

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992167** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.22

(51) Int. Cl. *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.14

(54) ВАКЦИНА

(31) 1704126.0

(32) 2017.03.15

(33) GB

(86) PCT/EP2018/056444

(87) WO 2018/167172 2018.09.20

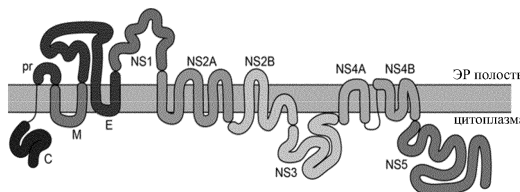
(71)(72) Заявитель и изобретатель:

**БЛОМ НИЛЕН КИМ АНДРЕА;
ЛЬЮНГГРЕН ХАНС-ГУСТАФ
ЭЙНАР (SE)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение обеспечивает вакцинную композицию, включающую вакцину против вируса желтой лихорадки, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки. Изобретение также обеспечивает вакцинную композицию, включающую вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции, вызванной флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.



201992167

A1

A1

201992167

ВАКЦИНА

Изобретение относится в целом к вакцинным композициям, и в частности, к вакцинной композиции для применения при вакцинации индивидуума против инфекции, вызванной флавивирусом.

Перечисление или обсуждение явно ранее опубликованного документа в настоящем описании не обязательно должно восприниматься как подтверждение того, что документ является частью уровня техники или является общеизвестным.

Флавивирусы принадлежат к семейству *Flaviviridae* и включают более 70 вирусов, вызывающих тяжелые заболевания. Эти вирусы являются причиной сотен тысяч смертей в год, а также значительной заболеваемости. Большинство вирусов передаются хозяевам-позвоночным либо комарами, либо клещами. Несколько представителей рода флавивирусов, такие как вирус денге (DENV), вирус желтой лихорадки (YFV), вирус лихорадки Западного Нила (WNV), вирус клещевого энцефалита (TBEV), вирус Зика (ZIKV) и вирус японского энцефалита (JEV), являются высоко патогенными для человека и представляют собой серьезные проблемы для здоровья во всем мире.

Флавивирусы имеют геном из одноцепочечной РНК, который кодирует десять белков (С, prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5), где белки NS3 и NS5 считаются консервативными областями в 1-5 вирусных штаммах каждого вируса. Они могут быть сгруппированы в вирусы, которые вызывают пропотевание жидкости из сосудов и геморрагическую лихорадку (DENV, YFV), и те, которые вызывают энцефалит (WNV, ZIKV, TBEV и JEV). В настоящее время невозможно предсказать, у каких людей разовьются тяжелые клинические проявления заболевания, и наше понимание патогенеза заболеваний, вызываемых вирусами, далеко от адекватного. Одной из общих черт флавивирусных инфекций является то, что не существует специального лечения или эффективного противовирусного препарата. Однако некоторые инфекции можно предотвратить с помощью вакцинации. В настоящее время имеются коммерческие вакцины против трех флавивирусов; YFV, JEV и TBEV (см. таблицу 1 ниже). Из этих вакцин живая аттенуированная вакцина YFV является одной из самых эффективных и используемых вакцин на Земле.

Живая аттенуированная вакцина YFV была разработана в 1930-х годах, и в последние годы ей вновь уделяется внимание в связи с ее очень высокой эффективностью (однократная доза, обеспечивающая защиту в течение не менее 10 лет) (см. таблицу 1). Вакцина YFV может быть использована для изучения иммунных реакций человека при инфекции репликационно-компетентным вирусом. Адаптивные и врожденные иммунные

ответы, вызываемые вакциной YFV у людей, хорошо охарактеризованы.

Вакцины JEV и TBEV основаны на инаktivированных вирусах (таблица 1), и для поддержания защиты необходимы последующие бустерные иммунизации.

TBEV передается людям главным образом через зараженных клещей, и по оценкам, у одной трети инфицированных индивидуумов развиваются клинические проявления заболевания (клещевой энцефалит, TBE). TBE является двухфазным заболеванием, при котором более трети пациентов страдают от постоянных осложнений в течение всей жизни после острой фазы инфекции, включая психоневрологические симптомы, сильные головные боли и снижение качества жизни (13). Число зарегистрированных случаев быстро возросло в последние десятилетия как в Европе, так и в Азии (4–14), и инфекцию можно лечить только симптоматически, так как никакого специального лечения не существует. Несмотря на существующие вакцины, ежегодно в Швеции регистрируют более двухсот случаев TBE. В Европе доступны две вакцины на основе инаktivированных формалином вирусов (FSME-IMMUN, Pfizer Innovations и Encerpur, GlaxoSmithKline). Эти вакцины требуют бустерной иммунизации каждые 3-5 лет после исходных вакцинаций для поддержания защиты.

JEV, как и YFV, передается человеку через комаров и является основной причиной эпидемического энцефалита в Азии (1). Вирус вызывает японский энцефалит (JE), уровень смертности для которого достигает 30% среди людей с симптоматическим заболеванием, и приблизительно 50% выживших страдают от длительных психоневрологических последствий. IXIARO® является инаktivированной вакциной против JEV, выращенной в клетках Vero. Бустерные дозы рекомендуются, если человек получил первичную вакцинацию с двумя дозами более года назад, и при этом сохраняется риск инфицирования JEV. Кроме того, из-за стоимости вакцины она была недоступна миллионам людей в Юго-Восточной Азии. Даже в западных странах многие путешественники в эндемичных районах воздерживаются от вакцинации из-за высокой стоимости.

Сообщается о растущем числе неудач вакцины против TBE, и, несмотря на полную программу вакцинации против JE с бустерными дозами, все еще существует риск неэффективности вакцины против JEV. Следовательно, вакцинам против JEV и TBE не хватает эффективности, обеспечиваемой вакциной YFV. Улучшение вакцин против JEV и TBE имеет большое значение для общественного здравоохранения в Швеции, других странах Европы, и в Азии, где эти вирусы являются эндемичными.

Таким образом, существует потребность в разработке новых вакцин для защиты от флавивирусной инфекции, в частности, вакцин для защиты от инфекции флавивирусами,

отличными от YFV.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что вакцина YFV генерирует перекрестно-реактивный иммунный ответ (в частности, перекрестно-реактивный ответ Т-клеток) на флавивирусы, отличные от YFV, включая TBEV и ZIKV. Кроме того, наблюдаются перекрестные реакции антител. Авторы изобретения также выявили неожиданный синергетический эффект с точки зрения иммунного ответа, генерируемого против флавивируса, когда вакцину YFV используют в комбинации с другой вакциной против флавивируса.

