортированной вакцины должны содержать общие антигены ротавируса человека.

Мотивы создания изобретения

Таким образом, известно, что ротавирус очень чувствителен к кислым средам (Estes, M., Graham, D., Smith, E. and Gerba, C. (1979). Rotavirus Stability and Inactivation. Journal of General Virology, 43(2), pp. 403-409). Также сообщалось, что вирус младенческого гастроэнтерита (infantile gastroenteritis) становится нестабильным и происходит разрушение внешней оболочки и капсомеров указанных вирусов под действием среды, имеющей pH менее 3,0 (Palmer E., Martin, M. and Murphy, F. (1977). Morphology and Stability

of Infantile Gastroenteritis Virus: Comparison with Reovirus and Bluetongue Virus. *Journal of General Virology*, 35(3), pp. 403-414). Также сообщалось, что многие штаммы ротавируса инактивировались в течение минуты под действием среды, имеющей pH 2, и сходные результаты были получены с применением желудочного сока человека, имеющего pH 1,8 (Weiss, C. and Clark, H. (1985). Rapid Inactivation of Rotaviruses by Exposure to Acid Buffer or Acidic Gastric Juice. *Journal of General Virology*, 66(12), pp. 2725-2730). Также сообщалось, что ротавирус человека серотипа 1 полностью инактивируется под действием среды, имеющей pH 2,5 (Meng, Z., Birch, C., Heath, R. and Gust, I. (1987). Physicochemical Stability and Inactivation of Human and Simian Rotaviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4), pp. 727-730). Известно, что ротавирус в целом очень нестабилен под действием кислых сред и быстро инактивируется. Скорости инаktivации трех ротавирусов коров и нескольких ротавирусов, происходящих от приматов, определяли при воздействии кислотных буферов при pH 2,0, pH 3,0 или pH 4,0. Каждый ротавирус очень быстро инактивировался при pH 2,0 (кислотности, наиболее сходной с нормальной кислотностью желудка натошак), при этом было определено, что периоды полужизни с сохранением инфекционности составляли 1 мин или менее. Каждый ротавирус инактивировался с гораздо меньшей скоростью при pH 3,0; инаktivация при pH 4,0 была минимальной. Были обнаружены некоторые различия в устойчивости к кислотам между различными штаммами ротавируса. Несмотря на то, что указанные определения выполняли при комнатной температуре (23°C), эксперименты при различных температурах свидетельствовали о еще более высокой скорости инаktivации вируса под действием кислоты при нормальной температуре тела (37°C). Исследования ротавируса, подвергнутого воздействию натурального желудочного сока человека при pH 1,8 или pH 2,1, выявили скорость вирусной инаktivации, сходную со скоростью, отмеченной с применением глицинового буфера с таким же pH. (Ref: Geigy Scientific Tables, volume 1, 1981, page 126).

Инаktivация ротавируса происходит при pH от 2,0 до 3,0, но при pH 4,0 инаktivации не происходит, или она минимальна. Поскольку желудок содержит среду с высоким содержанием желудочной кислоты, до настоящего времени было крайне необходимо добавлять буферы в составы ротавирусной вакцины, буферы в составах на основе ротавирусов способствуют поддержанию постоянного pH указанных составов ротавирусной вакцины, что, таким образом, обеспечивает антацидную или буферную способность указанных составов вакцины. Антацидная способность (также именуемая кислотонейтрализующей способностью) ротавирусных вакцин была измерена с помощью анализов Россетта-Райс для детей (Baby Rossett Rice Assays) в патентах GSK. Кислотонейтрализующую способность конкретного состава определяют как измеренное время поддержания pH выше 4,0 и оценивают с помощью анализа Россетта-Райс для детей. Как сообщается, в анализе Россетта для детей (Baby Rossett assay) якобы моделируется внутрижелудочная среда желудка человека. В недавнем патенте GSK US 8821891 B2 предложена более низкая концентрация фосфатов при повышенной концентрации карбоксилата, предпочтительно адипата, составляющей от 100 мМ до 1 М, предпочтительно от 400 до 700 мМ, в объеме дозы ротавирусной вакцины всего лишь 1,5 мл из расчета на дозу для человека. Адипат действует как буфер, способный противостоять высокой кислотности желудка (pH 1-2). Способность противостоять воздействию кислой среды желудка человека измеряют с помощью анализа Россетта-Райс для детей с получением значения от 8 до 23 мин, которое, как сообщается, позволяет, и которого достаточно, чтобы избежать инаktivации ротавирусного антигена в составе вакцины после введения указанной ротавирусной вакцины ребенку.

Таким образом, для эффективного введения ротавирусной вакцины, которая способна обеспечивать индуцирование иммуногенного ответа, достаточного для обеспечения защиты от ротавирусных инфекций, необходимо по меньшей мере от 1,5 до 2 мл состава ротавирусной вакцины или восстановленной вакцины из расчета на дозу для человека для перорального введения, чтобы эффективно обеспечить прохождение ротавирусного антигена через сильноокислую среду желудка. Таким образом, с помощью приведенных выше описаний состояния в области ротавирусных вакцин, доступных до настоящего времени, специалисты в данной области техники также смогут легко понять и признать, что ротавирусный антиген представляет собой крайне неустойчивый к кислотам антиген, и для введения ротавирусной вакцины всегда требуется антацидный или буферный компонент, в результате чего повышается необходимое количество (из расчета дозировки в объемах на единицу вакцины) вводимой вакцины.

Также несомненно, что ротавирусный антиген представляет собой крайне нестабильный вирус, и учитывается ситуация, когда живой аттенуированный антиген ротавирусной вакцины может быть более нестабильным; таким образом, указанный ротавирусный антиген дополняется соответствующими специальными стабилизаторами вакцины для обеспечения стабилизации составов вакцины, что увеличивает величину дозы указанной вакцины из расчета по объему на единицу вакцины. Кроме того, включение буферов или антацидов или необходимость восстановления вакцины с применением разбавителя вакцины на основе буфера также увеличивает величину дозы вакцины из расчета по объему на единицу вакцины. Следовательно, обеспечение ротавирусной вакцины, не содержащей буфера/антацида, несомненно, уменьшит объем дозы на единицу вакцины. В то же время крайне необходимо, чтобы такое отсутствие буфера в ротавирусной вакцине не ухудшало бы эффективность и стабильность ротавирусной вакцины.

