

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045551**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.05**

**(51)** Int. Cl. **C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 35/763** (2015.01)

**(21)** Номер заявки  
**201791382**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.12.15**

---

**(54) СТАБИЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ЗАМОРОЖЕННОГО ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА**

---

**(31)** 62/093,663

**(32)** 2014.12.18

**(33)** US

**(43)** 2017.10.31

**(86)** PCT/US2015/065858

**(87)** WO 2016/100364 2016.06.23

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

**(72)** Изобретатель:  
Литовски Дженнифер Р., Сиска  
Кристин Клаудия, Кервин Брюс  
Артур (US)

**(74)** Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

**(56)** WO-A2-2013177172

WO-A1-2013106398

US-A1-2006141483

SHAHROKH M. GHOBADLOO ET AL.:  
"Carbohydrate-Based Ice Recrystallization Inhibitors  
Increase Infectivity and Thermostability of Viral  
Vectors", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 4, 1 January  
2014 (2014-01-01), pages 5903-5903, XP055254002,  
GB ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep05903, the  
whole document

WO-A2-03082200

**(57)** Композиция живого вируса, которая сохраняет инфекционность и обеспечивает улучшенную стабильность вируса во время одного или более циклов замораживания/размораживания и/или при длительном хранении в жидком состоянии при температурах от чуть выше температуры замерзания до температуры окружающей среды.

**045551**

**B1**

**045551**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно 35 U.S.C. 119 (e) по заявке США № 62/093663, поданной 18 декабря 2014 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **Уровень техники**

Живые вирусы, такие как вирус простого герпеса, обычно нестабильны в течение длительных периодов времени при температуре хранения выше  $-80^{\circ}\text{C}$ . Отсутствие термостабильности представляет собой проблему для таких вирусов, особенно для терапевтических вирусов в жидкой композиции. Такие терапевтические вирусные композиции должны храниться и транспортироваться в замороженном состоянии и использоваться вскоре после размораживания для поддержания их терапевтически эффективной инфекционности.

Отсутствие термостабильности создает проблемы, связанные с производством, хранением и транспортировкой. Во время производственных операций, например, циклы замораживания/размораживания могут приводить к субоптимальным выходам процесса и отсутствию необходимой гибкости в цепочке поставок. Хранение и транспортировка также сложны, что приводит к сложной обработке и сложным цепям поставок.

Отсутствие термостабильности также создает коммерческие проблемы. Композиции живого вируса, требующие хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$  для обеспечения стабильного срока хранения, приводят к сложным протоколам хранения и обработки для лиц, предоставляющих медицинские услуги. Такие ограничения увеличивают риск возврата продукта, если он хранится неправильно или если весь продукт не используется. Это может увеличить стоимость для клиента.

Настоящее изобретение предлагает лекарственную форму живого вируса, которая может быть использована для стабилизации и сохранения инфекционности во время многочисленных циклов замораживания/размораживания и при длительном хранении при низких и окружающих температурах. Лекарственная форма уменьшает ограничения при производстве, транспортировке, хранении и использовании вируса, обеспечивая гибкость без потери стабильности и/или инфекционности.

Растущая область онколитической иммунотерапии увеличила терапевтическое применение онколитических вирусных композиций. Любые улучшения в отношении композиций живого вируса, которые сохраняют инфекционность и обеспечивают улучшенную стабильность вируса в течение одного или нескольких циклов замораживания/размораживания и/или при длительном хранении в жидком состоянии при температурах в пределах от чуть выше температуры замерзания до температуры окружающей среды, будут выгодными для эксплуатации, а также значительно увеличивают удобство и гибкость для поставщика медицинских услуг и пациентов. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, предоставляя такие композиции.

### **Краткое описание изобретения**

В одном варианте реализации изобретения предложена композиция живого вируса, содержащая вирус простого герпеса, белок, по меньшей мере один сахар, хлорид натрия и фосфат натрия при pH 7,4, причем композиция является замороженной.

В одном варианте реализации изобретения композиция может быть разморожена и хранится при температуре от 2 до по меньшей мере  $25^{\circ}\text{C}$ . В связанном варианте реализации изобретения после размораживания при температуре от 2 до по меньшей мере  $25^{\circ}\text{C}$  композицию живого вируса повторно замораживают и хранят при температуре, равной по меньшей мере  $-30^{\circ}\text{C}$ .

В другом варианте реализации изобретения композиция может быть разморожена и хранится при температуре от  $2^{\circ}\text{C}$  до  $8^{\circ}\text{C}$ . В связанном варианте реализации изобретения после размораживания при температуре от  $2^{\circ}\text{C}$  до  $8^{\circ}\text{C}$  композицию живого вируса повторно замораживают и хранят при температуре, равной по меньшей мере  $-30^{\circ}\text{C}$ .

В другом варианте реализации изобретения белок представляет собой частично гидролизованный желатин или сывороточный альбумин человека.

В другом варианте реализации изобретения концентрация частично гидролизованного желатина составляет от 0,01 до 1% мас./об.

В другом варианте реализации изобретения концентрация сывороточного альбумина человека составляет от 0,25 до 1%.

В другом варианте реализации изобретения по меньшей мере один сахар представляет собой сорбит, миоинозитол или сахарозу. В связанном варианте реализации изобретения концентрация сорбита составляет 2% мас./об. В связанном варианте реализации изобретения концентрация сорбита составляет 4% мас./об. В связанном варианте реализации изобретения концентрация сахарозы составляет от 9 до 15% мас./об.

В другом варианте реализации изобретения концентрация хлорида натрия составляет 145 мМ.

В другом варианте реализации изобретения концентрация хлорида натрия составляет около 145 мМ.

В другом варианте реализации изобретения концентрация фосфата натрия составляет 100 мМ.

В другом варианте реализации изобретения концентрация фосфата натрия составляет около 100 мМ.

В другом варианте реализации изобретения концентрация фосфата натрия составляет 102 мМ.

В другом варианте реализации изобретения концентрация фосфата натрия составляет около 102 мМ.

В другом варианте реализации изобретения частично гидролизованный желатин является свиным.

В другом варианте реализации изобретения вирус представляет собой вирус простого герпеса 1.

В другом варианте реализации изобретения вирус простого герпеса представляет собой клинический изолят.

В другом варианте реализации изобретения вирус простого герпеса представляет собой клинический изолят рецидивировующего лабиального герпеса.

В другом варианте реализации изобретения штамм вируса простого герпеса 1 выбирают из группы, состоящей из штамма JS1, штамма 17+, штамма F и штамма KOS.

В другом варианте реализации изобретения вирус простого герпеса не содержит один или более функциональных генов. В связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса не содержит функциональный ген, кодирующий ICP34.5. В связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса не содержит функциональный ген, кодирующий ICP47. В связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса дополнительно не содержит функциональный ген, кодирующий ICP6, функциональный ген, кодирующий гликопротеин Н или функциональный ген, кодирующий тимидинкиназу. В связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса не содержит функциональный ген, кодирующий vhs (белок выключения хозяина - host shut off). В другом связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса не содержит функциональный ген, кодирующий UL43. В связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса не содержит функциональный ген, кодирующий VMW, функциональный ген, кодирующий ICPO, функциональный ген, кодирующий ICP4, функциональный ген, кодирующий ICP22 или функциональный ген, кодирующий ICP27. В связанном варианте реализации изобретения модификация вируса простого герпеса была проведена таким образом, что ген Us11 экспрессируется как ранний ген. В связанном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса содержит один или более гетерологичных генов и/или вирусных генов. В связанном варианте реализации изобретения гетерологичный ген и/или вирусный ген выбирают из группы, состоящей из гена, кодирующего цитотоксин, иммуномодулирующий белок, опухолевый антиген, активатор пролекарства, опухолевый супрессор, фермент, превращающий пролекарство, белки, способные вызывать слияние клетки с клеткой, ингибитор TAP, вирусный белок Us11, молекулу антисмысловой РНК или рибозим. В другом связанном варианте реализации изобретения гетерологичный ген и/или вирусный ген выбирают из группы, состоящей из гена, кодирующего ИЛ-12, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), цитозиндезаминазу, фузогенный гликопротеин лейкемии гиббоновой обезьяны, полипептид UL49.5 бычьего герпесвируса (BHV) или вирусный белок Us11.

В другом варианте реализации изобретения вирус простого герпеса выбирают из группы, состоящей из талимоген лагерепапевка, Seprehvir™ (BPT-1716), G207, OrienX010, NV1020, M032, ImmunovEX, NSC 733972, HF-10, BV-2711, JX-594, Myb34.5, AE-618, Brainwel™, Hearwel™ и OncoVEX-GALV/CD.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ уничтожения опухолевых клеток у пациента включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции живого вируса, описанной выше, в условиях, эффективных для уничтожения опухолевых клеток у пациента. В связанном варианте реализации изобретения композицию живого вируса вводят в комбинации с ингибитором контрольных точек. В связанном варианте реализации изобретения композицию живого вируса вводят до, одновременно с или после ингибитора контрольных точек. В связанном варианте реализации изобретения опухолевые клетки выбраны из группы, состоящей из клеток астроцитомы, олигодендроглиомы, менингиомы, нейрофибромы, глиобластомы, эпендимомы, шванномы, нейрофибросаркомы, медуллобластомы, меланомы, клеток рака поджелудочной железы, клеток карциномы предстательной железы, клеток рака молочной железы, клеток рака легкого, клеток рака толстого кишечника, клеток гепатомы, мезотелиомы, клеток рака мочевого пузыря и клеток эпидермоидной карциномы. В связанном варианте реализации изобретения пациент представляет собой человека. В связанном варианте реализации изобретения введение осуществляют путем инъекции.

В другом варианте реализации изобретения инфекционность увеличивается по сравнению с той же композицией живого вируса, которая не содержит белок.

#### Графические материалы

Фиг. 1: Влияние буфера и содержания солей на стабильность замораживания/размораживания. Закрашенный ромб, сплошная линия: 10 мМ Naphos (фосфат натрия), незакрашенный круг, пунктирная линия: 10 мМ Kphos (фосфат калия), закрашенный круг, сплошная линия: 100 мМ Kphos; закрашенный квадрат, сплошная линия: 73 мМ NaCl; незакрашенный квадрат, пунктирная линия: 0 мМ NaCl и закрашенный ромб, пунктирная линия: контроль.

Фиг. 2А: Влияние концентрации сахара на стабильность замораживания/размораживания. Закра-





Фиг. 10F: Стабильность во время циклов замораживания/размораживания при  $10^8$  БОЕ/мл. Закрашенный квадрат: 0,5% чгЖелатин; закрашенный круг: 0,5% рЧСА и закрашенный ромб, пунктирная линия: контроль.

Фиг. 10G: Стабильность во время длительного хранения в жидком виде при 2-8°C при  $10^6$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат: 0,5% чгЖелатин; закрашенный круг: 0,5% рЧСА и закрашенный ромб, пунктирная линия: контроль.

Фиг. 10H: Стабильность во время длительного хранения в жидком виде при 2-8°C при  $10^8$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат: 0,5% чгЖелатин; закрашенный круг: 0,5% рЧСА и закрашенный ромб, пунктирная линия: контроль.

Фиг. 10I: Стабильность во время длительного хранения в жидком виде при 25°C при  $10^6$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат: 0,5% чгЖелатин; закрашенный круг: 0,5% рЧСА и закрашенный ромб, пунктирная линия: контроль.

Фиг. 10J: Стабильность во время длительного хранения в жидком виде при 25°C при  $10^8$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат: 0,5% чгЖелатин; закрашенный круг: 0,5% рЧСА и закрашенный ромб, пунктирная линия: контроль.

Фиг. 11A: Статическое хранение при 2-8°C при  $10^6$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат, пунктирная линия: буфер+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, пунктирная линия: буфер+0,5% рЧСА, закрашенный ромб, пунктирная линия: Контроль, буфер. Закрашенный квадрат, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% рЧСА и закрашенный ромб, сплошная линия: контроль, лекарственная форма.

Фиг. 11B: Замороженный при -70°C, затем хранящийся при 2-8°C (1 цикл замораживания-размораживания)  $10^6$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат, пунктирная линия: буфер+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, пунктирная линия: буфер+0,5% рЧСА, закрашенный ромб, пунктирная линия: Контроль, буфер. Закрашенный квадрат, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% рЧСА и закрашенный ромб, сплошная линия: контроль, лекарственная форма.

Фиг. 12A: Статическое хранение при 2-8°C при  $10^8$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат, пунктирная линия: буфер+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, пунктирная линия: буфер+0,5% рЧСА, закрашенный ромб, пунктирная линия: Контроль, буфер. Закрашенный квадрат, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% рЧСА и закрашенный ромб, сплошная линия: контроль, лекарственная форма.