Результаты авторов настоящего изобретения являются неожиданными, поскольку ранее не отмечалось, что вакцина против флавивируса может генерировать перекрестно-реактивный ответ Т-клеток (Kayser et al., «Human Antibody Responses to Immunization With 17D Yellow Fever and Inactivated TBE Vaccine», J Medical Virol., 17:35-45, 1985; Theiler, J Casals: «The serological reactions in yellow fever». Am J Trop Med Hyg. 7:585-594 1958; Weyer, Rupprecht and Nelson: «Cross-protective and cross-reactive immune responses to recombinant vaccinia viruses expressing full-length lyssavirus glycoprotein genes», Epidemiol Infect 2008; Turtle, L. et al. «Cellular Immune Responses to Live Attenuated Japanese Encephalitis (JE) Vaccine SA14-14-2 in Adults in a JE/Dengue Co-Endemic Area». PLoS Negl Trop Dis 11, e0005263, doi:10.1371/journal.pntd.0005263 (2017)).

Соответственно, первый аспект изобретения относится к вакцинной композиции, содержащей вакцину против YFV, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом; где флавивирус не является YFV.

Изобретение включает применение вакцинной композиции, содержащей вакцину против YFV, при производстве медикамента для вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом, где флавивирус не является YFV.

Изобретение также включает способ вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом, включающий стадию введения индивидууму вакцинной композиции, содержащей вакцину YFV; где флавивирус не является YFV.

Под вакциной против YFV мы подразумеваем значение иммуногена, который при введении индивидууму (например, тому, у кого нет иммунодефицита или иммуносупрессии) способен вызывать защитный иммунный ответ против YFV у индивидуума. Таким образом, вакцина может быть такой, которая защищает от заражения (например, последующего или более позднего заражения) самим YFV, например, либо путем полного предотвращения инфекции, либо путем уменьшения воздействия этой инфекции за счет уменьшения одного или нескольких симптомов заболевания, которые могли бы иначе проявляться, если вакцина не была введена индивидууму.

Используемый в настоящей заявке термин «иммунный ответ» предназначен для охвата клеточных и/или гуморальных иммунных ответов, которые являются достаточными для ингибирования или предотвращения инфекции, или для предотвращения или снижения симптомов заболевания, вызванных инфекцией. Также включены врожденные и/или адаптивные иммунные ответы.

Способна ли вакцина YFV индуцировать защитный иммунный ответ, можно определить любым подходящим способом в данной области техники.

В одном варианте осуществления способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ определяют путем оценки наличия YFV у индивидуума после заражения YFV. Если индуцируется защитный иммунный ответ, можно будет ожидать, что вирусная нагрузка YFV будет меньше в любой момент времени после заражения, чем вирусная нагрузка YFV в случае отсутствия индукции защитного иммунного ответа. Как правило, вирусная нагрузка будет снижена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, и более типично по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с вирусной нагрузкой у человека, у которого не был индуцирован защитный иммунный ответ (например, у человека, которому не вводили YFV вакцину).

Способы измерения вирусной нагрузки хорошо известны в данной области техники и включают как прямые, так и косвенные способы. Непосредственная оценка наличия YFV у индивидуума может включать непосредственную оценку присутствия вирусного генома (например, с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) и/или другого компонента вируса, такого как вирусный белок. Другим прямым подходом является выделение вируса из плазмы крови и его выращивание в культуре клеток. Альтернативно, вирусную нагрузку можно оценивать непрямым способом. В непрямых способах обнаружения обычно используется тот факт, что на более поздних стадиях инфекции хорошо известен гуморальный иммунный ответ в форме антител IgM и IgG. Следовательно, вирусная нагрузка может быть оценена косвенно путем выявления антител, нацеленных на инфицирующий вирус, с использованием, например, методов иммуноферментного анализа. Предпочтительным инструментом для определения вирусной нагрузки YFV является обнаружение вирусной РНК или вирусных антигенов, таких как антиген NS1.

В другом варианте осуществления способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ определяют путем оценки одного или нескольких клинических симптомов инфекции YFV у индивидуума после инфицирования этого индивидуума YFV. Если индуцирован защитный иммунный ответ, можно ожидать, что один или несколько клинических симптомов будут проявляться в меньшем числе и/или

степени выраженности в любой момент времени после заражения, чем один или несколько клинических симптомов в случае отсутствия индукции иммунного ответа.

Симптомы YFV хорошо известны в данной области техники и включают лихорадку, головную боль, озноб, боль в пояснице (например, сильную боль в пояснице), утомляемость, потерю аппетита, мышечные боли, тошноту и рвоту. Другие симптомы, связанные со второй токсической фазой заболевания, включают желтуху из-за повреждения печени, боли в животе, кровотечение во рту, глазах и желудочно-кишечном тракте, рвоту с кровью, почечную недостаточность, икоту и делирий. Также следует понимать, что оценка одного или нескольких клинических симптомов инфекции YFV может включать оценку одного или нескольких расстройств и/или состояний, связанных с инфекцией YFV. Принимая во внимание защиту, обеспечиваемую вакциной YFV, понятно, что вакцинированные индивидуумы будут чрезмерно представлены в бессимптомной популяции.

В еще одном варианте осуществления способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ определяют путем обнаружения одного или нескольких показателей этого иммунного ответа непосредственно у индивидуума после введения индивидууму вакцины YFV. Под «одним или несколькими показателями иммунного ответа» мы подразумеваем значение одной или нескольких клеток и/или молекул и/или генов, которые отвечают за опосредование этого иммунного ответа и, следовательно, чье присутствие или модуляцию (например, повышающую регуляцию) можно использовать для выявления ответа. Один или несколько показателей могут быть показателями врожденного иммунного ответа на YFV и/или адаптивного иммунного ответа на YFV. Один или несколько показателей адаптивного иммунного ответа могут быть показателями клеточного иммунного ответа на YFV и/или гуморального иммунного ответа на YFV. Под одним или несколькими показателями иммунного ответа мы подразумеваем значение антител, которые специфически связываются с YFV, Т-клеток, специфичных для YFV (например, CD4 и/или CD8 Т-клеток и/или других позитивных по Т-клеточному рецептору клеток, включая Treg-клетки, NK Т-клетки и связанные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT) и В-клетки, специфичные для YFV (например, В-клетки памяти и/или плазмобласты и/или плазматические клетки и/или другие положительные по В-клеточному рецептору клетки).