Поскольку субъектом-реципиентом ротавирусной вакцины всегда является ребенок в возрастной группе от 6 недель до 6 месяцев, вполне вероятно, что значительное количество состава ротавирусной вакцины, введенного в рот ребенка, прольется. Это создает риск частичного введения вакцины, в резуль-

тате чего снижается эффективность процедуры вакцинации и не происходит защиты от заболевания, несмотря на получение указанной вакцины. Таким образом, всегда желательно, чтобы величина дозы из расчета по объему на единицу ротавирусной вакцины была максимально снижена без ухудшения эффективности состава вакцины. В настоящее время минимальный объем дозы для ротавирусной вакцины, известный из уровня техники, составляет от 1,5 до 2,5 мл. Вакцины содержат стабилизаторы вакцин и буферы для вакцин, увеличивающие общий объем дозы указанных вакцин. Таким образом, снижение объема дозы на единицу ротавирусной вакцины при сохранении такой же способности повышать необходимую иммуногенность для профилактики ротавирусных инфекций у детей уменьшит вероятность проливания состава вакцины, вводимого ребенку. Таким образом, было бы совершенно не очевидно предоставление не содержащего буфера состава ротавирусной вакцины в малых дозах, составляющих не более 1 мл, предпочтительно всего 0,8 мл или наиболее предпочтительно всего 0,5 мл из расчета на дозу для человека, который столь же или, скорее, более эффективен, чем ротавирусная вакцина (вакцины), предоставленная с буферами или антацидами, имеющая большой объем дозы на единицу вакцины.

В уровне техники раскрыты составы ротавирусной вакцины, все из которых должны быть стабилизированы в жидких составах при температурах охлаждения в диапазоне $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ или в виде лиофилизированных порошков, в случае которых требуется восстановление вакцины перед введением указанной вакцины с применением подходящего разбавителя. Уже обсуждалось, что восстановление вакцины в случае лиофилизированного порошка требует определенных навыков и осторожности. Кроме того, отдельные производственные требования к разбавителям помимо требований к вакцине удваивают затраты на производство вакцины, а также транспортные расходы. Недостаток квалификации, осторожности и соответствующей инфраструктуры для складских нужд усугубляет проблему с поставками лиофилизированной ротавирусной вакцины. Для жидких вакцин при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ срок годности ограничен только 2 годами. Также происходит снижение титра, относящееся к вакцинам, предоставленным при $2-8^{\circ}\text{C}$, во время хранения и транспортировки, которое является нежелательным. Но было обнаружено, что в случае составов ротавирусной вакцины при -20°C вообще не происходило потерь при транспортировке и хранении. Вероятность контаминации вакцин также снижается в гораздо большей степени в случае вакцин при -20°C . Кроме того, центр по снабжению вакцинами (vaccine supply facility) при -20°C уже создан почти в 120 странах мира для поставок полиомиелитной вакцины. Таким образом, существующие хранилища вакцин и поставки вакцин, аналогичные поставкам полиомиелитной вакцины, в значительной степени способствовали бы снижению бремени ротавирусных заболеваний во всем мире. Желательно разработать альтернативные стратегии, при которых будет дополнительно повышена стабильность ротавирусной вакцины, чтобы указанная вакцина была бы доступна в самых отдаленных местах земного шара. Таким образом, в настоящей патентной заявке раскрываются новые составы ротавирусной вакцины, и указанные составы ротавирусной вакцины стабильны в течение по меньшей мере 5 лет, являются абсолютно новыми и совершенно не раскрыты в уровне техники.

Задача настоящего изобретения

Основной задачей настоящего изобретения является обеспечение не содержащей буфера и устойчивой к кислой среде ротавирусной вакцины.

Еще одной основной задачей настоящего изобретения является обеспечение ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, составляющим не более 1 мл или даже всего 0,8 мл, предпочтительно 0,5 мл.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение стабильной композиции ротавирусной вакцины с объемом вакцины, составляющим всего лишь 0,5 мл на дозу.

Другой задачей настоящего изобретения является уменьшение проливания ротавирусной вакцины и минимизация связанных с вакциной потерь реципиентом указанной вакцины и повышение тем самым комплаентности к вакцинации.

Другой задачей настоящего изобретения является получение композиции ротавирусной вакцины, которая не требует применения каких-либо специфических методов разбавления или восстановления до или во время введения вакцины.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение ротавирусной вакцины, которая является стабильной в течение по меньшей мере 5 лет при -20°C .

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, которая является стабильной в течение 2 лет при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, 6 месяцев при 25°C и 1 недели при 37°C .

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение не содержащей буфера композиции ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, составляющим не более 1 мл, которая является стабильной в желудке при pH от 2 до 4 в течение по меньшей мере 20 мин.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение не содержащей буфера композиции ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, составляющим не более 1 мл, которая является стабильной при кислотном pH 2-4 без какого-либо добавления буферов или агентов, стабилизирующих кислоты.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение не содержащей буфера кислотоустойчивой композиции ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, которая не требует введения ка-

кого-либо антацида или буфера до, или после, или во время введения указанной вакцины субъекту.

В качестве альтернативы задачей настоящего изобретения также является обеспечение ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, составляющим 0,5 мл, наряду с присутствием буфера, которая столь же эффективна против ротавирусных инфекций у людей.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, не содержащей буфера, которая способна обеспечивать индуцирование аналогичного или более сильного иммунного ответа по сравнению с иммунным ответом, индуцируемым ротавирусными вакцинами, композиции которых дополнены антацидами или буферами.

Краткое описание изобретения

Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения предложена композиция вакцины, для которой снижение титра ротавирусной вакцины составляет не более 0,55 ФОЕ/на 0,5 мл при pH 2-4 в течение периода, составляющего по меньшей мере один час.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена композиция вакцины, для которой снижение титра ротавирусной вакцины составляет не более 0,68 ФОЕ/на 0,5 мл при pH 2-4 в течение периода, составляющего по меньшей мере 20 мин.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложены различные композиции ротавирусной вакцины при объеме дозы, составляющем от 1 мл до 0,5 мл, причем указанные составы вакцины не содержат каких-либо буферов или антацидов и характеризуются незначительным снижением титра вакцины при pH 2 и pH в течение периода времени, составляющего 30 мин.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложены значения кислотонейтрализующей способности композиции ротавирусной вакцины с малым объемом дозы, составляющим от 0,5 до 1 мл на единицу вакцины, по сравнению с композициями ротавирусной вакцины в присутствии буферов, установленные с помощью анализов Россетта-Райс для детей.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена не содержащая буфера ротавирусная вакцина с объемом дозы всего 0,5 мл, которая способна обеспечивать индуцирование аналогичного или более сильного иммунного ответа из расчета по четырехкратной сероконверсии после вакцинации по сравнению с иммунным ответом согласно сероконверсии, индуцируемой с применением состава вакцины в присутствии буферов или при введении антацидов.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложен способ профилактики ротавирусной диареи у людей, включающий стадии введения эффективного количества стабилизированного состава ротавирусной вакцины, содержащего штамм ротавируса 116Е, комбинацию сахаров, выбранных из сахарозы, лактозы и трегалозы, гидролизат лактальбумина, рекомбинантный сывороточный альбумин человека, без присутствия какого-либо буферного состава в указанном составе ротавирусной вакцины.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложены стабильные композиции ротавирусной вакцины, которые являются стабильными при -20°C в течение по меньшей мере 5 лет.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложены стабильные композиции ротавирусной вакцины при 2-8°C, 25°C и 37°C в течение 2 лет, 6 месяцев и 3 недель соответственно.