Фиг. 12B: Замороженный при -70°C, затем хранящийся при 2-8°C (1 цикл замораживания-размораживания)  $10^8$  БОЕ/мл, время в неделях. Закрашенный квадрат, пунктирная линия: буфер+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, пунктирная линия: буфер+0,5% рЧСА, закрашенный ромб, пунктирная линия: Контроль, буфер. Закрашенный квадрат, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% чгЖелатин, закрашенный круг, сплошная линия: лекарственная форма+0,5% рЧСА и закрашенный ромб, сплошная линия: контроль, лекарственная форма.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

В настоящем изобретении, описанном в настоящем документе, предложена композиция живого вируса, которая может быть использована для стабилизации и сохранения инфекционности во время многочисленных циклов замораживания/размораживания и при длительном хранении при околонулевой и окружающих температурах. Композиция снижает проблемы при производстве, транспортировке, хранении и использовании, обеспечивая гибкость при замораживании-размораживании. Композиция живого вируса согласно изобретению защищает живой вирус от повреждения, которое обычно происходит во время циклов замораживания/размораживания, а в жидком состоянии она обеспечивает стабильность при 2-8°C или при температуре окружающей среды, сохраняя при этом хорошую стабильность во время хранения в замороженном состоянии при температурах - 30°C и ниже.

Частица вируса герпеса представляет собой сложную структуру, состоящую из двухцепочечной геномной ДНК, упакованной в икосаэдрический белковый капсид, который обернут в мембранный бислой, полученный из клетки. Сэндвич между капсидом и липидной оболочкой представляет собой слой вирусных белков, известный как тегумент [1, 2]. Наличие мембранной оболочки является отличительной чертой многих различных типов животных вирусов. При создании композиций для стабилизации живых вирусов липидная оболочка, по-видимому, обуславливает существенную физическую нестабильность в отношении вирусной частицы, что затрудняет стабилизацию этого класса вирусов, особенно по сравнению с вирусами млекопитающих, не имеющими оболочки, такими как аденовирусы, реовирусы и полиовирусы. Например, при хранении при 2-8°C аденовирус типа 5 оставался стабильным в течение 2 лет, а полиовирусы и реовирусы в течение по меньшей мере 1 года [3-5]. Поксвирус, по-видимому, является единственным животным вирусом, покрытым оболочкой, обладающим сходной степенью стабильности при хранении при одинаковых температурах. Однако поксвирус структурно отличается от других вирусов животных, имеющих оболочку, поскольку он содержит двойную оболочку и другие структурные различия [6, 7]. Действительно, поксвирусы удивительно стабильны, что подтверждается длительным хранением, наблюдаемым в сохраняемых тканях, образцах окружающей среды и лабораторном хранении

высушенных образцов при 2-8°C в течение более 60 лет [8-12].

Из одобренных в США вирусных продуктов с оболочкой [13], все, кроме одного (вакцина поксвируса, ACAM2000) содержат РНГ (частично гидролизованный желатин) (таблица) (хотя, как обсуждалось выше, поксвирусы, как известно, особенно стабильны в различных средах). Как показано в таблице, даже живые вирусные лекарственные формы с использованием РНГ требуют лиофилизации, что указывает на то, что использование РНГ не является достаточным для обеспечения адекватной стабильности при хранении жидкой композиции, например, при 2-8°C. FluMist®, хоть и не лиофилизированный, может храниться при 2-8°C в виде жидкой композиции, хотя в течение относительно короткой продолжительности приблизительно 18 недель. Напротив, композиция согласно настоящему изобретению позволяет получать живые вирусные жидкие лекарственные формы, демонстрирующие стабильность при хранении по меньшей мере 9 месяцев (39 недель) при 2-8°C, что значительно больше предыдущих жидких лекарственных форм живого вируса.

Таблица. Стабильность одобренных в США живых вирусных продуктов

Наименование продукта	Вирус (Семейство)	Форма представления	Условия хранения	Срок хранения
MMR®II (Merck)	Корь (Парамиксовирусы)  Паротит (Парамиксовирусы)  Краснуха (Тогавирусы)	Лиофилизированная	2-8 °C <sup>1</sup>	24 мес. <sup>4</sup>
ProQuad® (Merck)	Корь (Парамиксовирусы)  Паротит (Парамиксовирусы)  Краснуха (Тогавирусы)  Varicella (Герпесвирусы)	Лиофилизированная	2-8 °C <sup>1</sup>	18 мес. <sup>5</sup>
Varivax® (Merck)	Вирус ветряной оспы (Герпесвирус)	Лиофилизированная	2-8 °C <sup>1</sup>	24 мес. <sup>6</sup>
Zostavax® (Merck)	Вирус ветряной оспы (Герпесвирус)	Лиофилизированная	2-8°C <sup>7</sup>	18 мес. <sup>8</sup>
YF-Vax® (Sanofi Pasteur)	Вирус желтой лихорадки (Флавивирус)	Лиофилизированная	2-8 °C <sup>2</sup>	н/д.
FluMist® (MedImmune)	Вирус гриппа (Ортомиксовирус)	Жидкая  (Предварительно заполненный ВН распылитель)	2-8 °C <sup>3</sup>	~18 недель <sup>9</sup>

<sup>1</sup>См. подход к хранению вакцин Merck на сайте Merck

<sup>2</sup>См. онлайн информацию о вакцинах, одобренных FDA (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) (UCM142831)

<sup>3</sup>См. онлайн информацию о вакцинах, одобренных FDA (UCM294307)

<sup>4</sup>См. новозеландскую онлайн таблицу Medsafe

<sup>5</sup>См. новозеландскую онлайн таблицу Medsafe

<sup>6</sup>См. онлайн информацию о вакцинах, одобренных FDA (UCM142812)

<sup>7</sup>См. онлайн информацию о вакцинах, одобренных FDA (UCM285015)

<sup>8</sup>См. онлайн информацию о продуктах EPAR (Европейский отчет по оценке лекарственного препарата)

<sup>9</sup>См. CDC 5 сентября 2014 г. (онлайн) (Еженедельный отчет о заболеваемости и смертности)

Композиция согласно настоящему изобретению также предотвращает инактивацию вируса из-за повреждения от замораживания-размораживания. Способность замораживать и размораживать лекарственный продукт или промежуточный продукт без потери эффективности (или активности) имеет огромную ценность, поскольку она обеспечивает гибкость в разработке технологического процесса, маркиров-

ке, операции по упаковке, распределению цепочки поставок конечного продукта и обращение поставщиком медицинских услуг. Например, лекарственная форма живого вируса, которая защищает от повреждения путем замораживания-размораживания, может быть повторно заморожена, если она случайно замораживается или не используется, тем самым уменьшая количество потери препарата. Однако биологические вещества обычно испытывают некоторый ущерб из-за операции замораживания-размораживания и, как правило, ограничиваются одним циклом замораживания-размораживания, чтобы минимизировать потерю энергии [14, 15]. Среди живых вирусных продуктов, перечисленных в табл. 1, ни один из лиофилизированных продуктов не может быть повторно заморожен после разведения. Кроме того, FluMist® не может быть заморожен для последующего размораживания и использования. Как показано на фиг. 10E и 10F, композиции согласно настоящему изобретению сохраняют активность через 10 циклов замораживания-размораживания, тогда как контроль потерял  $>2 \log$  и  $>1 \log$  титра соответственно. Это преимущество реализуется в относительно широком диапазоне концентраций РНГ, как показано на фиг. 9А и 9В.

Кроме того, добавление РНГ к описанным в настоящем документе композициям предотвращает образование видимых и невидимых частиц. Внешний вид продукта является важным атрибутом продукта; продукт, который не соответствует указанным критериям внешнего вида, может стать причиной отказа или отзыва соответствующей вирусной партии. Образование частиц как во время производства, так и в более позднее время (например, во время хранения), представляет собой серьезную проблему для всех биологических препаратов. Добавление РНГ в композиции значительно уменьшало количество частиц, присутствующих в конечном продукте, либо после производства (фиг. 11А и 12А), либо после замораживания-размораживания (фиг. 11В и 12В). Отмечается, что в отсутствие РНГ композиции проявляют высокие уровни твердых частиц. Это, по-видимому, первое упоминание о РНГ, предупреждающем образование частиц в такой значительной степени.

Соответственно в настоящем изобретении предложена композиция живого вируса, содержащая вирус простого герпеса, белок, по меньшей мере один сахар, хлорид натрия и фосфат натрия при рН 7,4, причем композиция является замороженной. В настоящем изобретении также предложена композиция живого вируса, содержащая вирус простого герпеса, белок, по меньшей мере один сахар, хлорид натрия и фосфат натрия при рН 7,4, причем композиция является замороженной. В одном варианте реализации изобретения композицию живого вируса размораживают и хранят при от 2°C до по меньшей мере 25°C. В другом варианте реализации изобретения композицию живого вируса размораживают и хранят при температуре от 2 до 25°C. В другом варианте реализации изобретения композицию вируса размораживают и хранят при температуре от 2 до 8°C. В другом варианте реализации изобретения после размораживания композицию живого вируса повторно замораживают. В еще одном варианте реализации изобретения после размораживания композицию живого вируса повторно замораживают и хранят при температуре -30°C или менее.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вируса размораживают, хранят и повторно замораживают (т.е. подвергают циклу освобождения/размораживания) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вируса размораживают, хранят и повторно замораживают (т.е. подвергают циклу освобождения/размораживания) по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 раз.

В другом варианте реализации изобретения белок представляет собой частично гидролизованный желатин (РНГ) или сывороточный альбумин человека. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация РНГ составляет от 0,01% до 1 мас./об.%. В одном варианте реализации изобретения частично гидролизованный желатин является свиным. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация РНГ составляет 0,01-4%, 0,1-4%, 0,1-3,5%, 0,1-3%, 0,1-2,5%, 0,1-2%, 0,1-1,5%, 0,01-1%, 0,1-1%, 0,2-1%, 0,3-1%, 0,4-1%, 0,3-0,9%, 0,3-0,8%, 0,3-0,7%, 0,3-0,6% или 0,4-0,6% мас./об. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация РНГ составляет от около 0,01 до около 4%, от около 0,1 до около 4%, от около 0,1 до около 3,5%, от около 0,1 до около 3%, от около 0,1 до около 2,5%, от около 0,1 до около 2%, от около 0,1 до около 1,5%, от около 0,01 до около 1%, от около 0,1 до около 1%, от около 0,2 до около 1%, от около 0,3 до около 1%, от около 0,4 до около 1%, от около 0,3 до около 0,9%, от около 0,3 до около 0,8%, от около 0,3 до около 0,7%, от около 0,3 до около 0,6% или от около 0,4 до около 0,6% мас./об. В других вариантах реализации изобретения концентрация РНГ составляет около 0,1%, около 0,2%, около 0,3%, около 0,4%, около 0,5%, около 0,6%, около 0,7%, около 0,8%, около 0,9%, около 1%, около 1,5%, около 2%, около 2,5%, около 3%, около 3,5% или около 4% мас./об. В других вариантах реализации изобретения концентрация РНГ составляет 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5 или 4% мас./об. В конкретном варианте реализации изобретения концентрация РНГ составляет около 0,5% мас./об. В еще одном варианте реализации изобретения концентрация РНГ составляет 0,5% мас./об. В другом конкретном варианте реализации изобретения концентрация свиного РНГ составляет около 0,5% мас./об. В еще одном варианте реализации изобретения концентрация свиного РНГ составляет 0,5% мас./об. В вариантах реализации изобретения, где белок представляет собой сывороточный альбумин человека, концентрация альбумина в сыворотке человека составляет



мМ, около 102 мМ, около 103 мМ, около 104 мМ, около 105 мМ, около 106 мМ, около 107 мМ, около 108 мМ, около 109 мМ или около 110 мМ.

В конкретном варианте реализации изобретение относится к композиции, содержащей вирус простого герпеса, частично гидролизованый желатин, сорбит, хлорид натрия и фосфат натрия при рН 7-8 или рН 7,4. В другом варианте реализации изобретения композиция содержит вирус простого герпеса 1, частично гидролизованый свиной желатин, сорбит, хлорид натрия и фосфат натрия при рН 7-8 или рН 7,4. В другом варианте реализации изобретения композиция содержит вирус простого герпеса 1, частично гидролизованый свиной желатин в концентрации около 0,5% мас./об., сорбит в концентрации около 2% мас./об., хлорид натрия в концентрации около 145 мМ и фосфат натрия в концентрации около 100 мМ при рН 7-8. В другом варианте реализации изобретения композиция содержит вирус простого герпеса 1, частично гидролизованый свиной желатин в концентрации около 0,5% мас./об., сорбит в концентрации около 2% мас./об., хлорид натрия в концентрации около 145 мМ и фосфат натрия в концентрации около 100 мМ при рН около 7,4. В другом варианте реализации изобретения композиция содержит вирус простого герпеса 1, частично гидролизованый свиной желатин в концентрации около 0,5% мас./об., сорбит в концентрации около 2% мас./об., хлорид натрия в концентрации около 145 мМ и фосфат натрия в концентрации около 102 мМ при рН около 7,4. В другом варианте реализации изобретения композиция содержит вирус простого герпеса 1, частично гидролизованый свиной желатин в концентрации около 0,5% мас./об., сорбит в концентрации 2% мас./об., хлорид натрия в концентрации 145 мМ и фосфат натрия в концентрации 100 мМ при рН 7,4. В другом варианте реализации изобретения композиция содержит вирус простого герпеса 1, частично гидролизованый свиной желатин в концентрации 0,5% мас./об., сорбит в концентрации 2% мас./об., хлорид натрия в концентрации 145 мМ и фосфат натрия в концентрации 102 мМ при рН 7,4. В вышеприведенных вариантах реализации изобретения вирус простого герпеса 1 может представлять собой талимоген лаггерпарепвек.