Как правило, вакцина YFV индуцирует иммунную систему человека к выработке антител, которые специфически связываются с YFV. Основными мишенями антител в YFV являются Е-белок и NS1. Предпочтительно полученное таким образом антитело специфически связывает YFV (например, Е-белок или белок NS1) с большей

аффинностью, чем любую другую молекулу (например, любую молекулу, полученную не из флавивируса) у индивидуума, такой как по меньшей мере в 2 раза или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 50 раз большая аффинность, по сравнению с любой другой молекулой (например, любой молекулой, полученной не из флавивируса) у индивидуума. Более предпочтительно, антитело связывает YFV (например, Е-белок или белок NS1) с аффинностью по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 1000 раз, или по меньшей мере в 10000 раз большей, чем для любой другой молекулы (например, любой молекулы, полученной не из флавивируса) у индивидуума. Методы обнаружения антител хорошо известны в данной области техники, и можно использовать любую подходящую методику, такую как ELISA.

Понятно, что вакцина YFV может стимулировать иммунную систему индивидуума к продуцированию Т-клеток, специфичных к YFV. Т-клетки могут быть CD8 Т-клетками и/или CD4 Т-клетками, и/или Treg-клетками, и/или NK Т-клетками, и/или MAIT Т-клетками, и/или другими положительными по Т-клеточному рецептору клетками. Способы обнаружения таких клеток хорошо известны в данной области техники и описаны в приведенных ниже примерах и, например, в Blom et al, 2013 (J Immunol 190: 2150) и Akondy et al, 2009 (J Immunol 183 (12): 7919). Удобно использовать проточную цитометрию. Таким образом, в одном варианте осуществления способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ определяют путем оценки того, имеет ли индивидуум Т-клетки, специфичные для YFV, такие как любые из CD8 Т-клеток, CD4 Т-клеток, Treg Т-клеток, NK Т-клеток, MAIT Т-клеток или других положительных по Т-клеточному рецептору клеток.

Также следует понимать, что вакцина YFV может стимулировать иммунную систему индивидуума к производству В-клеток, специфичных для YFV. В-клетки могут представлять собой В-клетки памяти, плазматические клетки или плазмобласты. Способы обнаружения таких клеток хорошо известны в данной области техники и описаны в приведенных ниже примерах. Удобно использовать проточную цитометрию.

Как правило, вакцина YFV представляет собой инактивированную или аттенуированную вакцину.

Под «инактивированной» вакциной мы подразумеваем, что YFV обработан таким образом, чтобы устранить его способность вызывать заболевание, но при этом он сохраняет способность вызывать защитный иммунитет. YFV может быть убитым вирусом. Способы инактивации вирусов для использования в вакцинах хорошо известны в данной области техники и включают химическую обработку или обработку УФ-светом.

Под «аттенуированной» вакциной мы подразумеваем, что YFV был выбран или

иным образом обработан так, чтобы значительно снизить его способность вызывать заболевание, но при этом он сохраняет способность вызывать защитный иммунитет. Способы аттенуирования вирусов для использования в вакцинах хорошо известны в данной области техники и включают мутацию или делецию специфических генов, которые участвуют в вирулентности, таким образом ограничивая патогенный потенциал вируса.

Понятно, что вакцина YFV может быть живой вакциной. Предпочтительно вакцина YFV представляет собой живую аттенуированную вакцину.

В одном варианте осуществления вакцина YFV содержит один или несколько иммуногенов, которые соответствуют одному или нескольким белковым компонентам YFV. Под «белковым компонентом» мы подразумеваем целый белок или часть белка. Понятно, что белковая часть может быть или не быть подвергнута посттрансляционной модификации, например, гликозилированию. Таким образом, под «белком» мы также подразумеваем посттрансляционно модифицированный белок, такой как гликопротеин. Кроме того, следует понимать, что вакцина YFV может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный белковый компонент или его часть.

Один или несколько белковых компонентов могут представлять собой структурный белок и/или неструктурный белок или его фрагмент, вариант или производное. Структурные белки YFV включают белок anchC, ргМ и Е. Они образуют вирус вместе с упакованной молекулой РНК и называются капсидным белком (С, 12-14 кДа), мембранным белком (М и его предшественник ргМ, 18-22 кДа) и белком оболочки (Е, 52-54 кДа). Неструктурные (NS) белки YFV пронумерованы от 1 до 5 в порядке синтеза. Три больших неструктурных белка имеют высококонсервативные последовательности среди флавивирусов: NS1 (38-41 кДа), NS3 (68-70 кДа) и NS5 (100-103 кДа), и поэтому белковые компоненты могут включать любой один или несколько из NS1, NS3 и NS5, или их фрагмент, вариант или производное. Другие малые белки в YFV включают NS2A, NS2B, NS4A и NS4B. Особенно предпочтительно вакцина YFV содержит NS5 или его фрагмент, вариант или производное.

Как правило, белковый компонент представляет собой неструктурный белок или его фрагмент, вариант или производное. Таким образом, белковым компонентом может быть NS5 или его фрагмент, вариант или производное. Аналогично, белковый компонент может представлять собой NS3 или его фрагмент, вариант или производное.

Предпочтительно вакцина YFV содержит NS5 или его фрагмент, вариант или производное. Аминокислотные последовательности белков NS5 из трех штаммов YFV представлены в примерах ниже, и поэтому следует понимать, что вакцина может

содержать любой из этих конкретных белков NS5 или их фрагмент, вариант или производное.

Под «фрагментом» белкового компонента YFV, такого как неструктурный белок или структурный белок YFV, мы подразумеваем значение части белкового компонента, которая сохраняет способность к повышению иммунного ответа у индивидуума на YFV. Фрагмент может содержать от 5 до 200 аминокислот. Как правило, фрагмент состоит по меньшей мере из 5 аминокислот (например, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот), таких как по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аминокислот. Примером подходящего фрагмента NS5 является ETACLSKAY (SEQ ID NO: 1). Другие примеры подходящих фрагментов включают VLAPYMPDV (SEQ ID NO: 39), YMPDVLEKL (SEQ ID NO: 40), RNSTHEMY (SEQ ID NO: 41), RVERIKSEY (SEQ ID NO: 42), WFYDNDNPY (SEQ ID NO: 43), RTWHYCGSY (SEQ ID NO: 44), MAMTDTTPF (SEQ ID NO: 45), KWNRWLFR (SEQ ID NO: 46), RSHAAIGAY (SEQ ID NO: 47), WLGARYLEF (SEQ ID NO: 48), GVEGIGLQY (SEQ ID NO: 49), AAMDGGGFY (SEQ ID NO: 50), YMSPHNHKKL (SEQ ID NO: 51), RPAPGGKAY (SEQ ID NO: 52), RPIDDRFGL (SEQ ID NO: 53), YANMWSLMY (SEQ ID NO: 54), YFHKRDMRL (SEQ ID NO: 55), VKKWRDVPY (SEQ ID NO: 56), RTLIGQEKY (SEQ ID NO: 57), RSHAAIGAY (SEQ ID NO: 58), TPFQQRVF (SEQ ID NO: 59), MWHVTRGAF (SEQ ID NO: 60), SVKEDLVAY (SEQ ID NO: 61), CARRRLRTL (SEQ ID NO: 62), RRRLRTLVL (SEQ ID NO: 63), DVKFHTQAF (SEQ ID NO: 64), AMCHATLTY (SEQ ID NO: 65), RANESATIL (SEQ ID NO: 66), VWLNRKTF (SEQ ID NO: 67), RVLDCRTAF (SEQ ID NO: 68), SMLLDNMEV (SEQ ID NO: 69).