Подробное описание изобретения

Вариант реализации 1: Полученные с применением буфера составы на основе ротавируса и кислотность желудка

В приведенном выше разделе, описывающем уровень техники, было упомянуто, что применение буферов является общепринятой стратегией приготовления ротавирусной вакцины, которую до настоящего времени использовали различные производители ротавирусной вакцины, и поэтому состав ротавирусной вакцины (Rota vaccine), содержащий штамм 116Е при -20°C (SPG и модифицированную по способу Дульбекко минимальную питательную среду (DMEM)), исследовали с применением цитратно-бикарбонатного буфера и условий физиологического раствора.

Компания Bharat Biotech International Limited получала штаммы ротавируса 116Е человека из Национального института здравоохранения (National Institute of Health) в рамках соглашения о передаче материалов с Национальным институтом аллергических и инфекционных заболеваний (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID), NIH, Бетесда, США. Полная геномная последовательность штаммов ротавируса 116Е уже описана в литературе.

Три состава ротавирусной вакцины с ротавирусом 116Е, хранившиеся при -20°C, относили к 3 группам (группам I, II и III), подробно описанным ниже. Композиции ротавирусной вакцины во всех трех группах, описанных ниже, содержали живой аттенуированный ротавирусный антиген штамма 116Е, растворенный в 10% SPG (сахарозе, дигидрофосфате калия и гидрофосфате калия) и модифицированной по способу Дульбекко минимальной питательной среде. Указанные составы вакцины обрабатывали отдельно друг от друга, как подробно описано ниже.

Группа I: 0,5 мл состава А с ротавирусом 116Е при -20°C.

Группа II: 2 мл (эквивалентно 4 дозам для человека по 0,5 мл из расчета на дозу для человека) состава А с ротавирусом 116Е, смешанного с 5 мл физиологического раствора.

Группа III: 0,570 мл состава А с ротавирусом 116Е + смесь [1,42 мл цитратно-бикарбонатного буфера + 8 мл 34,8 мЭкв HCl].

Как указано выше, группа I включала состав ротавирусной вакцины при -20°C , причем к указанному составу вакцины не был добавлен буфер или физиологический раствор, и титр вакцины измеряли в течение следующих 120 мин. В случае группы II обеспечивали 2 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е (хранившегося при -20°C) и добавляли 5 мл физиологического раствора, и титр вакцины измеряли при целевом титре 10^6 ФОЕ/мл в течение не более 120 мин. В случае группы III обеспечивали 0,57 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е (хранившегося при -20°C) и добавляли 1,42 мл цитратно-бикарбонатного буфера и 8 мл 34,8 мЭкв хлористоводородной кислоты.

Таблица 2. Титры вакцины в случае составов ротавирусной вакцины (при температуре хранения -20°C) в присутствии буферов через 0, 60 и 120 мин

№ группы	0 мин в ФОЕ/0,5 мл	60 мин в ФОЕ/мл	120 мин в ФОЕ/мл	Примечания
Группа I	$10^{6,35}$	$10^{6,17}$	$10^{6,32}$	Очень стабильный
Группа II	$10^{5,76}$	$10^{5,84}$	$10^{5,69}$	Довольно стабильный
Группа III	$10^{4,61}$	$10^{5,30}$	$10^{5,11}$	Довольно стабильный

Таким образом, приведенная выше таблица подтверждает, что при воздействии на вирус условий физиологического раствора или в присутствии буферных растворов титр ротавирусного антигена является стабильным, и, следовательно, стабильна указанная вакцина.

Вариант реализации 2: Иммунопероксидазный анализ составов ротавирусной вакцины при разных значениях pH.

Пример 1: Иммунопероксидазный анализ проводили после того, как составы ротавирусной вакцины подвергали прямому воздействию кислой среды путем непосредственного добавления к составу ротавирусной вакцины 34,8 мЭкв хлористоводородной кислоты (HCl). pH составов вакцины снижали непосредственно с pH 7 до различных более низких значений pH, составлявших pH 2 и pH 4, путем прямого добавления кислоты, и затем титр антигена вакцины или к вакцине измеряли при указанных более низких значениях pH 2 и pH 4. После этого титр вакцины измеряли в течение не более 1 ч при различных более низких значениях pH, составлявших 2 и 4. Были сделаны следующие наблюдения. Реакционную смесь исследовали в различные моменты времени и при различных уровнях pH. Подробности представлены ниже в табл. 3. Указанные составы ротавирусной вакцины (при температуре хранения -20°C) содержат живой аттенуированный ротавирусный антиген 116Е, 10% SPG (фосфат-глутамат натрия), растворенный в модифицированной по способу Дульбекко минимальной питательной среде.

Таблица 3. Результаты иммунопероксидазного анализа при целевом титре $10^5,0$ ФОЕ/0,5 мл дозы через 0 и 60 мин после непосредственного добавления кислоты к составам ротавирусной вакцины (температура хранения: -20°C)

Подробности образца	Титр в ФОЕ/0,5 мл дозы					Примечания
	Фактический титр в 0 минуту	Скорректированный титр с коэффициентом разбавления в 0 минуту	Фактический титр через 1 час	Скорректированный титр с коэффициентом разбавления через 1 час	Log снижения через 1 час	
0,5 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е при pH 7,4	$10^{4,95}$	н/д	$10^{4,94}$	$10^{4,94}$	-	-
0,5 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е + 34,8 мЭкв HCl при pH 4,0	$10^{3,58}$	$10^{5,05}$	$10^{3,58}$	$10^{5,05}$	Nil	Отсутствие влияния pH
0,5 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е + 34,8 мЭкв HCl при pH 2,0	$10^{3,54}$	$10^{5,01}$	$10^{2,93}$	$10^{4,40}$	0,55	Незначительное влияние pH

Примечание: Рассчитанное снижение значения титра инфекционности в результате разбавления =