Используемый в настоящем документе термин "около" относится к изменению 5% от указанных значений, или в случае диапазона значений означает 5%-ное отклонение от нижнего и верхнего пределов таких диапазонов.

В одном варианте реализации изобретения инфекционность живой вирусной композиции увеличивается по сравнению с той же живой вирусной композицией, в которой отсутствует белок. Инфективность вируса (титр) может быть измерена методами, известными специалисту в данной области, включая анализы бляшек, такие как описанные в настоящем документе.

Вирусы согласно настоящему изобретению могут быть получены из штамма вируса простого герпеса 1 (ВПГ1) или штамма простого герпеса 2 (ВПГ2) или их производного, предпочтительно ВПГ1. Производные включают межтипичные рекомбинанты, содержащие ДНК штаммов ВПГ1 и ВПГ2. Такие межтипичные рекомбинанты описаны в данной области техники, например, в Thompson et al. (1998) *Virus Genes* 1(3); 275-286 и Meignier et al. (1998) *J. Infect. Dis.* 159; 602-614.

Штаммы вируса простого герпеса могут быть получены из клинических изолятов. Такие штаммы изолированы от инфицированных лиц, таких как те, которые имеют рецидивирующий простой герпес. Клинические изоляты могут быть скринированы на желаемую способность или характеристику, такую как усиленная репликация в опухолях и/или других клетках *in vitro* и/или *in vivo* по сравнению со стандартными лабораторными штаммами, как описано в патенте США № 7063835 и в патенте США № 7223593, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте. В одном варианте реализации изобретения вирус простого герпеса представляет собой клинический изолят рецидивирующего лабиального герпеса.

Штаммы вируса простого герпеса 1 включают, но не ограничиваются ими, штамм JS1, штамм 17+, штамм F и штамм KOS, штамм Patton.

Вирусы простого герпеса могут быть модифицированы, например, по сравнению с их штаммом-предшественником, так что модифицированный вирус не имеет одного или более функциональных вирусных генов. Используемый в настоящем документе термин "отсутствие функционального" вирусного гена означает, что ген(ы) частично или полностью удаляется, заменяется, перегруппировывается или иным образом изменяется в геноме простого герпеса, так что функциональный вирусный белок больше не может быть экспрессирован из данного гена вирусом простого герпеса.

Примеры генов, которые могут быть модифицированы, включают гены вирулентности, кодирующие белки, такие как ICP34.5 ( $\gamma$ 34.5). ICP34.5 действует как фактор вирулентности при инфекции ВПГ, ограничивает репликацию в неделящихся клетках и делает вирус непатогенным. Другим вирусным геном, который может быть модифицирован, является ген, кодирующий ICP47, который снижает регуляцию основного комплексного класса гистосовместимости класса I на поверхности инфицированных клеток-хозяев и связывание с транспортером, связанным с представлением антигена (ТАР), блокирует перенос антигенного пептида в эндоплазматическом ретикулуме и загрузку молекул ГКГ класса I. Другим является ICP6, большая субъединица рибонуклеотидредуктазы, участвующая в метаболизме нуклеотидов

и синтезе вирусной ДНК в неделящихся клетках, но не в делящихся клетках. Могут быть также модифицированы тимидинкиназа, ответственная за фосфорилирование ацикловира до ацикловирмонофосфата, белок транситатор вириона vmw65, гликопротеин H, vhs, ICP43 и непосредственные ранние гены, кодирующие ICP4, ICP27, ICP22 и/или ICPO.

Модификации также могут быть внесены для изменения сроков экспрессии генов вируса простого герпеса. Например, Us11 можно экспрессировать как ранний ген, поместив ген Us11 в промотор Us12, Mulvey et al. (1999) *J Virology*, 73:4, 3375-3385, US Patent Number US 5824318, Mohr & Gluzman (1996) *EMBO* 15: 4759-4766.

Примеры модифицированных вирусов простого герпеса включают, но не ограничиваются ими, штамм 17+ Seprehvir™ (ВПГ1716) вируса простого герпеса типа 1, имеющий делецию 759 пары оснований, расположенную в каждой копии фрагмента BamHI (от 0 до 0-02 и от 0-81 до 0,83 единиц карты) участка длинных повторов генома ВПГ, удаляя одну полную копию DR~ элемента 18 п.о. последовательности "а" и заканчивая 1105 п.о. выше 5'-конца непосредственного раннего (1E) гена 1, см. MacLean et al., (1991) *Journal of General Virology* 79: 631-639).

G207 - онколитический ВПГ-1, полученный из штамма F ВПГ-1 дикого типа, имеющего делеции в обеих копиях основного детерминанта нейровирулентности ВПГ, гена ICP 34,5 и инактивационную инсерцию гена lacZ E.coli в UL39, который кодирует белок инфицированной клетки 6 (ICP6), см. Mineta et al. (1995) *Nat Med.* 1:938-943.

OrienX010 - вирус простого герпеса с удалением обеих копий  $\gamma$ 34.5 и генов ICP47, а также прерыванием гена ICP6 и введением гена GM-CSF человека, см. Liu et al. (2013) *World Journal of Gastroenterology* 19 (31):5138-5143.

NV1020 - вирус простого герпеса с удаленным шарнирным участком длинного (L) и короткого (S) участков, включая одну копию ICP34.5, UL24 и UL56.34,35. Удаленный участок был заменен фрагментом ДНК ВПГ-2 US (US2, US3 (PK), gJ и gG), см. Todo et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:6396-6401.

M032 - вирус простого герпеса с делецией обеих копий генов ICP34.5 и инсерцией интерлейкина 12, см. Cassady and Ness Parker, (2010) *The Open Virology Journal* 4: 103-108.

Талимоген лагерапрепек - полученный из клинического штамма ВПГ-1 штамма JS1, помещенного на хранение в европейской коллекции клеточных культур (ЕСААС) под номером доступа 01010209. В талимоген лагерапрепек вирусные гены ВПГ-1, кодирующие ICP34.5 и ICP47, были функционально удалены.

Функциональное удаление ICP47 приводит к более ранней экспрессии US11, гена, который способствует росту вируса в опухолевых клетках без снижения избирательности опухоли. Кодирующая последовательность для GM-CSF человека была вставлена в вирусный геном, см. Liu et al., *Gene Ther* 10: 292-303, 2003.

ImmunoVEX ВПГ2 представляет собой вирус простого герпеса (ВПГ-2), имеющий функциональные делеции генов, кодирующих vhs, ICP47, ICP34.5, UL43 и US5.

OncoVEX<sup>GALV/CD</sup>, также получен из штамма JS1 ВПГ-1 с генами, кодирующими ICP34.5 и ICP47, которые были функционально удалены, а ген, кодирующий цитозиндезаминазу и фузогенный гликопротеин лейкомы гиббоновой обезьяны, введены в вирусный геном вместо генов ICP34.5.

Дополнительные примеры модифицированных вирусов простого герпеса включают NSC-733972, HF-10, BV-2711, JX-594, Myb34.5, AE-618, Brainwel™ и Hearwel™.

Штаммы вируса герпеса и способы получения таких штаммов также описаны в патентах США № US 5824318; US 6764675; US 6770274; US 7063835; US 7223593; US 7749745; US 7744899; US 8273568; US 8420071; US 8470577; публикациях ВОИС №: WO 199600007; WO 199639841; WO 199907394; WO 200054795; WO 2006002394; WO 201306795; патентах Китая №: CN 128303, CN 10230334 и CN 10230335; Varghese and Rabkin, (2002) *Cancer Gene Therapy* 9:967-97 и Cassady and Ness Parker, (2010) *The Open Virology Journal* 4:103-108.

Вирусы простого герпеса согласно изобретению могут также содержать один или более гетерологичных генов. Гетерологичный ген относится к гену, который должен быть введен в геном вируса, где этот ген обычно не содержится в геноме вируса или является гомологом гена, экспрессируемого в вирусе от другого вида, который имеет отличную последовательность нуклеиновой кислоты, и действует с помощью другого биохимического механизма. Гетерологичные гены могут кодировать один или более белков, например цитотоксин, иммуномодулирующий белок (то есть белок, который либо усиливает, либо подавляет иммунный ответ хозяина на антиген), опухолевый антиген, активатор пролекарства, опухолевый супрессор, фермент, преобразующий пролекарство, белки, способные вызывать слияние клетки с клеткой, антисмысловую молекулу РНК ингибитора ГАР или рибозим. Примеры иммуномодулирующих белков включают, например, цитокины. Цитокины включают интерлейкины, такие как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-16, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-20;  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$ -интерфероны, фактор некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ), CD40L, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), хемокины (такие как

нейтрофильный активирующий белок (NAP), хемоаттрактант макрофагов и активирующий фактор (MCAF), RANTES (хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации) и макрофаговые воспалительные пептиды MIP-1a и MIP-1b), компоненты комплемента и их рецепторы, вспомогательные молекулы иммунной системы (например, B7.1 и B7.2), молекулы адгезии (например, ICAM-1, 2 и 3) и молекулы рецептора адгезии. Опухолевые антигены включают антигены Е6 и Е7 вируса папилломы человека, EBV (вирус Эпштейн-Барр)-продуцируемые белки, муцины, такие как MUC1, меланоматирозиназа и MZ2-E. Активаторы пролекарств включают нитроредуктазу и цитохром р450, опухолевые супрессоры, включая р53. Ферменты, преобразующие пролекарства, включая цитозиндезаминазу. Белки, способные вызвать слияние клетки с клеткой, включают фузогенный гликопротеин лейкемии гиббоновой обезьяны. Ингибиторы TAP включают полипептид бычьего герпесвируса (BHV) UL49.5. Молекулы антисмысловой РНК, которые могут быть использованы для блокирования экспрессии клеточной или патогенной мРНК. Молекулы РНК, которые могут представлять собой рибозим (например, "головка молотка" или рибозим на основе шпильки), предназначены либо для восстановления дефектной клеточной РНК, либо для уничтожения нежелательной клеточной или патогенно-кодированной РНК.

Также включено введение нескольких вирусных генов в геном простого герпеса, такое как вставка одной или более копий гена, кодирующего вирусный белок Us11.

Композиции живого вируса, согласно настоящему изобретению, могут быть использованы в способе лечения человека или животных. В частности, композиции живого вируса согласно настоящему изобретению могут быть использованы в способах лечения рака.

Композиции живого вируса, согласно настоящему изобретению могут быть использованы для лечения различных опухолей и рака. В настоящем изобретении также предложен способ лечения опухоли у пациента, нуждающегося в этом, путем введения указанному индивидууму эффективного количества композиции живого вируса. Используемые в настоящем документе термины "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо и означают млекопитающее, включая, но не ограничиваясь ими, млекопитающее, относящееся к человеку или не являющееся человеком, такое как бык, конь, пес, овца или кот. Предпочтительно, пациент представляет собой человека.

Композиции живого вируса согласно настоящему изобретению могут быть использованы при терапевтическом лечении любой солидной опухоли у пациента. Например, композиции живого вируса согласно настоящему изобретению могут вводиться пациенту, страдающему карциномой предстательной железы, молочной железы, легкого, печени, почки, эндометрием, мочевого пузыря, прямой кишки или шейки матки; аденокарциномой; меланомой; лимфомой; глиомой; саркомами, такими как саркомы мягких и костных тканей; или раком головы и шеи и, предпочтительно, раком мочевого пузыря.

Композиции живого вируса согласно настоящему изобретению могут использоваться для лечения рака у пациента, включая все виды рака, новообразования или злокачественные опухоли, включая лейкоз, карциному и саркому. Типичные виды рака включают рак молочной железы, мозга, шейки матки, толстой кишки, головы и шеи, печени, почки, легкого, яичника, желудка, матки, немелкоклеточный рак легкого, меланому, мезотелиому, саркому и медуллобластому. Кроме того, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластому, рак яичника, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, первичные опухоли головного мозга, злокачественную инсулиному поджелудочной железы, карциноидный синдром, рак мочевого пузыря, предраковые поражения кожи, рак яичек, лимфому, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочевого тракта, злокачественную гиперкальциемию, рак эндометрия, рак коры надпочечников, новообразования эндокринной и экзокринной частей поджелудочной железы и рак простаты.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции живого вируса согласно изобретению, предложенные в настоящем документе, пригодны для уничтожения опухолевых клеток, выбранных из группы, состоящей из клеток астроцитомы, олигодендроглиомы, менингиомы, нейрофибромы, глиобластомы, эпендимомы, шванномы, нейрофибросаркомы, медуллобластомы, меланомы, клеток рака поджелудочной железы, клеток карциномы предстательной железы, клеток рака молочной железы, клеток рака легкого, клеток рака толстой кишки, клеток гепатомы, клеток мезотелиомы и эпидермоидной карциномы.