Под «производным» белкового компонента YFV, такого как неструктурный белок или структурный белок YFV, мы подразумеваем белок или часть белка, который был модифицирован по сравнению с формой, в которой он естественно присутствует в этом организме, но который сохраняет способность повышать иммунный ответ у человека на YFV.

Под «производным» мы также подразумеваем пептиды, в которых один или несколько аминокислотных остатков химически модифицированы до или после того, как пептид синтезирован, при условии, что функция пептида, а именно индукция специфического адаптивного иммунного ответа (например, индукция специфических антител *in vivo*), остается практически без изменений. Такие модификации включают образование солей с кислотами или основаниями, особенно физиологически приемлемыми органическими или неорганическими кислотами и основаниями, образование сложного эфира или амида концевой карбоксильной группы, и

присоединение защитных групп аминокислот, таких как N-трет-бутоксикарбонил. Такие модификации могут защищать пептид от метаболизма *in vivo*. Пептиды могут присутствовать в виде единичных копий или множественных, например, tandemных повторов. Такие tandemные или множественные повторы сами по себе могут быть достаточно антигенными, чтобы избежать использования носителя. Может быть предпочтительно сформировать пептид в виде петли с N-концевыми и C-концевыми частями, соединенными вместе, или добавить один или нескольких остатков Цис к концу для повышения антигенности и/или для обеспечения возможности образования дисульфидных связей. Если пептид ковалентно связан с носителем, предпочтительно с полипептидом, то расположение предпочтительно является таким, что пептид по изобретению образует петлю.

Под «вариантом» белкового компонента YFV, такого как неструктурный белок или структурный белок YFV, мы подразумеваем вариант последовательности белкового компонента или его части, который можно использовать для повышения иммунного ответа у индивидуума на YFV. Например, белковый компонент YFV может содержать одну или несколько аминокислотных замен по сравнению с аминокислотной последовательностью белкового компонента, которая встречается в природе. Предпочтительно, вариант имеет по меньшей мере 60% идентичность последовательности с нативным белковым компонентом YFV или его частью, такую как по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности. Более предпочтительно, вариант имеет идентичность последовательности по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% с нативным белковым компонентом YFV или его частью.

Процент идентичности последовательности между двумя полипептидами может быть определен с использованием любой подходящей компьютерной программы, например, программы GAP Генетической вычислительной группы Университета Висконсина, и следует понимать, что процент идентичности рассчитывают по отношению к полипептидам, чья последовательность была выровнена оптимально. Выравнивание может быть альтернативно выполнено с использованием программы Clustal W Thompson et al., (1994) Nucleic Acids Res 22, 4673-80). Используемые параметры могут быть следующими: параметры быстрого попарного выравнивания: размер K-кортежа (слова) - 1; размер окна - 5; штраф за открытие гэпа - 3; число верхних диагоналей - 5. Метод подсчета очков: x процентов. Параметры множественного выравнивания: штраф за открытие гэпа - 10; штраф за продолжение гэпа - 0,05. Весовая матрица: BLOSUM.

Как правило, вариант последовательности имеет менее 100, или менее 50, или менее 40, или менее 30, или менее 20 аминокислотных остатков, отличных от нативной

последовательности этого белка или его части. Более предпочтительно, вариант последовательности имеет 15, или 14, или 13, или 12, или 11, или 10, или 9, или 8, или 7, или 6, или 5, или 4, или 3, или 2, или только 1 аминокислотный остаток, отличающийся от нативной последовательности этого белка или его части.

Последовательность производного может быть изменена для усиления иммуногенности агента или может не влиять на его иммуногенность. Например, производное может иметь одну или несколько аминокислотных последовательностей, которые не являются необходимыми для удаления иммуногенности.

Понятно, что белковые компоненты могут быть выделены непосредственно из культур вируса. Однако удобно получать белки путем экспрессии подходящей конструкции ДНК, кодирующей белок, с использованием технологии рекомбинантных ДНК. Подходящие методики клонирования, манипуляции, модификации и экспрессии нуклеиновых кислот и очистки экспрессированных белков хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Sambrook (2001) «Molecular Cloning - A Laboratory Manual». Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Альтернативно, белки могут быть получены с использованием методов химии белка, например, с использованием частичного протеолиза выделенных белков (либо экзолитически, либо эндолитически), либо путем синтеза *de novo*. Пептиды могут быть синтезированы посредством Fmoc-полиамидного способа твердофазного пептидного синтеза, как раскрыто Lu et al (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 и ссылках в нем.

Понятно, что вакцина YFV может содержать агент для стимуляции или усиления стимуляции иммунной системы. Таким образом, вакцина может содержать адъювант. Однако также следует понимать, что сама вакцина YFV посредством репликации вируса и поглощения иммунной системой может служить в качестве адъюванта. Следовательно, вакцина YFV может содержать только вирус и носитель (например, физиологический раствор).

В предпочтительном варианте осуществления вакцина YFV содержит вирус желтой лихорадки, полученный из штамма Asibi, выделенного от человека по имени Asibi путем пассажа у макак-резус (Stokes, 1928, J Am Med Assoc 90: 253). Вирусные штаммы, полученные из штамма Asibi, изображены на фиг. 10, и поэтому следует понимать, что вакцина YFV может содержать любой из этих штаммов. В особо предпочтительном варианте осуществления вакцина YFV содержит вирусный штамм, полученный из штамма 17D. Предпочтительно вакцина YFV представляет собой живую аттенуированную вакцину, содержащую такой штамм.