$10^{1,47}$ ФОЕ. Таким образом, фактический титр вакцины после разбавления составляет $10^{2,93}$ при pH 2. Все образцы титровали в трех повторностях с помощью иммунопероксидазного анализа. Пероральная ротавирусная вакцина (целевой титр $10^{5,0}$ ФОЕ/0,5 мл) была стабильной при pH 4,0. Целевой титр означает минимальную концентрацию антигена ротавируса 116Е во флаконе с вакциной, которую нужно достичь в указанном флаконе. Исходный титр при нейтральном pH вакцины составляет $10^{4,95}$ ФОЕ/0,5 мл на 0-ую минуту. Титр вакцины при pH 2 на 0-ую минуту составляет $10^{3,54}$ ФОЕ/0,5 мл, и его значение падает до $10^{2,93}$ ФОЕ/0,5 мл в течение 1 ч. Таким образом, после прибавления значения коэффициента разбавления 1,47 в результате добавления кислоты к фактическому значению титра ($10^{2,93}$ ФОЕ/0,5 мл) скорректированный титр вакцины при pH 2 через 1 ч после добавления кислоты составляет $10^{4,40}$, что сравнимо с исходным титром вакцины $10^{4,95}$ при pH 7 на 0-ую минуту. Таким образом, вакцина имела log общего снижения титра вакцины только 0,55 при pH 2,0 в течение 1 ч. Это подтверждает, что даже при более низком значении pH, составляющем 2, то есть в конкретной кислой среде, содержащейся в желудке человека, состав ротавирусной вакцины способен поддерживать титр вакцины на значении $10^{4,40}$ ФОЕ/0,5 мл. При таком титре вакцины она способна индуцировать достаточный иммунный ответ на последующие ротавирусные инфекции. В клиническом испытании, проведенном с применением вакцины Rota 116Е с титром $10^{4,0}$, указанная вакцина обеспечивала 4-кратную сероконверсию примерно 62%, что является вполне обнадеживающим результатом. (Nita Bhandari et al, J Infect Dis 2009, 200, 421-9).

Пример 2.

Тот же эксперимент повторяли с другой вакциной (при температуре хранения -20°C), при этом целевой титр составил $10^{6,0}$ ФОЕ/0,5 мл (доза). Рассчитанные значения титра совместно с коэффициентом разбавления приведены в таблице ниже при различных значениях pH на 0-ую минуту и через 1 ч. Указанные составы ротавирусной вакцины (при температуре хранения -20°C) содержат живой аттенуированный ротавирусный антиген 116Е, 10% SPG, растворенный в DMEM.

Таблица 4. Результаты иммунопероксидазного анализа при целевом титре $10^{6,0}$ ФОЕ/0,5 мл дозы через 0 и 60 мин после непосредственного добавления кислоты к составам ротавирусной вакцины (температура хранения: -20°C)

Сведения об образце вакцины	pH	Скорректированный титр с коэффициентом разбавления при 0 ч в ФОЕ/0,5 мл	Скорректированный титр с коэффициентом разбавления через 1 час в ФОЕ/0,5 мл	Log снижения через 1 час	Примечания
0,5 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е	7,2	$10^{5,35}$	$10^{5,30}$	0,05 (нет снижения)	Отсутствие влияния pH
0,5 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е + 34,8 мЭкв HCl	4,0	$10^{5,33}$	$10^{5,09}$	0,24 (незначительное снижение)	Отсутствие влияния pH
0,5 мл состава вакцины с ротавирусом 116Е + 34,8 мЭкв HCl	2,0	$10^{4,89}$	$10^{4,21}$	0,68 (незначительное снижение)	Незначительное влияние pH

Вывод: При pH 4,0 в образцах вакцины происходило снижение титра вакцины, log которого составлял всего 0,24, что можно считать отсутствием влияния pH в практических условиях, поддерживаемых в течение 1 ч. При pH 2,0 происходило снижение титра, log которого составлял 0,46 на момент 0 ч, и log10 которого в ФОЕ составлял 0,68 через 1 ч. Это говорит о том, что pH оказывает очень незначительное влияние на значения титра вакцины при таком более низком значении кислого pH, как pH 2.

Из таблицы, приведенной выше, видно, что титр вакцины $10^{4,89}$ ФОЕ/0,5 мл при pH 2 снижается до значения титра $10^{4,21}$ ФОЕ/0,5 мл; log титра в пределах 4,89-4,21 вполне достаточен для репликации ротавируса в ЖКТ ребенка возрастом от 6 недель до 2 лет. Кислотность желудка ребенка также составляет pH 2, что отражает модель внутрижелудочной среды. Вакцина по-прежнему способна сохранять свое действие при титре, Log 10 которого в ФОЕ/0,5 мл составляет 4,89, который является достаточным для прохождения через желудок и последующего проникновения в кишечные ворсинки и для дальнейшей репликации ротавируса, ответственного за индуцирование иммунного ответа у ребенка, что обеспечивает защиту от ротавирусного гастроэнтерита и его предотвращение. Таким образом, было обнаружено, что вакцина стабильна при кислом pH, составляющем 2, в течение по меньшей мере 1 ч без какого-либо значительного снижения титра вакцины.

Вариант реализации 3: In vitro эксперимент для демонстрации того, что для вакцины, содержащей

ротавирус 116Е, не требуется антацида:

Помимо выводов из результатов клинического исследования, которые приведены далее в настоящем описании, также проверяли введение вакцины непосредственно без буфера при моделировании сходных условий воздействия кислой среды желудка *in vitro*.

Пример 3.1.

Обеспечивали 1 мл вакцины (состава 3А), содержащей ротавирус 116Е, комбинацию сахарозы (50%), лактозы (0,5%) и трегалозы (0,5%), гидролизат лактальбумина (1%), сывороточный альбумин человека (0,4%), добавляли 1,25 мл 0,1н. HCl и хорошо перемешивали. Отбирали образец и испытывали на содержание вируса при различных уровнях pH через различные промежутки времени. Результаты представлены в табл. 5.1 ниже.

Таблица 5.1. Иммунопероксидазный анализ 1 мл вакцины с ротавирусом 116Е (состава 3А)

№ обр.	Сведения об образце	Содержание вируса (ФОЕ/мл)
1	pH 2,0 - 0 минут	5,72
2	pH 2,0 - 10 минут	4,78
3	pH 2,0 - 30 минут	3,84
4	pH 3,0 - 0 минут	5,96
5	pH 3,0 - 10 минут	5,96
6	pH 3,0 - 30 минут	5,91
7	Контроль	6,10

Пример 3.2.

К 0,8 мл вакцины, содержащей ротавирус 116Е, комбинацию сахарозы (40%) и трегалозы (0,5%), гидролизат лактальбумина (20%), поливинилпирролидин (0,5%) (состава 3В), добавляли 1,25 мл 0,1н. HCl и хорошо перемешивали. Отбирали образец и определяли содержание вируса при различных уровнях pH через различные промежутки времени. Результаты представлены в табл. 5.2 ниже.