Композиции живого вируса согласно настоящему изобретению могут также использоваться в сочетании с другими способами лечения, включая без ограничения лучевую терапию, химиотерапию, термотерапию, терапевтические белки и хирургию. Композиции живого вируса можно вводить до, одновременно или после других способов лечения.

Терапевтические белки включают ингибиторы иммунных контрольных точек. Используемый в настоящем документе термин "ингибитор иммунных контрольных точек" относится к молекулам, которые полностью или частично снижают, ингибируют, создают препятствие или модулируют один или более контрольных белков.

Белки контрольных точек регулируют активацию или функцию Т-клеток. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86; и PD1 с его лигандами PDL1 и PDL2. Эти белки ответственны за ко-стимулирующие или ингибирующие взаимодействия Т-клеточных реакций. Белки иммунных контрольных точек регулируют и поддерживают аутоотолерант-

ность, а также продолжительность и амплитуду физиологических иммунных реакций. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или производные антител.

Ингибиторы контрольных точек включают цитотоксические ингибиторы антигена 4 (CTLA-4), связанные с Т-лимфоцитами. Ингибиторы CTLA-4 включают тремилимумаб, ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-D010) и продаваемый под названием Yervoy™ и антитела против CTLA-4, описанные в патентах США №: 5811097; 5811097; 5855887; 6051227; 6207157; 6682736; 6984720 и 7605238.

Другие белки иммунных контрольных точек включают белок запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) и лиганды запрограммированной клеточной смерти 1 и 2 (PDL1), (PDL2). Примеры молекул, которые ингибируют PD1 и PDL1 и PDL2, включают ниволумаб (MDX 1106, BMS 936558, ONO 4538), полностью человеческое IgG4-антитело, которое связывает и блокирует активацию PD-1 его лигандами PD-L1 и PD-L2; пембролизумаб (ламбролизумаб, МК-3475 или SCH 900475), продаваемый как Keytruda™; MPDL3280A, сконструированное антитело против PDL1 (атезолизумаб); CT-011; AMP-224; BMS-936559 (MDX-1105-01 и описанные в патентах США № 7488802; 7943743; 8008449; 8168757; 8217149 и опубликованных патентных заявках PCT №№ WO 03042402, WO 2008156712, WO 2010089411, WO 2010036959, WO 2011066342, WO 2011159877, WO 2011082400 и WO 2011161699.

Другие ингибиторы иммунных контрольных точек включают ингибиторы гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3), такие как IMP321, растворимый слитый белок Ig; ингибиторы B7, такие как антитело против B7-H3 MGA271. Также включены ингибиторы TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулин и меццидомен 3).

Врачи могут вводить композиции живого вируса до тех пор, пока не будет достигнута доза, которая окажет желаемый эффект. Таким образом, композицию можно вводить в виде разовой дозы или в виде двух или более доз (которые могут или не могут содержать такое же количество желаемой молекулы) с течением времени путем прямой инъекции или другого подходящего способа введения. Композиции живой вакцины согласно настоящему изобретению можно вводить, например, один или более раз, например, через определенные промежутки времени в течение определенного периода времени. В общем, композиции живого вируса согласно настоящему изобретению могут вводиться до тех пор, пока пациент не проявит медико-значимую степень улучшения по сравнению с исходным уровнем для выбранного индикатора или показателей.

В одном варианте реализации изобретения композиция живой вакцины содержит талимоген лагерпарепвек. Композицию вводят путем внутриопухолевой инъекции в инъецируемые кожные, подкожные и узловые опухоли в дозе до 4,0 мл  $10^6$  бляшкообразующих единиц/мл (БОЕ/мл) в 1-е сутки 1-й недели с последующей дозой до 4,0 мл  $10^8$  БОЕ/мл в 1-е сутки 4-й недели и каждые 2 недели ( $\pm 3$  суток) после этого. Рекомендуемый объем талимоген лагерпарепвека, который должен быть введен в опухоль(и), зависит от размера опухоли (опухолей). Все необходимые инъецируемые поражения (кожное, подкожное и узловое заболевание, которые могут быть инъецированы с ультразвуковым управлением или без него) должны быть инъецированы с максимальным объемом дозирования, доступным при индивидуальной дозировке. В каждые сутки лечения приоритет инъекций рекомендуется следующим образом: любая новая инъецируемая опухоль, появившаяся с момента последней инъекции; по размеру опухоли, начиная с наибольшей опухоли; любая ранее неинъецируемая опухоль (опухоль), которая теперь инъецируема.

Если в данном документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют значения, которые традиционно подразумеваются специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают формы в множественном числе и термины в множественном числе включают формы в единственном числе. Как правило, номенклатура, используемая в связи с, и методы культуры клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, и химии белка и нуклеиновых кислот, и гибридизации, описанные в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Способы и методы настоящего изобретения, как правило, выполняются в соответствии с общепринятыми способами хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем документе, если не указано иное. Все патенты и научная литература, приведенные в настоящем документе, явным образом полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

### Примеры

#### Пример 1.

Для использования с онколитическими вирусами была разработана лекарственная форма, содержащая свиной частично гидролизанный желатин (чгЖелатин). Данная лекарственная форма защищает онколитические вирусы от потери инфекционности при длительном хранении в замороженных условиях, многократных циклах замораживания/размораживания и хранении в жидком состоянии при 2-8°C и 25°C. Кроме того, лекарственная форма уменьшала образование как видимых, так и невидимых частиц по сравнению с лекарственной формой, не содержащей чгЖелатин. Данная лекарственная форма обеспечивает преимущества перед лекарственной формой без чгЖелатина во время изготовления, упаковки и маркировки и значительно повышает удобство и гибкость для поставщика медицинских услуг.

### Приготовление образца

В этом примере использовали онколитический вирус простого герпеса (ВПГ-1) талимоген лагерпарепек (Lui et al., (2003) Gene Therapy, 10: 292-303) при концентрациях  $10^6$  БОЕ/мл и  $10^8$  БОЕ/мл. Для концентрации вируса при  $10^8$  БОЕ/мл образцы готовили путем добавления концентрированных исходных растворов вспомогательного вещества (то есть 10-20% мас./об. чгЖелатина или рекомбинантного ЧСА) в объеме, который обеспечивал желаемые конечные концентрации вспомогательного вещества. Для концентраций онколитических ВПГ-1 при  $10^6$  БОЕ/мл образцы готовили простым разбавлением материала  $10^8$  БОЕ/мл в необходимом буфере. Для концентраций онколитических ВПГ-1 при  $10^8$  БОЕ/мл образцы готовили путем добавления концентрированных исходных растворов вспомогательного вещества и буфера к концентрированному онколитическому раствору ВПГ-1. Образцы хранились в готовых к употреблению 2 мл полимерных прозрачных флаконах "zenith" (West Pharmaceuticals Inc. Exton. PA) с пробкой из эластомера хлорбутила, покрытой FluoroTec® (West) запечатанной при помощи пломб Flip-off® TruEdge® (West).

### Анализ бляшек

Количество инфекционного онколитического ВПГ-1 определяли количественно путем титрования тестовых образцов на восприимчивые индикаторные клетки, наблюдая цитопатический эффект (CPE) и подсчитывая последующие бляшкообразующие единицы (БОЕ) (предел обнаружения  $>2,08 \log_{10}$  БОЕ/мл).

Вкратце, клетки ВНК (почки новорожденного хомяка, ATCC, Манасас, штат Виргиния) были размножены в DMEM (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния) с добавлением L-глутамина (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния), 10% фетальной бычьей сыворотки (Thermo-Fisher, Волтем, штат Массачусетс) и антибиотиков стрептомицина и пенициллина (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния). Клетки ВНК высевали в 12-луночные планшеты за одни сутки до тестирования. Тестовые образцы последовательно разбавляли и использовали для заражения монослоя. После начального периода инкубации, чтобы обеспечить адсорбцию вируса, клетки покрывали покровной средой, содержащей карбоксиметилцеллюлозу (СМС) и культуральную среду, и инкубировали в течение 72 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Затем клетки фиксировали с использованием 0,01% раствора глutarальдегида (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури) после аспирации инокулята и промывки PBS. Затем клетки окрашивали, используя 2% раствор кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) для визуализации бляшек. Для определения титра вируса подсчитывали бляшки, сформированные для каждого разведения тестового образца, и определяли окончательный титр ( $\log_{10}$  БОЕ/мл) от среднего количества проверенных дубликатов.

### Анализ невидимых частиц

Невидимые частицы наблюдались при помощи двух способов: светоблокировки (НИАС) и визуализации микропотока (MFI).

#### НИАС

Невидимые частицы наблюдались при помощи светоблокировки с использованием счетчика частиц Русо НИАС (Beckman Coulter, Бри, штат Калифорния). Перед тестированием образцов был проанализирован стандартный количественный контроль частиц размером 15 мкм (Duke Scientific, Thermo Fisher Scientific, Волтем, штат Массачусетс). Подсчеты невидимых частиц проводили с использованием четырех инъекций объемом 0,2 мл. Последние три показания были усреднены и сообщались как совокупные подсчеты на мл.

#### MFI

Анализ невидимых частиц проводили на приборе визуализации микропотока (MFI) (4200 Protein Simple, Санта-Клара, штат Калифорния), оснащенном проточной ячейкой со 100 мкм силанным покрытием. Перед каждым измерением через систему пропусклась вода для оптимизации освещения и обеспечения чистого исходного уровня. Для каждого образца в ячейку прокачивали всего 1 мл при скорости потока равной 0,2 мл/мин. Первые 0,35 мл использовали для промывки проточной ячейки, а остальные 0,65 мл были проанализированы. Сообщалось об общем количестве частиц  $> 2$  мкм.

#### Стабильность при замораживании-размораживании

Множество факторов было проверено путем тестирования на вирусную инфекционность после 1 и 5 циклов замораживания/размораживания.

#### Буферы и соли

Известно, что фосфат натрия кристаллизуется в замороженном состоянии, что приводит к значительным понижениям pH в замороженном состоянии. С другой стороны, фосфат калия не кристаллизуется.

Лекарственная форма: 2% мас./об. сорбита, 4% мас./об. миоинозитол, 145 мМ NaCl и 100 мМ фосфат натрия, pH 7,4, служила в качестве контроля. Контрольная лекарственная форма была модифицирована таким образом, что концентрация фосфата натрия была снижена со 100 мМ до 10 мМ или была заменена 10 или 100 мМ фосфата калия. Были также испытаны лекарственные формы, в которых концентрация NaCl была снижена до 73 мМ или полностью исключена, см. табл. 1.

Таблица 1

Контроль	NaPhos 10 мМ	KPhos 10 или 100 мМ	NaCl 73 мМ	NaCl 0 мМ
2% сорбит	2% сорбит	2% сорбит	2% сорбит	2% сорбит
4% мио- инозитол	4% мио- инозитол	4% мио- инозитол	4% мио- инозитол	4% мио- инозитол
142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	73 мМ	0 мМ
100 мМ фосфата Na рН 7,4	10 мМ фосфата Na рН 7,4	10 или 100 мМ фосфата К рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4

Образцы готовили при  $10^6$  БОЕ/мл. Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек, как описано ранее. Образцы подвергали замораживанию при  $-70^\circ\text{C}$  в течение по меньшей мере 1 суток, а затем размораживали до комнатной температуры не более 2 ч. Размороженные образцы снова замораживали при  $-70^\circ\text{C}$  в течение по меньшей мере 1 суток, а затем размораживали до комнатной температуры не более 2 ч для каждого последующего цикла замораживания/размораживания (всего 1 или 5 циклов).

При уменьшении количества фосфата натрия или при замене на фосфат калия потери в инфекционной активности все еще наблюдались после циклов замораживания/размораживания, ни один из которых не считался имеющим какое-либо преимущество перед контролем. Аналогичным образом, уменьшение концентрации NaCl не влияло на стабильность вируса во время циклов замораживания/размораживания по сравнению с контролем (фиг. 1).

### Сахара

Сахара обычно используются в качестве криопротекторных вспомогательных веществ, поэтому различные сахара в диапазоне концентраций испытывали в отношении их влияние на стабильность онколитического ВПГ-1 во время циклов замораживания/размораживания.

Контрольную лекарственную форму модифицировали таким образом, что мио-инозитол удаляли, а сорбит увеличивали до 9% или 15 мас./об.%. Во второй группе образцов контрольная лекарственная форма была модифицирована таким образом, что как миоинозитол, так и сорбит были удалены и заменены 9 или 15% трегалозы (мас./об.), или 9 или 15% сахарозы (мас./об.), см. табл. 2.