Вакцина 17D была разработана в 1937 году и была получена путем 176 пассажей штамма Asibi в ткани куриного эмбриона. В настоящее время субстраты 17D, 17DD и 17D-204 используются для производства вакцин. На сегодняшний день ВОЗ провела предварительную квалификацию четырех вакцинных препаратов, все из которых имеются в продаже. Вакцины производятся Федеральным государственным унитарным предприятием Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова Российской Академии медицинских наук; Институтом Пастера, Дакар; АО Санофи Пастер; и Bio-Manguinhos/Fiocruz соответственно. Любая из этих коммерчески доступных вакцин может быть использована в настоящем изобретении. Подходящие вирусные штаммы YFV для использования в вакцинах включают:

1. Штамм Asibi желтой лихорадки (исходный изолят и предшественник всех 17D-генерированных вакцин) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY640589.1>
2. YFV 17DD (YF-VAX) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/70724977>
3. YFV 17D204 (Stamaril) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF769015.1>

В особо предпочтительном варианте осуществления вакцина YFV представляет собой Stamaril® (Sanofi Pasteur SA). Stamaril® содержит штамм вируса желтой лихорадки 17D-204 не менее 1000 МЕ. Порошок: лактоза, сорбитол E420L-гистидин, L-аланин, хлорид натрия, хлорид калия, динатрий фосфат, хлорид калия и кальция, сульфат магния; Жидкость: натрий хлорид, вода для инъекций.

Для использования в вакцинах полинуклеотидные агенты могут доставляться в различных реплицирующихся векторах (например, рекомбинантная аденовирусная вакцина) или нереплицирующихся векторах (ДНК вакцина).

Типичная доза вакцины, состоящей из рекомбинантного белка, составляет около 5-10 мкг. Типичная доза бактериальной вакцины составляет 10^8 колониеобразующих единиц на мл.

Как правило, вакцинная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или адъювант. Носители и адъюванты хорошо известны в данной области техники. Подходящие адъюванты включают полный или неполный адъювант Фрейнда, мурамилдипептид, «Iscom» (иммуностимулирующие комплексы) из EP 109942, EP 180564 и EP 231039, гидроксид алюминия, сапонин, ДЭАЭ-декстран, нейтральные масла (такие как миглиол), растительные масла (такие как арахисовое масло), липосомы, полиолы Pluronic® или адъювантную систему Рибби (см., например, GB-A-2 189 141).

Носители должны быть «приемлемыми» в смысле совместимости с агентом (агентами) по изобретению и не причинять вреда их реципиентам. Как правило,

носителями будут вода или физиологический раствор, которые будут стерильными и апирогенными.

Как правило, вакцина будет применяться посредством чрескожного, эпидермального, внутрикожного, подкожного, внутримышечного, внутривенного, интраперитонеального, интраназального, перорального, легочного ведения или других путей введения через слизистые оболочки, таких как, например, вагинальное или ректальное введение.

Вакцинная композиция может быть составлена для парентерального введения и может включать водные или неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворенные вещества, которые делают композицию изотонической с кровью предполагаемого реципиента; и/или водные или неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители.

Вакцинная композиция может быть представлена в однократных или многократных контейнерах, например, в герметичных ампулах и флаконах, и может храниться в лиофилизированном (сублимированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции, непосредственно перед использованием. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Вакцинная композиция может быть составлена для интраназального введения и может быть удобно доставлена в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера, насоса, спрея или распылителя с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, гидрофторалкана, такого как 1,1,2,2-тетрафторэтан (HFA 134A3) или 1,1,1,3,3,3,3-гептафторпропан (HFA 227EA3), диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением лекарственная форма может быть определена путем обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Емкость под давлением, насос, спрей или распылитель может содержать раствор или суспензию агента (агентов), например, с использованием смеси этанола и пропеллента в качестве растворителя, который может дополнительно содержать смазочное вещество, например, сорбитан триолеат.

Предпочтительно вакциной YFV является Stamaril®, который вводят в дозе 0,5 мл, содержащей по меньшей мере $4,74 \log_{10}$ бляшкообразующих единиц (БОЕ).

Действенность вакцины - это процент снижения заболеваемости в вакцинированной группе людей по сравнению с невакцинированной группой с

использованием наиболее благоприятных условий (Weinburg & Szilagyi, 2010, *Journal of Infectious Diseases* 201 (11): 1607-1610). Действенность вакцины показывает, насколько эффективно вакцина может быть предоставлена в идеальных условиях и при 100%-ном потреблении вакцины, тогда как эффективность вакцины показывает, насколько эффективна вакцина, когда она используется в обычных условиях в обществе. Данные о результатах (действенность вакцины) обычно выражают в виде пропорционального снижения частоты приступов заболевания (AR) между исследованиями без вакцинации (ARU) и с вакцинацией (ARV), и могут быть рассчитаны на основе относительного риска (RR) заболевания среди вакцинированной группы. с использованием следующей формулы: $VE = [(ARU - ARV) / ARU] \times 100$, где VE = действенность вакцины; ARU = частота поражения невакцинированных людей; и ARV = частота поражения вакцинированных людей. Вакцины никогда не защищают на 100%, хотя коммерческие вакцины против YFV близки к этому (обычно 99% от вакцинированных). Таким образом, в одном варианте осуществления вакцина YFV имеет VE по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98%, и наиболее предпочтительно вакцина YFV имеет VE по меньшей мере 99%.

В одном варианте осуществления вакцина YFV вакцинирует индивидуума против инфекции флавивирусом, где флавивирус является одним или несколькими вирусами, выбранными из группы, состоящей из вируса Зика; вируса клещевого энцефалита; вируса японского энцефалита; вируса лихорадки Западного Нила; вируса энцефалита Сент-Луис; и вируса омской геморрагической лихорадки. Особо предпочтительно флавивирус выбран из группы, состоящей из вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита и вируса Зика.

Вирус лихорадки Денге существует в виде четырех серотипов, DENV1-DENV4, и после первичной инфекции люди вырабатывают DENV-специфические антитела, которые связываются только с серотипом инфекции. Учитывая очевидное отсутствие перекрестной реактивности между серотипами DENV, влияние вакцины YFV на иммунитет против DENV неизвестно. Таким образом, в одном варианте осуществления флавивирус не является вирусом лихорадки Денге. Другими словами, в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ вакцинации против флавивирусной инфекции, включающий стадию введения индивидууму вакцинной композиции, содержащей вакцину YFV; где флавивирус не является YFV и где флавивирус не является вирусом лихорадки Денге. Аналогично, в одном варианте осуществления изобретение относится к вакцинной композиции, содержащей вакцину против YFV, для применения при вакцинации индивидуума против флавивирусной инфекции, где флавивирус не является

YFV и где флавивирус не является вирусом лихорадки Денге. Аналогично, в одном варианте осуществления изобретение относится к применению вакцинной композиции, содержащей вакцину YFV, для изготовления медикамента для вакцинации индивидуума против флавивирусной инфекции, где флавивирус не является YFV и где флавивирус не является вирусом лихорадки Денге.