Таблица 5.2. Иммунопероксидазный анализ 0,8 мл вакцины с ротавирусом 116Е (состава 3В)

№ обр.	Сведения об образце	Содержание вируса (ФОЕ/мл)	Содержание вируса (ФОЕ/0,8 мл)
1	pH 2,0 - 0 минут	4,71	4,62
2	pH 2,0 - 10 минут	4,69	4,60
3	pH 2,0 - 30 минут	4,41	4,32
4	pH 3,0 - 0 минут	5,97	5,88
5	pH 3,0 - 10 минут	5,94	5,85
6	pH 3,0 - 30 минут	5,93	5,84
7	Контроль	6,10	

Пример 3.3.

К 0,5 мл вакцины с ротавирусом 116Е, содержащей комбинацию сахарозы (60%) и трегалозы (0,5%), соевый белок (20%), пиридоксин-HCl (0,1%), поливинилпирролидин (0,25%) (состава 3С), добавляли 1,25 мл 0,1н. HCl и хорошо перемешивали. Отбирали образец и испытывали на содержание вируса при различных уровнях pH через различные промежутки времени. Результаты представлены в табл. 5.3 ниже.

Таблица 5.3. Иммунопероксидазный анализ 0,8 мл вакцины с ротавирусом 116Е (состава 3С)

№ обр.	Сведения об образце	Содержание вируса (ФОЕ/0,5 мл)
1	pH 2,0 - 0 минут	4,29
2	pH 2,0 - 10 минут	4,21
3	pH 2,0 - 30 минут	3,39
4	pH 3,0 - 0 минут	5,20
5	pH 3,0 - 10 минут	5,17
6	pH 3,0 - 30 минут	5,08
7	Контроль	5,80

Пример 3.4.

К 0,5 мл вакцины с ротавирусом 116Е, содержащей 10% SPG, растворенный в DMEM (состава 3D), добавляли 1,25 мл 0,1н. HCl и хорошо перемешивали. Отбирали образец и испытывали на содержание вируса при различных уровнях pH через различные промежутки времени. Результаты представлены в табл. 5.4 ниже.

Таблица 5.4. Иммунопероксидазный анализ 0,8 мл вакцины с ротавирусом 116Е (состава 3D)

№ обр.	Сведения об образце	Содержание вируса (ФОЕ/0,5 мл)
1	pH 2,0 - 0 минут	4,78
2	pH 2,0 - 10 минут	4,48
3	pH 2,0 - 30 минут	4,29
4	pH 3,0 - 0 минут	5,22
5	pH 3,0 - 10 минут	5,17
6	pH 3,0 - 30 минут	4,70
7	Контроль	5,80

Пример 3.5.

К 0,5 мл вакцины с ротавирусом 116Е, содержащей сахарозу (40%), трегалозу (0,5%), лактозу (5%), рекомбинантный сывороточный альбумин человека (rHSA) (0,5%), гидролизат лактальбумина (ЛАН) (1%) и смешанный буфер (ацетат аммония + бикарбонат аммония + гидроортофосфат аммония) (состава 3D), добавляли 1,25 мл 0,1н. HCl и хорошо перемешивали. Отбирали образец и испытывали на содержание вируса при различных уровнях pH через различные промежутки времени. Результаты представлены в табл. 5.5 ниже.

Таблица 5.5. Иммунопероксидазный анализ 0,8 мл вакцины с ротавирусом 116Е (состава 3D)

№ обр.	Сведения об образце	Содержание вируса (ФОЕ/0,5 мл)
1	pH 2,0 - 0 минут	4,77
2	pH 2,0 - 10 минут	4,65
3	pH 2,0 - 30 минут	4,39
4	pH 3,0 - 0 минут	5,21
5	pH 3,0 - 10 минут	5,19
6	pH 3,0 - 30 минут	4,87
7	Контроль	5,80

Выводы: Из приведенных выше таблиц очевидно, что при pH 2,0 в течение 30 мин любые составы вакцины, содержащие ротавирус 116Е, также способны быть устойчивыми при отсутствии какого-либо буфера или какого-либо антацида.

Вариант реализации 4. Анализ Россетта-Райс для детей (BRR)

Анализ BRR представляет собой валидированную методику для кислотонейтрализующей способности составов ротавирусной вакцины. Таким образом, выбранные составы вакцины, содержащие цитратно-фосфатный буфер и цитратно-бикарбонатный буфер, оценивают на кислотонейтрализующую способность с использованием указанного анализа. Эксперименты *in vitro* проводили в смоделированных условиях желудочной среды ребенка с применением анализа Россетта-Райс для детей (BRR). Различные составы с различными комбинациями буферных агентов были выбраны для экспериментов по нейтрализации кислотности, и результаты представлены в таблице ниже при различных значениях pH, при которых были смоделированы условия, соответствующие желудочной среде ребенка. Составы вакцин разбавляли водой для инъекций до 10 мл, затем добавляли 4 мл 0,1н. HCl, после чего добавляли 0,5 мл в минуту 0,1н. HCl до достижения pH 4,0. Кислотонейтрализующую способность (ANC) определяют как время в минутах, необходимое для поддержания pH выше 4,0.

Таблица 6. Подробные сведения о составах вакцины

Состав вакцины 4А	Антиген ротавируса 116Е с целевым титром 10^6 ФОЕ/0,5 мл; 10% SPG и DMEM (достаточное количество)
Состав вакцины 4В	Антиген ротавируса 116Е с целевым титром 10^6 ФОЕ/0,5 мл; 10% SPG и DMEM (достаточное количество), добавленные к 2,5 мл цитратно-бикарбонатного буфера
Состав вакцины 4С	Антиген ротавируса 116Е с целевым титром 10^6 ФОЕ/0,5 мл, комбинация по меньшей мере 2 сахаров (50% сахарозы и 0,5% трегалозы) и 0,5% гидролизата лактальбумина. (Образец 8 ниже).
Состав вакцины 4D	Антиген ротавируса 116Е с целевым титром 10^6 ФОЕ/0,5 мл, комбинация по меньшей мере 2 сахаров (40% сахарозы, 0,5% трегалозы), 0,5% гидролизата лактальбумина, 0,35% сывороточного альбумина человека и 1,1 М фосфатный буфер.

В ходе анализа Россетта-Райс для детей, проведенного с применением составов вакцины 4А-4D, указанных выше, были сделаны следующие наблюдения (табл. 7).