Таблица 2

Контроль	9% сорбит	15% сорбит	9% трегалоза	15% трегалоза	15% сахароза
2% сорбит	9% сорбит	15% сорбит			
4% мио- инозитол	0	0	9% трегалоза	15% трегалоза	15% сахароза
142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl
100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4

Образцы готовили при  $10^6$  БОЕ/мл. Образцы подвергали либо 1, либо 5 циклам замораживания-размораживания, как описано ранее. Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек.

Лекарственные формы с 9 и 15% сорбита продемонстрировали значительное увеличение стабильности онколитического ВПГ-1 без изменения инфекционности после 5 циклов замораживания/размораживания. Аналогичным образом, лекарственные формы с 15% сахарозы и 9 и 15% трегалозы обеспечивали защиту от воздействий замораживания/размораживания. Лекарственная форма с 9% сахарозы не обеспечивала защиту от воздействий замораживания/замораживания. (фиг. 2А и 2В).

### Сахара и белок

Комбинации высокого содержания сахара и стабилизирующих белков затем тестировали на их влияние на стабильность онколитического ВПГ-1 во время замораживания/размораживания. Контрольную лекарственную форму модифицировали таким образом, что миоинозитол и сорбит удаляли и заменяли 9 мас./об.%. сахарозы и 2 мас./об.%. mAb (моноклонального антитела) против стрептавицина (собственного

производства) или 2% частично гидролизованного желатина (чгЖелатина) (мас./об.) (Gelita, Сержант Блафф, штат Айова). Во второй серии экспериментов контрольная лекарственная форма создавалась с добавлением либо 4% чгЖелатина (мас./об.), либо 4% рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина (рЧСА) (Novozymes, Франклинтон, штат Северная Каролина) (мас./об.), см. табл. 3.

Образцы готовили при  $10^6$  БОЕ/мл. Образцы подвергали либо 1, либо 5 циклам замораживания-размораживания.

Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек.

Таблица 3

Контроль	Сахароза mAb против стрептавиди на	Сахароза чгЖелатин	4% рЧСА	4% чгЖелатин
2% сорбит (мас./об.)	9% сахароза	9% сахароза	2% сорбит	2% сорбит
4% мио- инозитол (мас./об.)			4% мио-инозитол	4% мио-инозитол
142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl
100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4
Белок	2% mAb против стрептавиди на	2% чгЖелатин	4% рЧСА	4% чгЖелатин

Добавление стабилизирующих белков рЧСА, чгЖелатина или mAb против стрептавидина, защищало от воздействия замораживания/размораживания, без потери инфекционности после 5 циклов замораживания/размораживания. чгЖелатин был одинаково эффективен для защиты от воздействий замораживания/размораживания в присутствии 9% мас./об. сахарозы или контрольной комбинации 2% мас./об. сорбита и 4% мас./об. миоинозитола (См. фиг. 3).

Стабильность при замораживании/размораживании улучшалась либо за счет увеличения содержания сахара, либо путем добавления стабилизирующего белка. Онколитический ВПГ-1 выдерживал 5 циклов замораживания/размораживания без потери инфекционности во всех тестируемых препаратах, демонстрируя, что три очень разных белка могут обеспечить защиту от воздействия замораживания/размораживания. Из трех белков рЧСА и чгЖелатин обеспечивали лучшую стабильность, и поскольку они были одобрены для использования в терапевтических препаратах, они были выбраны для дальнейшего изучения.

#### Хранение в жидком состоянии

Те сахара и белки, которые защищали от воздействия замораживания/размораживания, испытывали в отношении их воздействие на стабильность онколитического ВПГ-1 при 2-8°C и 25°C. В одном из экспериментов контрольная лекарственная форма была модифицирована таким образом, что сорбит и миоинозитол были заменены 15% трегалозой, 15% сахарозой или 9% сорбитом и 2% рЧСА. В другой серии экспериментов контрольную лекарственную форму создавали с добавлением 2% рЧСА или 2% чгЖелатина, см. табл. 4.

Таблица 4

Контроль	Трегалоза	Сахароза	Сахароза рЧСА	2% рЧСА	2% чгЖелатин
2% сорбит (мас./об.)	15%	15%	9%	2% сорбит	2% сорбит
4% мио- инозитол (мас./об.)	трегалоза	сахароза	сахароза	4% мио- инозитол	4% мио- инозитол
142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl	142 мМ NaCl
100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4	100 мМ фосфата Na рН 7,4
н/д	н/д	н/д	2% рЧСА	2% рЧСА	2% чгЖелатин

Образцы готовили путем разбавления до  $10^6$  БОЕ/мл в тестовых лекарственных формах, замораживали при  $-70^\circ\text{C}$  в течение по меньшей мере 1 суток и затем хранили при  $2-8^\circ\text{C}$  или при  $25^\circ\text{C}$ . Поскольку онколитический ВПП-1 демонстрирует пониженную стабильность при более высоких температурах, образцы выдерживали при  $2-8^\circ\text{C}$  в течение 14 суток и при  $25^\circ\text{C}$  в течение 3 суток, чтобы обнаружить разницу между лекарственными формами. Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек.

Замена сорбита и миоинозитола на 15% трегалозу не стабилизировала онколитический ВПП-1 во время хранения в жидком состоянии при  $2-8^\circ\text{C}$  или  $25^\circ\text{C}$ . Замена на 15% сахарозу давала противоречивые результаты, причем наблюдалась некоторая стабилизация при  $25^\circ\text{C}$ , но не при  $2-8^\circ\text{C}$ . Напротив, добавление 2% рЧСА или 2% чгЖелатина действительно обеспечивало хорошую стабильность при хранении в жидком состоянии при обеих температурах в присутствии либо 2% сорбита+4% миоинозитола, либо 9% сахарозы, см. фиг. 4А и 4В.

В заключение, добавление стабилизирующего белка (либо чгЖелатина, либо рЧСА) обеспечивало улучшенную стабильность во время замораживания/размораживания и хранения в жидком состоянии. Изменение содержания сахара обеспечивало дополнительную стабильность во время замораживания/размораживания, но имело относительно небольшой эффект при хранении в жидком состоянии. Поэтому дальнейшие усилия были сосредоточены на влиянии различных уровней и типов стабилизирующих белков.

#### Пример 2. Концентрация белка

Комбинация улучшенной стабильности замораживания/размораживания и жидкого состояния обеспечивает существенное преимущество при изготовлении, упаковке и маркировке. Возможность хранения при  $2-8^\circ\text{C}$  обеспечит значительно лучшую гибкость и удобство для поставщиков медицинских услуг.

Контрольную лекарственную форму готовили с добавлением 1, 2 или 4% чгЖелатина или 1, 2 или 4% рЧСА. Образцы готовили при  $10^6$  БОЕ/мл. Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек, как описано ранее. Образцы подвергали 5 циклам замораживания/размораживания, как описано выше.

Концентрацию рЧСА и чгЖелатина изменяли для определения влияния концентрации белка на стабильность онколитического ВПП-1. Как чгЖелатин, так и рЧСА обеспечивали защиту во время циклов замораживания/размораживания во всем тестируемом диапазоне, см. фиг. 5.

Затем испытывали влияние различных концентраций белка на стабильность онколитической ВПП-1 при  $2-8^\circ\text{C}$  и  $25^\circ\text{C}$ . Контрольную лекарственную форму готовили с добавлением 1, 2 или 4% чгЖелатина или 1, 2 или 4% рЧСА. Образцы готовили при  $10^6$  БОЕ/мл и замораживали при  $-70^\circ\text{C}$  в течение по меньшей мере 1 суток (предварительно замораживали), а затем хранили при  $2-8^\circ\text{C}$  и  $25^\circ\text{C}$ . Инфективность (титр) определяли с помощью анализа бляшек.

Лекарственные формы чгЖелатина сохранялись намного лучше во время хранения в жидком состоянии без потери активности через 3 суток при  $25^\circ\text{C}$ . Напротив, все лекарственные формы, содержащие рЧСА, продемонстрировали потери в инфекционности за тот же период. Кроме того, лекарственные формы, содержащие рЧСА, фактически ухудшались при  $25^\circ\text{C}$  по мере увеличения концентрации рЧСА. Небольшое изменение в инфекционности наблюдалось при  $2-8^\circ\text{C}$  в течение этого периода времени (См. фиг. 6А и 6В).

#### Степень чистоты рЧСА

Чтобы определить, почему препараты с возрастающими количествами рЧСА демонстрировали худшую стабильность по сравнению с аналогичными количествами чгЖелатина, рассматривали сам рЧСА. Было высказано предположение, что результат может быть связан с компонентами в рЧСА, такими как загрязняющее вещество или соединение, добавляемое для стабилизации рЧСА. Кроме того, ре-

зультат может быть вызван эффектом самого рЧСА.

Четыре различных класса рЧСА тестировали на их способность стабилизировать онколитический ВПГ-1 во время хранения в жидкой форме при 25°C. Контрольная лекарственная форма создавалась с добавлением 2% Sigma, 1, 2 или 4% Novozyme Alpha, 1, 2 или 4% Novozyme Albix или 1, 2 или 4% Novozyme Prime рЧСА. Кроме того, контрольная лекарственная форма была также приготовлена с добавлением 2% чгЖелатина, см. табл. 5. Лекарственные формы тестировали в отношении стабильности в жидкой форме при 25°C в течение 2 недель, как описано выше.

Таблица 5

Поставщик	Марка	% Чистоты	Октаноат	Полисорбат 80
Sigma- Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури	Марка для исследования A9731	≥ 96%	н/д	н/д
Novozyme, Франклинтон, штат Северная Каролина	Alpha	≥ 99,9%	16 мМ	69 мг/л
Novozyme, Франклинтон, штат Северная Каролина	Albix	≥ 99,9%	0	0
Novozyme, Франклинтон, штат Северная Каролина	Prime	≥ 99,0%	34,1 мМ	10 мг/л

Каждый класс рЧСА имел разные уровни чистоты и другие компоненты, предназначенные для стабилизации рЧСА. Материал Sigma имел высокую чистоту для исследования и самый низкий стабилизирующий эффект. Три класса от Novozymes (Alpha, Abix и Prime) имели значительно более высокую чистоту, но каждый из них имел разные уровни других компонентов. Степени рЧСА Novozyme обеспечивали большую стабильность по сравнению с маркой Sigma, но между рЧСА Novozyme не было никакой разницы. Кроме того, все три рЧСА Novozyme показали худшую стабильность при добавлении в возрастающих концентрациях. Наконец, степень чистоты рЧСА не оказывала влияния, как и чгЖелатин, см. фиг. 7A-7D.

#### Нижний предел белка

Были проведены дальнейшие исследования для определения минимального количества рЧСа и чгЖелатина, необходимого для стабилизации концентраций онколитических ВПГ-1 при  $10^6$  и  $10^8$  БОЕ/мл.

Контрольная лекарственная форма создавалась с добавлением 0,25%, 0,5% и 1% мас./об. чгЖелатина и 0,25%, 0,5% и 1% мас./об. рЧСА (Novozyme Prime). Образцы готовили с концентрациями онколитических ВПГ-1, равными  $10^6$  и  $10^8$  БОЕ/мл. Одну серию образцов подвергали 5 циклам замораживания/размораживания, как описано выше. Две серии образцов тестировали на стабильность жидкости, одну при 2-8°C в течение четырех недель и одну при 25°C в течение 2 недель, как описано выше. Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек.

чгЖелатин обеспечивал защиту по всему испытанному диапазону, 0,25-1% мас./об. в течение циклов замораживания/размораживания и хранения в жидкой форме при 2-8°C и 25°C (фиг. 8A-8F) как при  $10^6$  и  $10^8$  БОЕ/мл. Все составы, содержащие рЧСА, продемонстрировали потери в инфекционной активности при хранении жидкости при 2-8°C и 25°C во всем диапазоне концентраций белка, которые были протестированы, при концентрациях вируса, равной как  $10^6$ , так и  $10^8$  БОЕ/мл, но не были обнаружены потери в инфекционности во время циклов замораживания/размораживания (фиг. 9A-9F).

Было проведено дополнительное исследование, в котором чгЖелатин тестировали на более низких уровнях. Контрольную лекарственную форму создавали с добавлением 0,01-0,5% мас./об. чгЖелатина. Образцы готовили с онколитическими концентрациями ВПГ-1, равными  $10^6$  и  $10^8$  БОЕ/мл и тестировали на стабильность жидкой формы при 2-8°C и 25°C, как описано выше. Инфекционность (титр) определяли с помощью анализа бляшек. чгЖелатин обеспечивал защиту при хранении в жидкой форме во всем диапазоне протестированных концентраций белка (0,01-0,5%), см. фиг. 8G и 8H.