Под «вакцинацией индивидуума против флавивирусной инфекции» мы подразумеваем, что у человека индуцируется защитный иммунитет против флавивируса. Например, вакцина может предотвратить и/или уменьшить последующее заражение флавивирусом у индивидуума. Вакцина может генерировать и/или повышать иммунитет индивидуума против флавивируса.

В одном варианте осуществления способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ против флавивируса определяют путем оценки наличия флавивируса у индивидуума после инфицирования флавивирусом. Если индуцируется защитный иммунный ответ, можно ожидать, что вирусная нагрузка флавивируса в любой момент времени после заражения будет меньше, чем вирусная нагрузка флавивируса при отсутствии индукции защитного иммунного ответа, вызванного вакциной YFV. Как правило, вирусная нагрузка будет снижена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%, и более типично по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с вирусной нагрузкой у человека, у которого вакцина YFV не вызывала защитного иммунного ответа (например, у человека, которому не вводили вакцину YFV). Методы измерения вирусной нагрузки хорошо известны в данной области техники, и включают как прямые, так и непрямые методы, как описано выше.

В другом варианте осуществления способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ против флавивируса определяют путем оценки одного или нескольких клинических симптомов флавивирусной инфекции у индивидуума после инфицирования этого индивидуума флавивирусом. Если вакцина YFV вызывает защитный иммунный ответ, можно ожидать, что один или несколько клинических симптомов будут в меньшем количестве и/или тяжести в любой момент времени после заражения, чем один или несколько клинических симптомов в случае, если YFV не вызывает защитного иммунной реакции. Также следует понимать, что если флавивирусная инфекция связана с другим расстройством и/или состоянием, способность вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ против флавивируса можно определить путем оценки наличия уменьшения вакциной YFV симптомов этого другого расстройства и/или состояния.

Методы диагностики инфекции, вызванной определенными флавивирусами, и

симптомов инфекций/ связанных с ними расстройств или состояний описаны ниже. Понятно, что эти методы могут быть использованы для оценки способности вакцины YFV индуцировать защитный иммунный ответ против флавивируса, как описано в настоящем документе.

Вирус Зика

Диагноз: ZIKV-специфические IgM-антитела могут быть обнаружены с помощью ИФА или иммунофлуоресцентного анализа в образцах сыворотки крови с 5-го дня после появления симптомов. Симптомы: вирус Зика обычно вызывает легкую инфекцию с симптомами, продолжающимися от нескольких дней до недели. Людям обычно не требуется госпитализация, и они очень редко умирают от инфекции вирусом Зика. По этой причине многие люди могут не осознавать, что они заражены. Симптомы для вируса Зика похожи на другие вирусы, распространяющиеся через укусы комаров, такие как лихорадка Денге и Чикунгунья. Многие люди, инфицированные вирусом Зика, не проявляют симптомов, или проявляют только легкие симптомы. Наиболее распространенными симптомами вируса Зика являются лихорадка, сыпь, боль в суставах, конъюнктивит (покраснение глаз), мышечные боли, головная боль.

Синдромы/ состояния, связанные с инфекцией: синдром Гийена-Барре. Врожденные дефекты: микроцефалия и врожденный синдром Зика.

Вирус клещевого энцефалита

Диагноз: На первой стадии заболевания наиболее распространенными лабораторными нарушениями являются низкий уровень лейкоцитов (лейкопения) и низкий уровень тромбоцитов (тромбоцитопения). Уровни ферментов печени в сыворотке также могут быть слегка повышены. После начала неврологического заболевания, называемого второй стадией, обычно наблюдается увеличение количества лейкоцитов в крови и спинномозговой жидкости (СМЖ). Вирус может быть выделен из крови во время первой стадии заболевания. Лабораторный диагноз обычно зависит от обнаружения специфических IgM или IgG в крови или СМЖ, обычно появляющихся позже, во время второй стадии заболевания.

Симптомы: Бессимптомная инфекция встречается у 60-70% инфицированных лиц. У инфицированных пациентов может проявляться клиническое заболевание, которое поражает центральную нервную систему с симптомами менингита (например, лихорадка, головная боль и ригидность затылочных мышц), энцефалита (например, сонливость, спутанность сознания, сенсорные нарушения и/или двигательные нарушения, такие как паралич) или менингоэнцефалита. Длительные (иногда пожизненные) симптомы возникают у более чем 30% госпитализированных пациентов.

Вирус японского энцефалита

Диагноз: Лабораторную диагностику JE обычно выполняют путем тестирования сыворотки или спинномозговой жидкости (СМЖ) для выявления вирус-специфических антител IgM. Антитела IgM к вирусу JE обычно выявляются через 3-8 дней после начала заболевания и сохраняются в течение 30-90 дней, но было задокументировано более продолжительное присутствие антител. Поэтому положительные IgM-антитела иногда могут отражать перенесенную инфекцию или вакцинацию.

Симптомы: у менее чем 1% людей, инфицированных вирусом японского энцефалита (JE), развивается клиническое заболевание. У людей, у которых развиваются симптомы, инкубационный период (время от заражения до болезни) обычно составляет 5-15 дней. Начальные симптомы часто включают лихорадку, головную боль и рвоту. Изменения психического статуса, неврологические симптомы, слабость и двигательные расстройства могут развиваться в течение следующих нескольких дней. Обычными симптомами являются судороги, особенно у детей.

Вирус лихорадки Западного Нила

Диагноз: Обычные клинические лабораторные исследования не отличают инфекцию WNV от многих других вирусных инфекций. Пациенты с нейроинвазивным заболеванием обычно имеют лимфоцитарный плеоцитоз в спинномозговой жидкости (СМЖ), но нейтрофилы могут преобладать на ранних стадиях заболевания. Обнаружение WNV-специфического иммуноглобулина (IgM) в сыворотке или СМЖ является убедительным доказательством недавней инфекции WNV. У большинства пациентов IgM антитела против ВЗН обычно выявляются через 8 дней после начала заболевания; однако, у пациентов с нейроинвазивным заболеванием WNV специфический IgM почти всегда обнаруживается в сыворотке и СМЖ к моменту появления симптомов.

Симптомы: примерно у 80% людей инфекция протекает бессимптомно. Из тех людей, у которых развиваются симптомы, у большинства отмечается самокупирующаяся лихорадка Западного Нила (WNF), характеризующаяся острым началом лихорадки, головной боли, утомляемости, недомогания, мышечной боли и слабости; иногда отмечаются желудочно-кишечные симптомы и временная макулезная сыпь на туловище и конечностях. Нейроинвазивное заболевание развивается у <1% WNV-инфицированных людей, например, в таких формах, как менингит, энцефалит или паралич (доля зарегистрированных случаев, которые являются нейроинвазивными, выше, потому что нейроинвазивное заболевание чаще регистрируется, чем WNF или бессимптомные инфекции). Риск энцефалита увеличивается с возрастом.