Таблица 7. Анализ Россетта-Райс для детей в отношении составов ротавирусной вакцины с буфером по сравнению с составами без него

Составы вакцины	Исходный рН	рН после добавления кислоты	Объем добавленной 0,1 н. HCl	Значения анализа Россетта-Райс для детей	Исходные титры вакцины в ФОЕ/0,5 мл	Титры вакцины в ФОЕ/0,5 мл через 1 час
Состав вакцины 4А при -20°C без буфера с дозой 0,5 мл	7,48	1,95	4,0 мл	BRR менее 0 минут (мгновенное падение рН)	$10^{4,83}$	$10^{3,83}$
Состав вакцины 4В при -20°C с 2,5 мл цитратно-бикарбонатного буфера с дозой 0,5 мл	8,35	4,22	10,0 мл	BRR 12 минут	$10^{6,17}$	$10^{6,15}$
Состав вакцины 4С при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ без буфера с дозой 0,5 мл	7,28	3,98	5,0 мл	BRR 2 минуты	$10^{5,30}$	$10^{5,02}$
Состав вакцины 4D при $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ с буфером в дозе 1,5 мл или 2 мл	6,75	4,33	10,5 мл	BRR приблизительно 13 минут	$10^{6,12}$	$10^{6,11}$

Вывод: Таким образом, из приведенной выше таблицы видно, что даже для состава вакцины 4А, указанного выше, который демонстрирует мгновенное падение рН от 7,48 до 1,95, титр вакцины удерживается в интервале от $10^{4,83}$ ФОЕ/0,5 мл до $10^{3,83}$ ФОЕ/0,5 мл. Таким же образом, и в случае состава вакцины 4С титр вакцины удерживается в интервале от $10^{5,30}$ до $10^{5,02}$ ФОЕ/0,5 мл, когда значение рН падает от 7,28 до 3,98 в течение 2 мин. Таким образом, даже если значение BRR составляет всего 2 мин, титр вакцины удерживается на приемлемом уровне, т.е. составляет $10^{5,02}$ ФОЕ/0,5 мл. Этой значительной величины титра вакцины достаточно для обеспечения индуцирования иммунного ответа и тем самым обеспечения защиты от ротавирусного гастроэнтерита и его предотвращения у детей.

Вариант реализации 4: Клиническое испытание вакцины ROTAVAC®, содержащей штамм ротавируса 116Е, без добавления буфера.

Гипотеза и обоснование исследования

Предполагается, что естественная передача ротавируса происходит фекально-оральным путем. Ротавирусы в целом являются кислотонеустойчивыми, и считается, что кислая среда влияет на жизнеспособность указанного вируса.

Учитывая кислотонеустойчивую природу ротавирусов, они крайне успешно обеспечивают повсеместное заражение млекопитающих, большая часть которых имеет значения рН желудка, составляющие примерно 2. Одно из предположений заключается в том, что желудок ребенка может быть несколько более податливым для выживания ротавируса, чем желудок взрослого человека, так как уровень рН в желудке ребенка обычно составляет приблизительно 3,2 по сравнению со значением для взрослых, составляющим приблизительно 1,0. Это могло бы объяснить тот факт, что от 60 до 90% отмечаемых у человека случаев ротавирусного заболевания встречаются у детей в возрасте младше 3 лет.

План исследования

Для того чтобы проверить эту гипотезу, было проведено большое многоцентровое рандомизиро-

ванное контролируемое испытание для оценки и сравнения иммунного ответа на вакцину у субъектов, получавших вакцину ROTAVAC с цитратно-бикарбонатным буфером, с теми, кто получал ROTAVAC без буфера.

Соответственно, указанное испытание включало следующие три группы лечения:

Группа I (получала ROTAVAC® за 5 мин до введения 2,5 мл буфера),

Группа II (получала ROTAVAC® без буфера),

Группа III (получала ROTAVAC®, смешанную с 2,5 мл буфера непосредственно перед введением).

Исследователь и ответственные за безопасность (координаторы исследования) не знали назначений по группам лечения. Слепое исследование обеспечивала опытная медицинская сестра, которая вводила вакцину в соответствии с обозначенной группой лечения. Все участники исследования получали 3 дозы вакцины с интервалом в 4 недели. Иммунный ответ на вакцину проверяли через 4 недели после третьей дозы вакцины (на 84 день) и сравнивали с исходными значениями (в 0 день). Иммунногенность определяли из расчета по среднегеометрическим титрам (СГТ) сывороточного антиротавирусного IgA и сероконверсии (кратного повышения уровней антител от периода перед вакцинацией до периода после вакцинации) в группах лечения.

Результаты исследования и выводы

Иммунный ответ после вакцинации между группами лечения был сопоставим при отсутствии статистически значимого различия в ответе по антиротавирусному IgA. Важно отметить, что сероконверсия и значения СГТ, полученные в группе II (введение ROTAVAC® без буфера), были сходными со значениями, полученными в двух других группах лечения, в которых ROTAVAC® вводили с буфером.

СГТ антиротавирусного IgA после вакцинации в группе, где ROTAVAC вводили без буфера, составил 20,7 ед/мл в сравнении с 19,6 ед/мл и 19,2 ед/мл в двух группах, которые получали антацидный буфер за 5 мин до вакцины и одновременно в виде смеси с вакциной, соответственно (табл. 8). Различия между группами не были статистически значимыми ($p > 0,05$, Т-критерий Стьюдента).

Таблица 8. Среднегеометрические титры и 95% ДИ для результатов (0 день и 84 день)

Осмотр	Группа I (N = 290)		Группа II (N = 287)		Группа III (N = 286)	
	СГТ	95% ДИ	СГТ	95% ДИ	СГТ	95% ДИ
0 ДЕНЬ	10,5	(9,4, 11,7)	10,8	(9,7, 11,9)	10,2	(9,2, 11,3)
84 ДЕНЬ	19,6	(17,0, 22,7)	20,7	(17,9, 24,0)	19,2	(16,8, 22,1)

N = Количество субъектов, оцениваемых в каждой группе;

СГТ = среднее геометрическое;

95% ДИ (НП, ВП) = доверительные интервалы (нижний предел, верхний предел)

Аналогично четырехкратная сероконверсия, наблюдаемая в группах, получавших ROTAVAC® без антацидного буфера и с буфером, имела сходные значения 29,2, 24,5 и 25,1% соответственно (табл. 9). Кроме того, нижний предел 95% доверительного интервала различия в сероконверсии (2-кратной) между группами лечения составлял более -10%, что указывает на наименьшую величину иммунного ответа, достигнутого с применением всех трех схем лечения (табл. 10).