#### Долгосрочная стабильность

Долгосрочное исследование проводилось для определения стабильности лекарственных форм, со-

держащих белок, по сравнению с контрольной лекарственной формой. Онколитический ВПП-1 был создан при  $10^6$  БОЕ/мл и  $10^8$  БОЕ/мл в контрольной лекарственной форме или контрольной лекарственной форме, содержащей 0,5% мас./об. рЧСА или чгЖелатина. Образцы оценивали во время хранения в жидкой форме при 2-8°C и 25°C, как описано выше; хранение в замороженной форме при -30°C и -70°C и в течение 10 циклов замораживания/размораживания, как описано выше. Инфекционность (титр) определяли при помощи анализа бляшек, как описано ранее.

Лекарственные формы, содержащие чгЖелатин, снова обеспечивали превосходную стабильность при всех оцененных условиях хранения. Лекарственные формы, содержащие рЧСА, обеспечивали аналогичную стабильность (в пределах погрешности анализа) только для тех лекарственных форм, которые хранятся в замороженном состоянии при -30°C (фиг. 10А и 10В) и -70°C (фиг. 10С и 10D) и до 10 циклов замораживания/размораживания (фиг. 10Е и 10F). Однако для хранения в жидком состоянии лекарственные формы чгЖелатина показали больший стабилизирующий эффект, что было наиболее очевидно, когда концентрация онколитического ВПП-1  $10^6$  БОЕ/мл хранилась при 2-8°C (фиг. 10G и 10H) и 25°C (фиг. 10I и 10J). После 39 недель хранения при 2-8°C лекарственные формы, содержащие чгЖелатин, продемонстрировали потерю 1,7 log, в то время как лекарственные формы, содержащие рЧСА, продемонстрировали потерю 2,9 log. Контрольная лекарственная форма потеряла всякую активность после 12 недель хранения при 2-8°C. В течение 4 недель хранения при 25°C лекарственные формы, содержащие чгЖелатин, продемонстрировали потерю 2,3 log, в то время как лекарственные формы, содержащие рЧСА, продемонстрировали потерю 3,6 log. Контрольная композиция потеряла всякую активность после 2 недель хранения при 25°C.

#### **Изучение частиц лекарственных форм**

Онколитический ВПП-1 был создан путем добавления 20% мас./об. рЧСА или чгЖелатина (или эквивалентного объема буферного раствора для контроля) до конечной концентрации вируса, равной  $10^8$  БОЕ/мл и 0,5% стабилизирующего белка. Затем эти растворы пропускали через фильтр 0,22 мкм (Sterivex™ EMD Millipore, Бриллерика, штат Массачусетс) с использованием силиконового безмасляного одноразового шприца (NORM-JECT® Luer Slip Centric Ti, Беллефон, штат Пенсильвания) для получения свободного от частиц исходного материала.

Один набор образцов хранился при 2-8°C, как описано выше (статический), а второй набор образцов замораживали при -70°C и затем хранили при 2-8°C (1 цикл замораживания/размораживания).

Частицы измеряли при помощи субвидимого анализа или визуального наблюдения.

Лекарственные формы, содержащие либо 0,5% мас./об. рЧСА, либо чгЖелатин, продемонстрировали сниженное образование частиц по сравнению с контрольной лекарственной формой, как было измерено способами субвидимого анализа (фиг. 11А-11В и 12А-12В). Кроме того, онколитический ВПП-1 при концентрации  $10^8$  БОЕ/мл образовывал видимые частицы в контрольной лекарственной форме, но не в лекарственных формах, которые содержали 0,5% чгЖелатина или рЧСА.

**Литературные источники**

1. Roizman B (1982) The Family Herpesviridae: General Description, taxonomy and classification. The Viruses, Vol A, Herpesviruses. New York: Plenum Press.
2. Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. Journal of virology 76: 1537-1547.
3. Sokhey J, Gupta CK, Sharma B, Singh H (1988) Stability of oral polio vaccine at different temperatures. Vaccine 6: 12-13.
4. Berard A, Coombs KM (2009) Mammalian reoviruses: propagation, quantification, and storage. Current protocols in microbiology: 15C-1.
5. Evans RK, Nawrocki DK, Isopi LA, Williams DM, Casimiro DR, et al. (2004) Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines. J Pharm Sci 93: 2458-2475.
6. Condit RC, Moussatche N, Traktman P (2006) In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. Advances in virus research 66: 31-124.
7. Moss B (1987) The molecular biology of poxviruses. The Molecular Basis of Viral Replication. Springer. pp. 499-516.
8. McCollum AM, Li Y, Wilkins K, Karem KL, Davidson WB, et al. (2014) Poxvirus viability and signatures in historical relics. Emerging infectious diseases 20: 177.
9. FDA found more than smallpox vials in storage room (n.d.). Доступ: [https://www.washingtonpost.com/national/health-science/fda-found-more-than-smallpox-vials-in-storage-room/2014/07/16/850d4b12-0d22-11e4-8341-b8072b1e7348\\_story.html](https://www.washingtonpost.com/national/health-science/fda-found-more-than-smallpox-vials-in-storage-room/2014/07/16/850d4b12-0d22-11e4-8341-b8072b1e7348_story.html). Доступ 7 ноября 2015 года.
10. CDC Media Statement on Newly Discovered Smallpox Specimens (n.d.). Доступ: <http://www.cdc.gov/media/releases/2014/s0708-NIH.html>. Доступ 7 ноября 2015 года.
11. Rheinbaben F v, Gebel J, Exner M, Schmidt A (2007) Environmental resistance, disinfection, and sterilization of poxviruses. Poxviruses. Springer. pp. 397-405.
12. Essbauer S, Meyer H, Porsch-Özcürümez M, Pfeffer M (2007) Long-Lasting Stability of Vaccinia Virus (Orthopoxvirus) in Food and Environmental Samples. Zoonoses and public health 54: 118-124.
13. Complete List of Vaccines Licensed for Immunization and Distribution in the US (n.d.). Доступ: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm093833.htm>. Доступ 4 ноября 2015 года.
14. Shire SJ (2009) Formulation and manufacturability of biologics. Current opinion in biotechnology 20: 708-714.
15. Kuelto LA, Wang W, Randolph TW, Carpenter JF (2008) Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. J Pharm Sci 97: 1801-1812.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Замороженная композиция живого вируса для уничтожения опухолевых клеток, содержащая вирус простого герпеса-1;  
 частично гидролизованный желатин в концентрации от 0,1 до 3% мас./об.;  
 сорбит в концентрации от 0,5 до 4% мас./об.;

- хлорид натрия в концентрации от 50 до 250 мМ и фосфат натрия или фосфат калия, причем указанная композиция имеет рН 7-8.
2. Композиция живого вируса по п.1, где указанная композиция содержит вирус простого герпеса-1;  
частично гидролизированный желатин в концентрации от 0,1 до 3% мас./об.;  
сорбит в концентрации от 0,5 до 3% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации от 50 до 250 мМ и фосфат натрия или фосфат калия, причем указанная композиция имеет рН 7-8.
3. Композиция живого вируса по п.2, где указанная композиция содержит вирус простого герпеса-1;  
частично гидролизированный желатин в концентрации от 0,1 до 3% мас./об.;  
сорбит в концентрации от 0,5 до 3% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации от 50 до 250 мМ;  
фосфат натрия в концентрации 10-500 мМ, причем указанная композиция имеет рН 7-8.
4. Композиция живого вируса по п.3, где указанная композиция содержит вирус простого герпеса-1;  
частично гидролизированный желатин в концентрации от 0,1 до 3% мас./об.;  
сорбит в концентрации от 0,5 до 3% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации от 130 до 160 мМ;  
фосфат натрия в концентрации 80-120 мМ, причем указанная композиция имеет рН 7-8.
5. Композиция живого вируса по п.4, где указанная композиция содержит вирус простого герпеса-1;  
частично гидролизированный желатин в концентрации 0,5% мас./об.;  
сорбит в концентрации от 0,5 до 3% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации от 130 до 160 мМ;  
фосфат натрия в концентрации 80-120 мМ, причем указанная композиция имеет рН 7-8.
6. Композиция живого вируса по п.5, где указанная композиция содержит вирус простого герпеса-1;  
частично гидролизированный желатин в концентрации 0,5% мас./об.;  
сорбит в концентрации 2% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации от 130 до 160 мМ;  
фосфат натрия в концентрации 80-120 мМ, причем указанная композиция имеет рН 7-8.
7. Композиция живого вируса по п.1, где указанная композиция содержит вирус простого герпеса-1;  
частично гидролизированный желатин в концентрации 0,5% мас./об.;  
сорбит в концентрации 2% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации 145 мМ;  
фосфат натрия в концентрации 102 мМ и миоинозит в концентрации 4% мас./об., причем указанная композиция имеет рН 7,4.
8. Композиция живого вируса по п.1, где указанная композиция содержит талимоген лаггерпарепвек;  
частично гидролизированный желатин в концентрации 0,5% мас./об.;  
сорбит в концентрации 2% мас./об.;  
хлорид натрия в концентрации 145 мМ;  
фосфат натрия в концентрации 102 мМ и миоинозит в концентрации 4% мас./об., причем указанная композиция имеет рН 7,4.
9. Композиция живого вируса по любому из пп.1-6, где указанная композиция дополнительно содержит миоинозит в концентрации 4% мас./об.
10. Композиция живого вируса по любому из пп.1-9, в которой частично гидролизированный желатин является свиным.
11. Композиция живого вируса по любому из пп.1-7, 9 или 10, где вирус простого герпеса-1 выбран из группы, состоящей из талимоген лаггерпарепвека, HSV1716, G207, OrienX010, NV1020 и M032.
12. Композиция живого вируса по п.11, где вирус простого герпеса 1 представляет собой талимоген лаггерпарепвек.

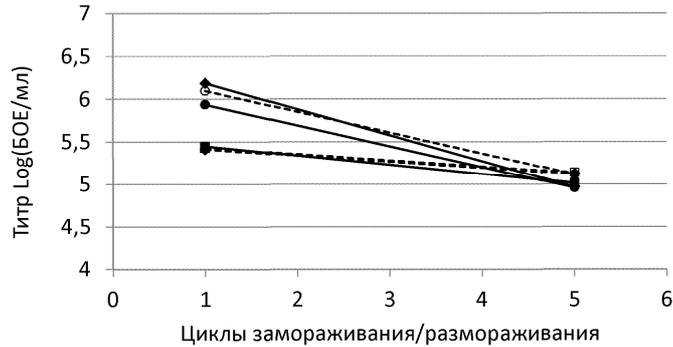
13. Применение композиции живого вируса по любому из пп.1-12 для уничтожения опухолевых клеток.

14. Применение по п.13, где композицию живого вируса вводят в комбинации с ингибитором контрольной точки.

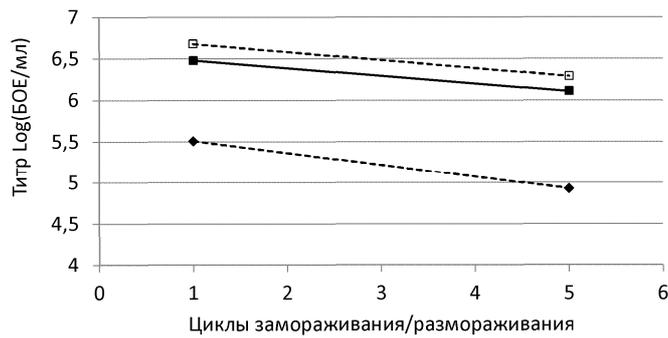
15. Применение по п.13 или 14, где опухолевые клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитомы, олигодендроглиомы, менингиомы, нейрофибромы, глиобластомы, эпендимомы, шванномы, нейрофибросаркомы, медуллобластомы, клеток меланомы, клеток рака поджелудочной железы, клетки карциномы предстательной железы, клетки рака молочной железы, клетки рака легких, клетки рака толстой кишки, клетки гепатомы, мезотелиомы, клетки рака мочевого пузыря и клетки эпидермоидной карциномы.

16. Применение по п.15, где опухолевые клетки представляют собой клетки меланомы.

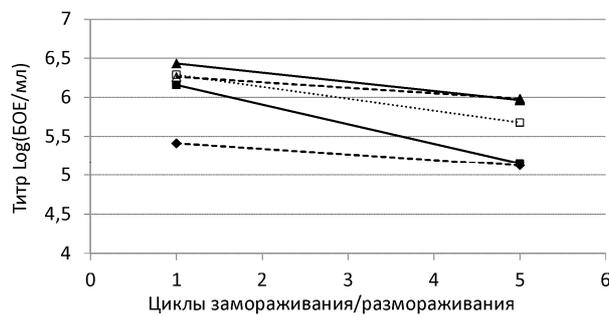
17. Применение композиции по любому из пп.1-12 для терапии рака.