Вирус энцефалита Сент-Луис

Диагноз: Болезнь SLEV может быть установлена путем выявления SLEV-специфических антител IgM в сыворотке или СМЖ. Положительный результат теста SLEV IgM должен быть подтвержден с помощью анализа нейтрализующих антител в образцах сыворотки во время острой фазы и фазы выздоровления в государственной лаборатории общественного здравоохранения или Центре контроля и профилактики заболеваний.

Симптомы: Менее 1% инфекций, вызванных вирусом энцефалита Сент-Луис (SLEV), являются клинически выраженными, а подавляющее большинство инфекций остается невыявленным. Инкубационный период для заболевания SLEV (время от укуса инфицированного комара до начала заболевания) составляет от 5 до 15 дней. Начало болезни обычно внезапное, с лихорадкой, головной болью, головокружением, тошнотой и недомоганием. Признаки и симптомы усиливаются в течение периода от нескольких дней до недели. Некоторые пациенты спонтанно выздоравливают после этого периода; у других развиваются признаки инфекций центральной нервной системы, включая ригидность затылочных мышц, спутанность сознания, дезориентацию, головокружение, тремор и неустойчивость. Кома может развиваться в тяжелых случаях. Болезнь обычно протекает у детей слабее, чем у пожилых людей. Приблизительно у 40% детей и молодых людей с болезнью SLEV развивается только лихорадка и головная боль или асептический менингит; у почти 90% пожилых людей с болезнью SLEV развивается энцефалит. Общий коэффициент летальности составляет от 5 до 15%. Риск смертельных заболеваний также увеличивается с возрастом. В случаях острого нейроинвазивного заболевания SLEV исследование спинномозговой жидкости (СМЖ) показывает умеренный (обычно лимфоцитарный) плеоцитоз. Белок СМЖ повышен примерно в 1/2 – 2/3 случаев. Компьютерная томография (КТ) мозга обычно нормальна; результаты электроэнцефалографии (ЭЭГ) часто показывают генерализованное замедление без очаговой активности.

Вирус омской геморрагической лихорадки

Диагноз: серология, IgM IgG

Симптомы: после инкубационного периода 3-8 дней симптомы ОНГ начинаются внезапно с озноба, лихорадки, головной боли и сильных мышечных болей с рвотой, желудочно-кишечными симптомами и проблемами с кровотечением, возникающими через 3-4 дня после появления первых симптомов. Пациенты могут испытывать аномально низкое кровяное давление и низкий уровень тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов. Через 2 недели некоторые пациенты могут выздороветь, а другие - нет. Они могут

испытывать очаговое кровоизлияние в слизистую оболочку десен, матки и легких, а также иногда неврологические симптомы. Если через 3 недели у пациента все еще наблюдается ОНФ, возникает вторая волна симптомов. Это также включает признаки энцефалита. В большинстве случаев, если болезнь не проходит после этого периода, пациент умирает. Пациенты, которые выздоравливают от ОНФ, могут испытывать потерю слуха, потерю волос, а также поведенческие или психологические нарушения, связанные с неврологическими расстройствами.

Понятно, что вакцинация индивидуума вакциной YFV может генерировать и/или повышать иммунитет индивидуума против флавивируса. Иммунитет может быть врожденным и/или адаптивным иммунитетом. Иммунитет может быть клеточным и/или гуморальным иммунитетом.

В одном варианте осуществления вакцинация индивидуума вакциной YFV создает и/или повышает клеточный иммунитет против флавивируса, который включает активность Т-клеток у индивидуума против флавивируса. Например, вакцина может генерировать новые Т-клетки и/или увеличивать уровень Т-клеток, которые распознают YFV и которые перекрестно реактивны по отношению к другому флавивирусу. Таким образом, следует понимать, что вакцинная композиция для применения в соответствии с первым аспектом изобретения может генерировать и/или увеличивать количество перекрестно-реактивных Т-клеток, то есть Т-клеток, которые распознают YFV, но которые также распознают другой флавивирус, который не является YFV. В тех случаях, когда вакцина YFV повышает клеточный иммунитет против флавивируса, который включает активность Т-клеток у индивидуума против флавивируса, клеточный иммунитет обычно повышается по меньшей мере в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 или в 10 раз.

Т-клетки покидают тимус как незрелые, наивные Т-клетки. Привлечение и связывание комплекса CD3/TCR с нагруженной пептидом молекулой МНС (в данном случае полученного из вакцины пептида) активирует наивную Т-клетку, но эффективная активация требует совместной стимуляции через выделенные ко-стимуляторные рецепторы. Если Т-клетка не получает второй ко-стимулирующий сигнал, она подвергается апоптозу. Эта активация или прайминг, который осуществляется посредством взаимодействия с профессиональной антигенпрезентирующей клеткой (APC), позволяет Т-клетке созреть, делиться и дифференцироваться в эффекторные клетки и клетки памяти. Типичным ко-рецептором, обнаруженным на поверхности Т-клетки, является CD28, который связывается с CD80 или CD86 на APC, чтобы инициировать активацию. Когда CD8 Т-клетка активируется, она пролиферирует, и эта клональная экспансия поддерживается фактором роста Т-клеток IL-2. Т-клетка

дифференцируется в подгруппы эффекторных клеток, многие из которых попадают в кровь и мигрируют в места инфекции. После удаления патогена популяция эффекторных Т-клеток сокращается, и большинство патоген-специфических Т-клеток вступают в апоптоз. Небольшой пул патоген-специфических Т-клеток (5-10%), однако, выживает как клетки памяти. Пул клеток памяти поддерживается цитокинзависимым образом, главным образом, посредством действия IL-7 и IL-15, чтобы способствовать выживанию Т-клеток памяти, независимо от специфического антигена. При повторном воздействии патогена клетки памяти быстро размножаются до большого количества эффекторных Т-клеток. Подмножества Т-клеток памяти первоначально определяются способностью опосредовать немедленные эффекторные функции и способностью клетки мигрировать во вторичные лимфоидные органы.

Т-клеточная активность, генерируемая у индивидуума, может включать генерацию любых из CD4, CD8, Treg-клеток, NK-клеток, MAIT Т-клеток или других положительных по Т-клеточному рецептору Т-клеток (например, Т-клеток с большими врожденными иммунными функциями), которые распознают YFV и которые являются перекрестно реактивными по отношению к другому флавивирусу. Измерение популяций Т-клеток является стандартной практикой в данной области техники и обычно включает проточную цитометрию, например, с использованием маркеров, которые экспрессируются в определенных субпопуляциях Т-клеток.