Таблица 9. Сероконверсия и 95% ДИ (2-, 3- или 4-кратное изменение титров антител) между исходными данными и 84 днем после вакцинации

Кратность изменений	Группа I (N = 290)		Группа II (N = 287)		Группа III (N = 286)	
	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ
2	30,7	(25,7, 36,2)	35,2	(29,9, 40,9)	33,5	(28,3, 39,2)
3	27,6	(22,8, 33,1)	32,4	(27,3, 38,1)	31,8	(26,7, 37,4)
4	24,5	(19,8, 29,7)	29,2	(24,3, 34,8)	25,1	(20,5, 30,5)

N = Количество субъектов, оцениваемых в каждой группе;

(95% ДИ) = доверительные интервалы (нижний предел, верхний предел)

Таблица 10. Различие в % 2-кратной сероконверсии после вакцинации в группах лечения

% 2-кратной сероконверсии после вакцинации (84 день)						
	Группа I (N = 290)		Группа II (N = 287)		Группа III (N = 286)	
	%	95% ДИ	%	95% ДИ	%	95% ДИ
84 ДЕНЬ	30,7	(25,7, 36,2)	35,2	(29,9, 40,9)	33,5	(28,3, 39,2)
Различие в % сероконверсии с 95% ДИ (двусторонний критерий χ -квадрат)						
Группа			% (95% ДИ различия)			
Группа I относительно группы II			4,5 (-3,5, 12,5)			
Группа II относительно группы III			1,6 (-6,5, 9,7)			
Группа I относительно группы III			2,9 (-4,7, 10,5)			

Реактогенность и безопасность в отношении запрашиваемых и незапрашиваемых нежелательных явлений были сопоставимы по всем трем группам при отсутствии статистически значимого различия. Вакцина ROTAVAC® хорошо переносилась во всех трех группах лечения, в которых получали указанную вакцину с антацидным буфером или без него.

Вариант реализации 5: Новые составы, содержащие ротавирус 116E

Данные о стабильности жидких составов вакцины ORV 116E при 37°C, 25°C и 2-8°C

Были исследованы приведенные ниже составы ротавирусной вакцины с объемом дозы, составляющим 0,5 мл, без буфера (образцы 1-12, 14-16) и со смешанным буфером при объеме дозы 0,5 мл (образец 13) в течение продолжительного периода времени, составляющего вплоть до 5 лет. Ниже приведены подробные сведения о различных составах наряду с данными о их стабильности при 37°C в течение периода вплоть до 4 недель, 25°C в течение по меньшей мере 6 месяцев и при 5±3°C в течение периода вплоть до 2-5 лет. Указанные исследования подтверждают, что указанные составы ротавирусной вакцины без буфера при объемах дозы, составляющих 0,5 мл, также являются стабильными по своей природе в течение продолжительных периодов времени при температурах охлаждения в течение по меньшей мере 2 лет. Также обнаружено, что составы ротавирусной вакцины также являются стабильными в течение периода 5 лет при температурах охлаждения.

Готовили образец 1, содержащий ротавирус 116E, 50% сахарозы, 0,5% лактозы, 0,5% сывороточного альбумина человека (HSA) и 0,05% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 1:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
5±3 °C	6,02	6,0			6,43		6,21	6,16	6,16	6,07
25°C	6,02	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37°C	6,02	5,32	2,63							

Готовили образец 2, содержащий ротавирус 116E, 50% сахарозы, 0,5% трегалозы, 0,5% HSA и 0,5% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 2:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
5±3 °C	6,09	6,14			6,19		6,07	6,10	6,05	6,01
25°C	6,09	6,02	6,06	5,63	5,51	2,48				
37°C	6,09	5,47	3,23							

Готовили образец 3, содержащий ротавирус 116E, 50% сахарозы, 1,0% трегалозы, 0,5% HSA и 0,5% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 3:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
5±3 °C	6,22	6,24			6,26		6,14	6,20	6,13	6,04
25°C	6,22	6,18	6,15	5,80	5,34	2,03				
37°C	6,22	5,35	3,22							

Готовили образец 4, содержащий ротавирус 116E, 40% сахарозы, 0,5% лактозы и 1,0% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 4:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	15М	24М	60М
5±3 °С	6,19	6,18			6,08		6,21	6,24	6,12	
25°С	6,19	5,66	5,10	4,8	3,01					
37°С	6,19	4,23	2,01							

Готовили образец 5, содержащий ротавирус 116Е, 40% сахарозы, 5,0% мальтозы и 1,0% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 5:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	15М	24М	60М
5±3 °С	6,35	6,37			6,18		6,01	6,17	6,08	
25°С	6,35	5,89	5,11	4,77	2,43					
37°С	6,35	5,31	3,58							

Готовили образец 6, содержащий ротавирус 116Е, 40% сахарозы, 0,5% трегалозы и 1% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 6:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	15М	24М	60М
5±3 °С	6,19	6,15			6,10		6,03	6,22	6,13	
25°С	6,19	5,87	5,43	5,12	3,25					
37°С	6,19	4,02	2,52							

Готовили образец 7, содержащий ротавирус 116Е, 40% сахарозы, 1,0% трегалозы и 1,0% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 7:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	15М	24М	60М
5±3 °С	6,34	5,79			6,00		5,55	6,07	6,09	
25°С	6,34	6,07	5,81	5,9	5,51	4,65				
37°С	6,34	5,32	2,63							

Готовили образец 8, содержащий ротавирус 116Е, 50% сахарозы, 0,5% трегалозы и 0,5% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 8:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	15М	18М	24М	36М	60М
5±3 °С	6,34	6,34			6,33	6,31	6,24	6,14	6,08	
25°С	6,34	6,32	6,14	6,01	5,25					
37°С	6,34	5,11	4							

Готовили образец 9, содержащий ротавирус 116Е, 70% сахарозы, 0,5% трегалозы.

Стабильность образца 9:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	15М	18М	24М	36М	60М
5±3 °С	6,38	6,31			6,23	6,44	6,35	6,26	6,18	
25°С	6,38	6,41	6,35	6,23	5,57					
37°С	6,38	5,07	4,01							

Готовили образец 10, содержащий ротавирус 116Е, 50% сахарозы, 0,5% лактозы, 0,5% мальтозы, 0,5% HSA и 0,05% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 10:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	15М	18М	24М	36М	60М
5±3 °С	6,25	6,15			6,03	6,34	6,08	6,12	6,11	6
25°С	6,25	6,14	6,27	6,12	5,88					
37°С	6,25	5,02	4,35							

Готовили образец 11, содержащий ротавирус 116Е, 50% сахарозы, 0,5% трегалозы, 0,5% мальтозы, 0,5% HSA.

Стабильность образца 11:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
5±3 °С	6,68	6,62	6,95	6,84	6,64	6,65	6,37	6,72	6,05	
25°С	6,68	6,50	6,20	6,04	5,32	4,47				
37°С	6,68	6,10	5,58	4,26						

Готовили образец 12, содержащий ротавирус 116Е, 50% сахарозы, 0,5% трегалозы, 0,5% HSA и 0,05% гидролизата лактальбумина.

Стабильность образца 12:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
5±3 °С	6,62	6,76	6,98	7,00	6,86	6,74	5,99	6,46	6,17	
25°С	6,62	6,46	6,42	5,99	5,13	3,25				
37°С	6,62	5,58	5,06							

Готовили образец 13, содержащий ротавирус 116Е, сахарозу (40%), трегалозу (0,5%), лактозу (5%), rHSA (0,5%), LAN (1%) и смешанный буфер (ацетат аммония + бикарбонат аммония + гидроортофосфат аммония).