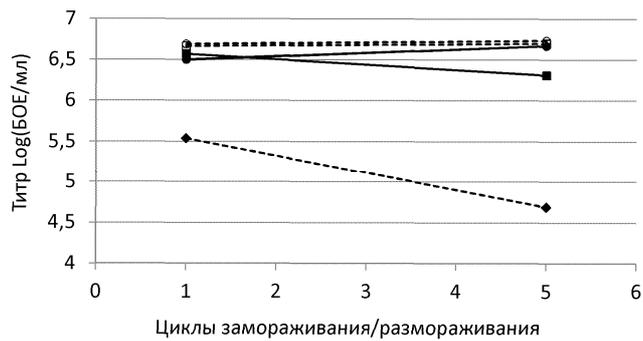
Фиг. 1



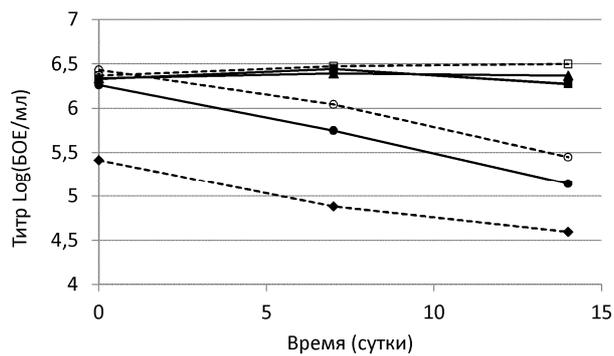
Фиг. 2А



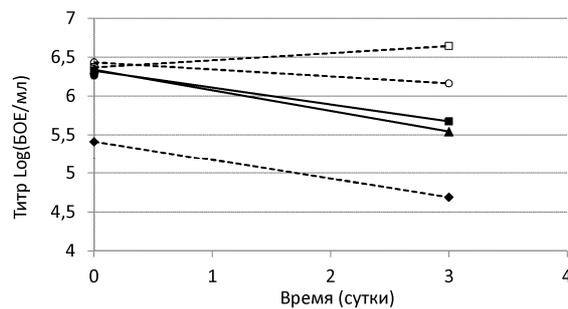
Фиг. 2В



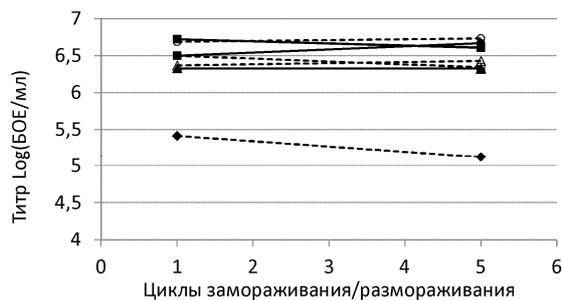
Фиг. 3



Фиг. 4А

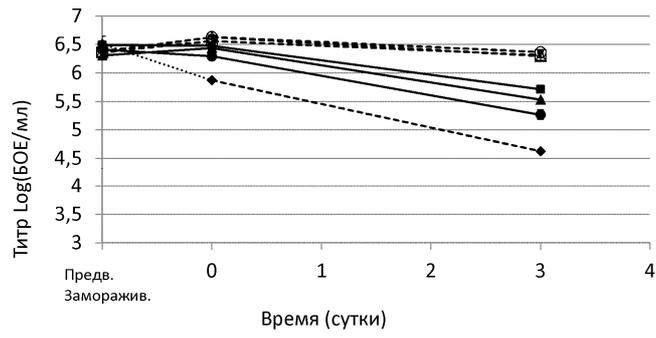


Фиг. 4В

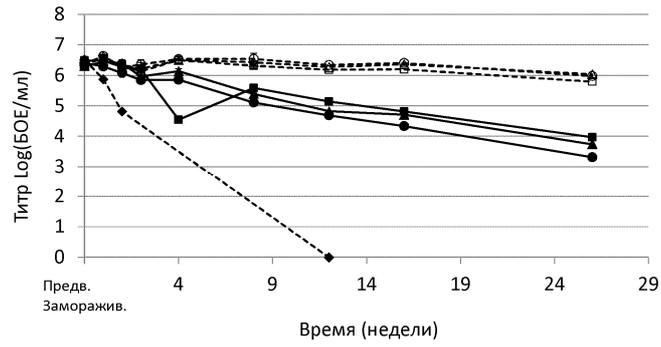


Фиг. 5

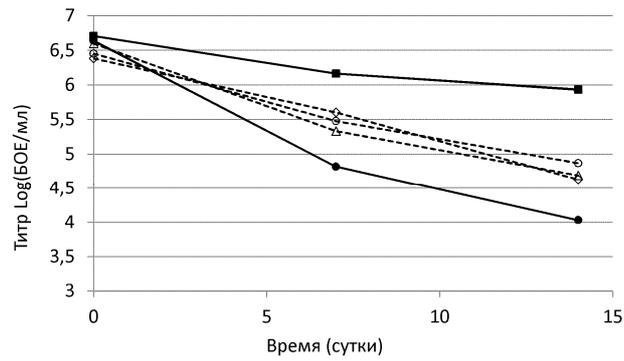
045551



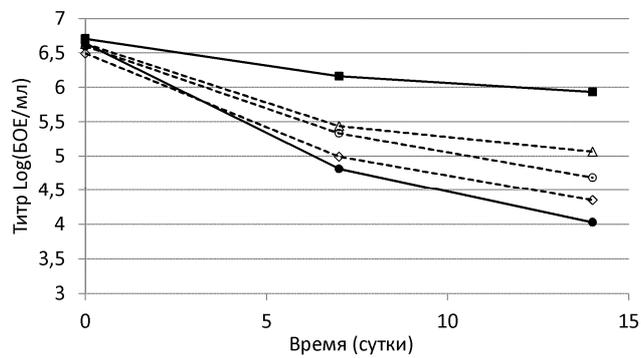
Фиг. 6А



Фиг. 6В

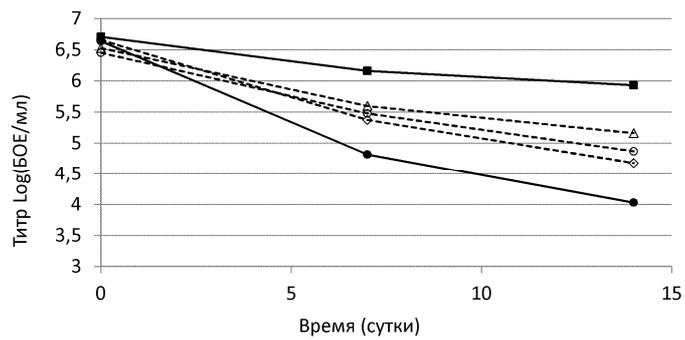


Фиг. 7А

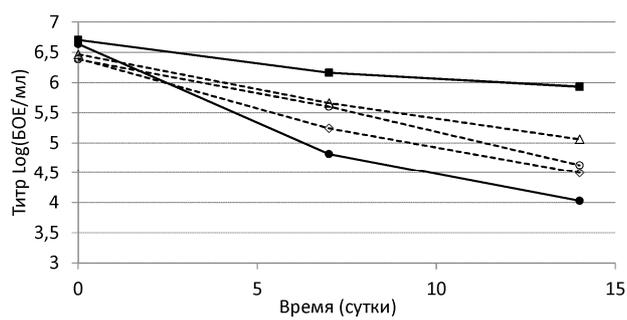


Фиг. 7В

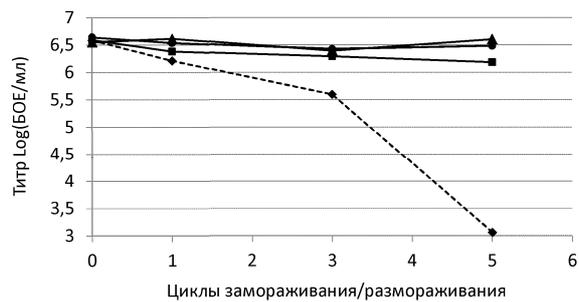
045551



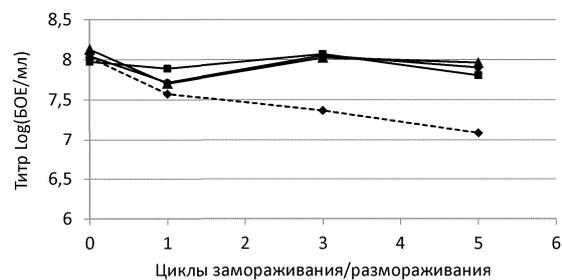
Фиг. 7С



Фиг. 7D

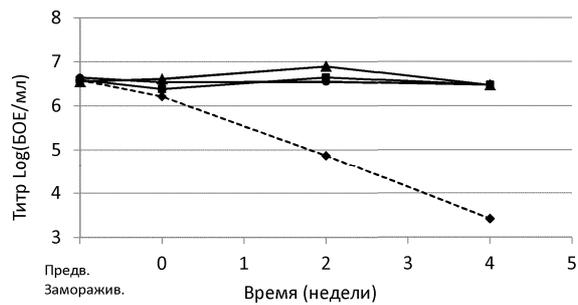


Фиг. 8А

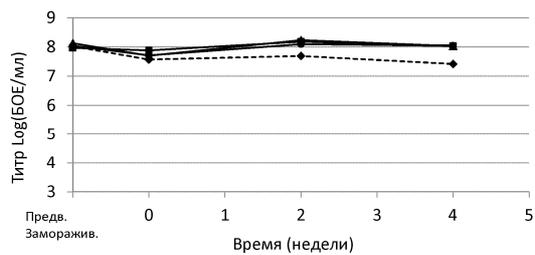


Фиг. 8В

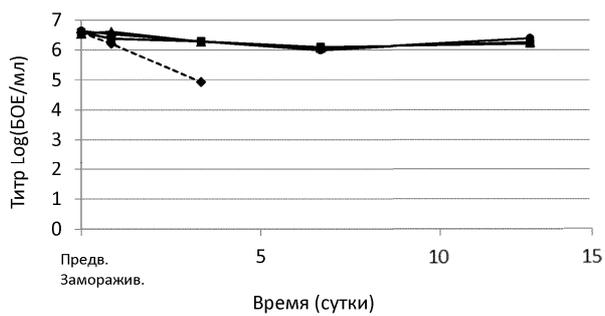
045551



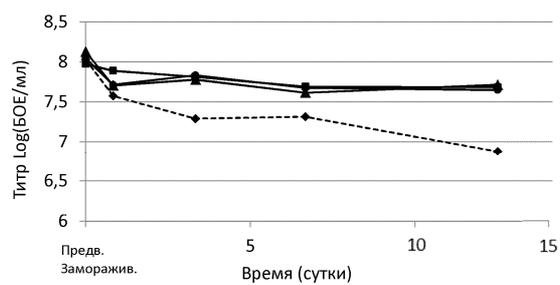
Фиг. 8С



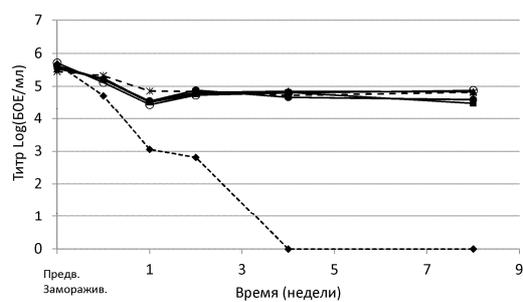
Фиг. 8D



Фиг. 8Е

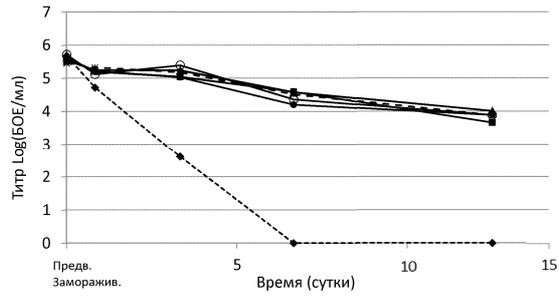


Фиг. 8F

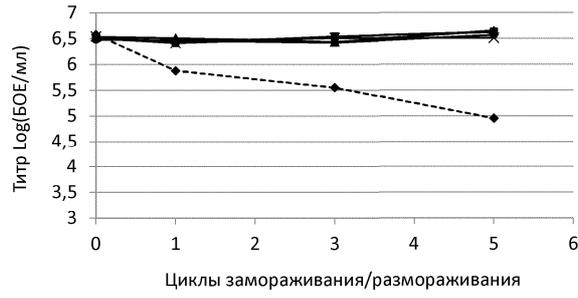


Фиг. 8G

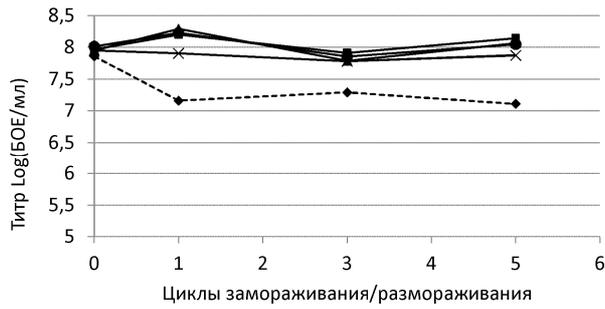
045551



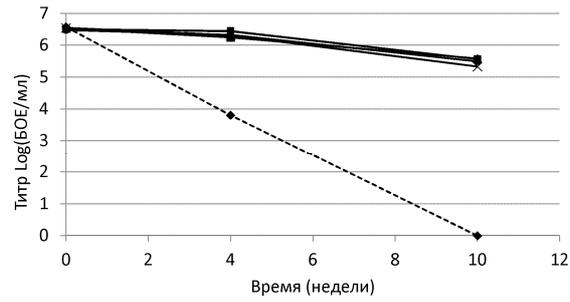
Фиг. 8Н



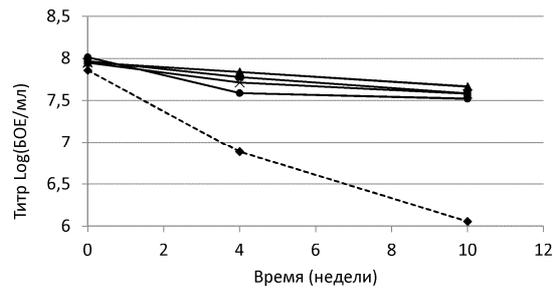
Фиг. 9А



Фиг. 9В

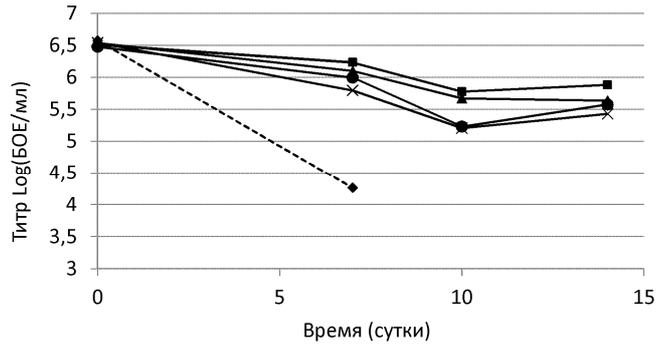


Фиг. 9С

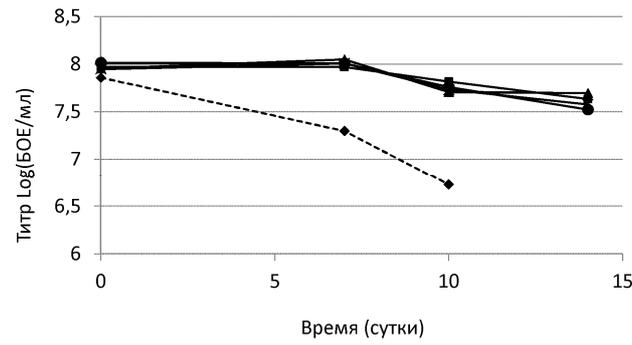


Фиг. 9D

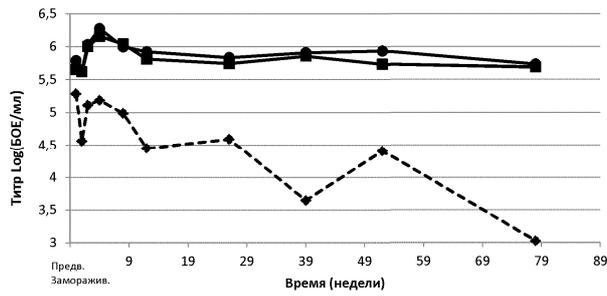
045551



Фиг. 9Е

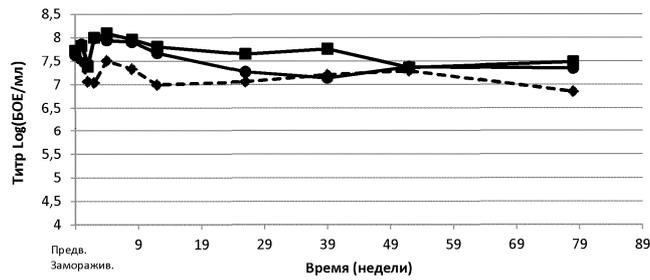


Фиг. 9F

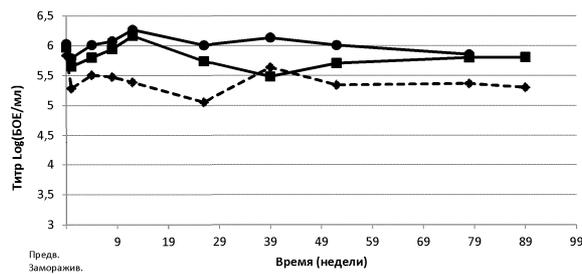


Фиг. 10А

$10^8$  БОЕ/мл

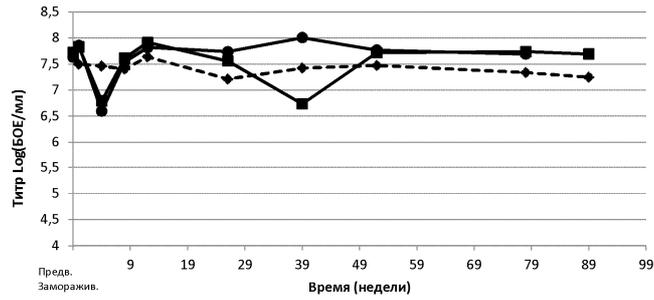


Фиг. 10В

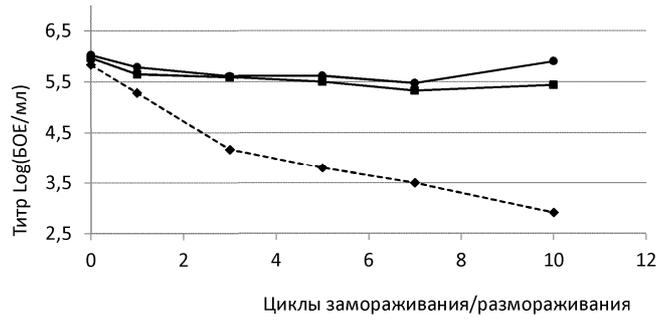


Фиг. 10С

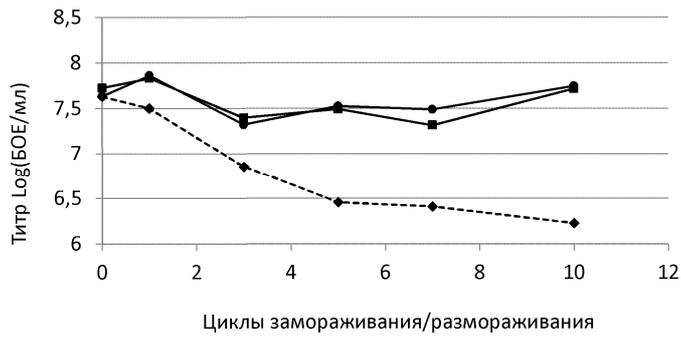
045551



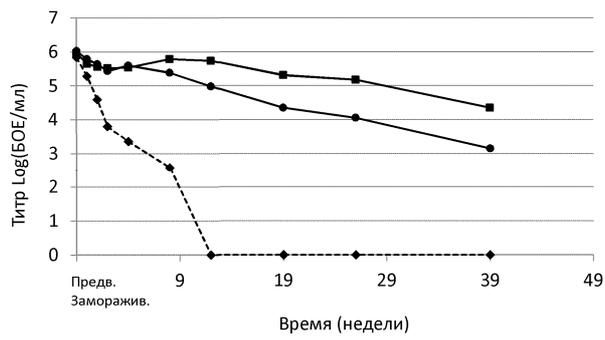
Фиг. 10D



Фиг. 10E

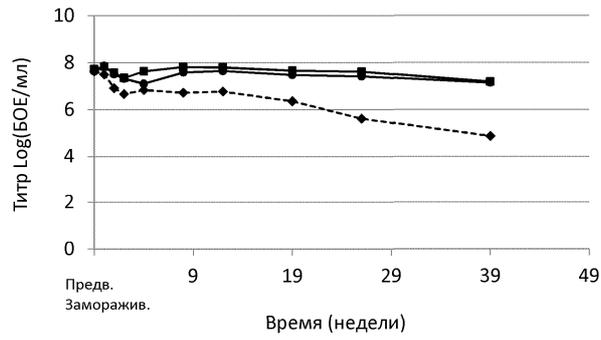


Фиг. 10F

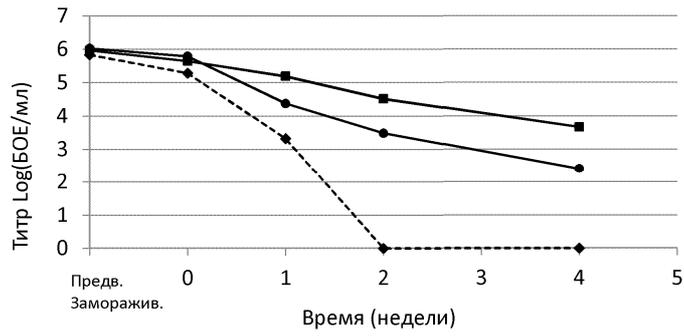


Фиг. 10G

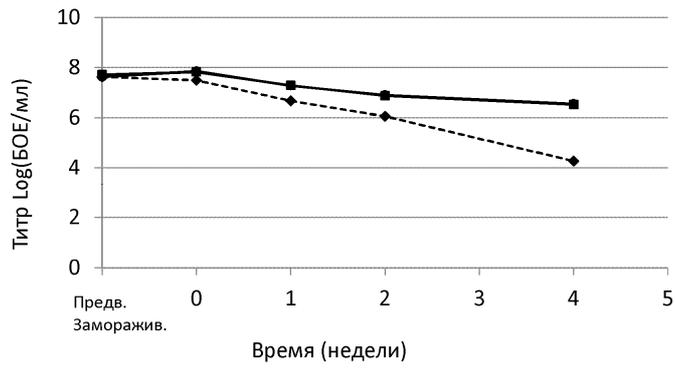
045551



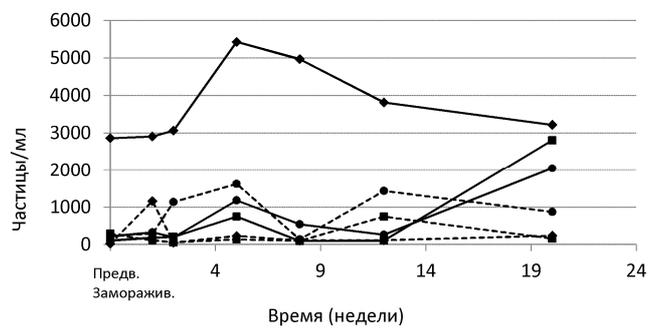
Фиг. 10H



Фиг. 10I

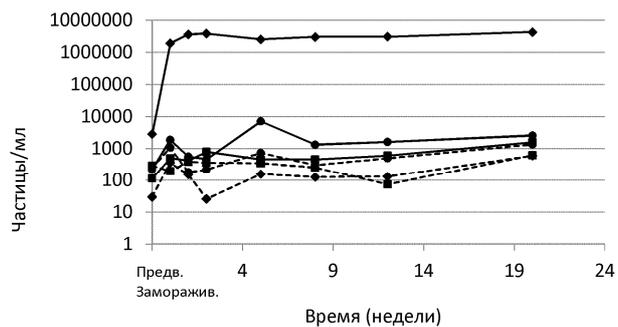


Фиг. 10J

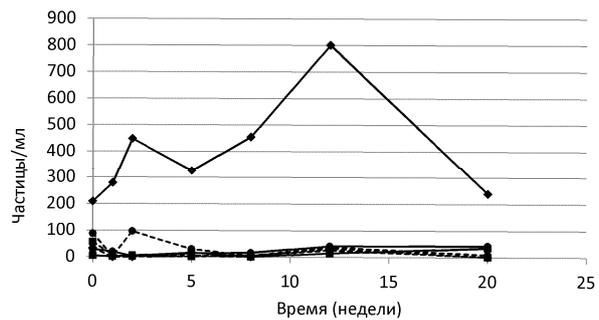


Фиг. 11A

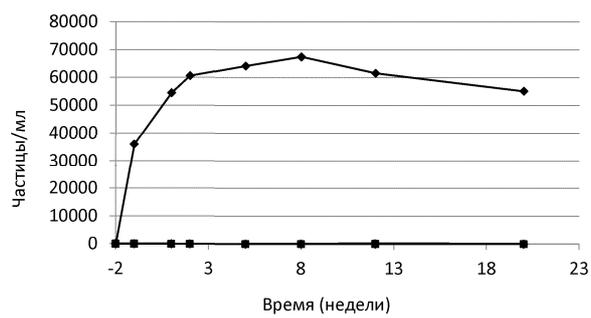
045551



Фиг. 11В



Фиг. 12А



Фиг. 12В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2