Стабильность образца 13:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
5±3 °С	6,61	6,59	6,58	6,60	6,53	6,54	6,18	6,01	5,83	
25°С	6,61	6,46	6,44	5,79	5,25	4,15				
37°С	6,61	5,56	5,01							

Стабильность образца 13 при -20°С:

Темп.	0 день	1М	2М	3М	6М	9М	12М	24М	36М	60М
-20°С	6,61	6,59	6,59	6,56	6,54	6,52	6,21	6,11	6,13	6,09

Образцы 14, 15 и 16 готовили с применением ротавируса 116Е, 10% SPG, растворенного в DMEM. Образцы 14, 15 и 16 хранили при -20°С, и их стабильность проверяли в течение 60 месяцев. Было обнаружено, что составы вакцины 13, 14 и 15 очень стабильны при -20°С в течение периода по меньшей мере 5 лет.

Образец вакцины	0 день	3М	6М	9М	12М	24М	36М	48М	60М
Образец 14 (10 ^{4,0} ФОЕ/0,5 мл)	4,25	4,01	4,08	4,15	4,25	4,02	4,18	4,12	4,08
Образец 15 (10 ^{5,0} ФОЕ/0,5 мл)	5,55	5,42	5,68	5,37	5,77	5,89	5,32	5,40	5,32
Образец 16 (10 ^{6,0} ФОЕ/0,5 мл)	6,12	6,12	6,06	6,33	6,36	6,27	6,15	6,11	6,05

Таким образом, установлено, что различные композиции ротавирусной вакцины с объемом дозы, составляющим 0,5 мл, являются стабильными при -20°С в течение 5 лет, при 2-8°С в течение 2 лет, при 25°С в течение 6 месяцев и при 37°С в течение 1 недели. Также обнаружено, что независимо от состава вакцины указанная ротавирусная вакцина при объеме дозы, составляющем от 0,5 до 1 мл, также является кислотоустойчивой, как представлено в варианте реализации 3 при pH в диапазоне 2-4. Таким образом, заявители хотели бы упомянуть, что независимо от подробных сведений о композициях вакцины любая ротавирусная вакцина, содержащая живой аттенуированный ротавирус 116Е, способна противостоять сильнокислой среде в желудке ребенка и обеспечивать индуцирование необходимого иммунного ответа на ротавирусные инфекции. Составы вакцины, представленные в настоящей заявке, предназначены только с целью уточнения широты и объема настоящего изобретения. Заявителю нецелесообразно предоставлять подробные сведения обо всех возможных составах вакцины, хотя заявителем были указа-

ны многочисленные стратегии приготовления в варианте реализации 3, примере 3 и варианте реализации 5. Таким образом, все возможные изменения, очевидные специалисту в данной области техники, для стратегии приготовления ротавирусной вакцины, содержащей штамм ротавируса 116Е, также входят в настоящее изобретение. Следует понимать и соответствующим образом истолковывать, что композиции вакцины, содержащие живой аттенуированный ротавирус 116Е, которые конкретно не включены в настоящую патентную заявку, также входят в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ротавирусная вакцина, содержащая:
 - a) штамм ротавируса 116Е;
 - b) комбинацию сахаров, выбранных из сахарозы в концентрации 40-70%, лактозы в концентрации 0,5% и трегалозы в концентрации 0,5-1%;
 - c) гидролизат лактальбумина в концентрации 0,05-1% и
 - d) рекомбинантный сывороточный альбумин человека в концентрации 0,4-0,5%,причем указанная вакцина не содержит буфер или антацид, причём указанная вакцина является стабильной в желудке при от рН 2 до рН 4 без снижения титра, способна выдерживать воздействие кислой среды желудка у человека в течение по меньшей мере 20 мин и не требует введения какого-либо антацида или буфера до или после введения указанной вакцины.
2. Ротавирусная вакцина по п.1, содержащая ротавирус 116Е, при этом объем дозы на единицу вакцины составляет не более 1 мл.
3. Ротавирусная вакцина по п.1, отличающаяся тем, что объем дозы на единицу вакцины составляет 0,8 мл на единицу вакцины.
4. Ротавирусная вакцина по п.1, отличающаяся тем, что объем дозы на единицу вакцины составляет 0,5 мл на единицу вакцины.
5. Ротавирусная вакцина по п.1, отличающаяся тем, что указанная вакцина является стабильной при -20°C в течение по меньшей мере 60 месяцев.
6. Ротавирусная вакцина по п.1, отличающаяся тем, что указанная вакцина является стабильной при 2-8°C в течение по меньшей мере 36 месяцев, при 25°C в течение 6 месяцев и при 37°C в течение по меньшей мере 4 недель.
7. Ротавирусная вакцина по п.1, отличающаяся тем, что индуцируемый иммунный ответ, определенный по четырехкратной сероконверсии после вакцинации, является аналогичным или более сильным чем иммунный ответ, определенный по сероконверсии, достигаемой с применением состава вакцины в присутствии буферов или при введении антацидов.
8. Ротавирусная вакцина по п.1, отличающаяся тем, что указанная вакцина представляет собой жидкий пероральный состав вакцины.
9. Способ индукции иммунного ответа на ротавирус у субъекта, включающий пероральное введение 0,5 мл стабилизированной ротавирусной вакцины, не содержащей какого-либо антацида или буфера, причём указанная вакцина содержит штамм ротавируса 116Е; комбинацию сахаров, выбранных из сахарозы в концентрации 40-70%, лактозы в концентрации 0,5% и трегалозы в концентрации 0,5-1%; гидролизат лактальбумина в концентрации 0,05-1%; рекомбинантный сывороточный альбумин человека в концентрации 0,4-0,5%, без присутствия какого-либо буфера или антацида в указанной ротавирусной вакцине, причём указанная вакцина является стабильной в желудке при от рН 2 до рН 4 без снижения титра, способна выдерживать воздействие кислой среды желудка у человека в течение по меньшей мере 20 мин и не требует введения какого-либо антацида или буфера до или после введения субъекту указанной вакцины.
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная ротавирусная вакцина сохраняет стабильность в течение периода по меньшей мере 60 месяцев при -20°C.
11. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная ротавирусная вакцина сохраняет стабильность в течение периода по меньшей мере 3 года при 2-8°C, периода по меньшей мере 6 месяцев при 25°C и в течение периода по меньшей мере 4 недели при 37°C.
12. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанная вакцина при пероральном введении субъекту в отсутствие антацида или буфера способна индуцировать аналогичный или более сильный иммунный ответ, определённый по четырехкратной сероконверсии после вакцинации по сравнению с иммунным ответом, определённым по сероконверсии, достигаемой при применении состава вакцины или в присутствии буферов, или при введении антацидов.