В одном варианте осуществления введение вакцин против YFV генерирует и/или повышает уровень CD8 Т-клеток, которые распознают эпитоп ETACLSKAY (SEQ ID NO: 1) у HLA-A1-позитивных индивидуумов. ETACLSKAY (SEQ ID NO: 1) представляет собой эпитоп в белке NS5 YFV, который также находится в белке NS5 TBEV.

Ожидается, что другие перекрестно-реактивные Т-клетки, которые генерируются и/или увеличиваются после вакцинации против YFV, будут направлены на пептиды, которые являются общими (или очень похожими) среди различных белков флавивируса (например, белков NS5 или NS3). Например, Т-клетки могут связываться с неструктурным белком флавивируса, таким как NS5 или NS3. Прогнозируемые Т-клеточные эпитопы для вируса Зика и вируса TBE перечислены в таблицах 2 и 3 в приведенных ниже примерах, и поэтому в одном варианте осуществления Т-клетки могут связываться с любым из эпитопов, перечисленных в таблицах 2 и 3 (а именно ETACLAKSY (SEQ ID NO: 1), RTWAYHGSY (SEQ ID NO: 2), ALNTFTNLV (SEQ ID NO: 3), YMWLGARFL (SEQ ID NO: 4), RTTWSIHGK (SEQ ID NO: 5), CVYNMMGKR (SEQ ID NO: 6), GLVRVPLSR (SEQ ID NO: 7), YTYQNKWK (SEQ ID NO: 8), NMMGKREKK (SEQ ID NO: 9), GLGLQRLGY (SEQ ID NO: 10), VPCRHQDEL (SEQ ID NO: 11), GLQRLGYVL (SEQ

ID NO: 12), WLGARFLEF (SEQ ID NO: 13), LLYFHRRDL (SEQ ID NO: 14), SGQWTYAL (SEQ ID NO: 15), STLNGGLFY (SEQ ID NO: 16), ETACLSKAY (SEQ ID NO: 17), GVEGISLNY (SEQ ID NO: 18), VMEWRDVPY (SEQ ID NO: 19), VLAPYRPEV (SEQ ID NO: 20), YMWLGSRFL (SEQ ID NO: 21), MLVSGDDCV (SEQ ID NO: 22), YALNTLTNI (SEQ ID NO: 23), TLTNIKVQL (SEQ ID NO: 24), CVYNMMGKR (SEQ ID NO: 25), KLGEFGVAK (SEQ ID NO: 26), AKVKSNAAL (SEQ ID NO: 27), WTYALNTL (SEQ ID NO: 28), IAKVKSNAAL (SEQ ID NO: 29), SGQWTYAL (SEQ ID NO: 30)).

Перекрестная реактивность популяции Т-клеток может быть измерена с использованием обычного анализа стимуляции Т-клеток, который хорошо известен в данной области техники и описан в примерах. Такие анализы обычно выполняют *ex vivo*, когда пробы крови берут у доноров и обрабатывают таким образом, что первичные культуры клеток крови используются непосредственно в таких анализах. Способы широко включают либо инкубацию пептидных или белковых образцов со смесью APC и Т-клеток до измерения ответов Т-клеток, либо инкубацию пептидных или белковых образцов с APC и затем добавление Т-клеток до измерения ответов Т-клеток. В обоих типах анализа можно использовать несколько образцов крови по отдельности для параллельного тестирования каждого отдельного пептидного или белкового образца, и ответы Т-клеток затем измеряют обычно в один момент времени. Таким образом, является ли конкретная популяция Т-клеток перекрестно-реактивной по отношению к другому флавивирусу, можно оценить путем стимуляции этой популяции Т-клеток пептидным или белковым образцом, полученным из этого другого флавивируса (например, белком NS5), и измерения ответа. Если пептид или белковый образец генерирует ответ, то популяция Т-клеток перекрестно реагирует на этот флавивирус. Ответы Т-клеток обычно измеряют либо путем включения радиоактивной метки, такой как тритированный тимидин (3HTdR), в пролиферирующие Т-клетки («пролиферация Т-клеток»), либо путем высвобождения цитокинов, таких как IFN- γ , TNF и/или IL-2 из активированных Т-клеток («высвобождение цитокинов»). Также следует понимать, что мультимеры МНС класса I (например, тетрамеры, пентамеры или декстрамеры) могут быть использованы для обнаружения перекрестно-реактивных Т-клеток (Wooldridge et al, 2009, Immunology, 126(2): 147-64). Могут быть использованы методы, описанные в Blom et al, 2013 (J Immunol 190: 2150).

В одном варианте осуществления вакцинация индивидуума вакциной YFV создает и/или повышает адаптивный иммунитет против флавивируса, который включает активность В-клеток и/или активность антител у индивидуума против флавивируса.

Например, вакцина может генерировать новые В-клетки и/или увеличивать

количество В-клеток, которые распознают YFV и которые перекрестно реагируют с другим флавивирусом. Конкретные типы В-клеток, которые могут генерироваться и/или увеличиваться с помощью вакцины, более подробно описаны ниже.

В тех случаях, когда вакцина YFV повышает адаптивный иммунитет против флавивируса, который включает активность В-клеток и/или активность антител у индивидуума против флавивируса, активность В-клеток и/или активность антител обычно увеличивается по меньшей мере в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза 5 или 10 раз.

Различные компартменты В-клеток могут быть идентифицированы в соответствии с их фенотипом, и несколько подгрупп В-клеток циркулируют в крови во время острой фазы инфекции. Наивные В-клетки, В-клетки памяти и плазматические клетки (РС) могут быть фенотипированы путем окрашивания поверхностными маркерами с последующей проточной цитометрией. Во время первичной инфекции наивные В-клетки стимулируются и превращаются в антиген-специфические В-клетки. Эти В-клетки либо дифференцируются в В-клетки памяти, которые находятся во вторичных лимфоидных органах, либо в РС, которые секретируют антигенспецифические антитела. До дифференцировки в РС В-клетки подвергаются нескольким циклам пролиферации, и дифференцируются в промежуточное состояние, называемое плазмобластами (РВ). Короткоживущие РС активны во время острой инфекции, в то время как долгоживущие РС (LLPC) мигрируют в костный мозг и отвечают за длительный гуморальный иммунитет. В-клетки памяти, которые сохраняют антиген-специфичные антитела на своей поверхности, подвергаются созреванию аффинности, и только клоны, несущие антитела с наибольшей аффинностью, выживают в течение длительного времени. В-клетки памяти - это клетки, участвующие в ответе на антиген-приманку, и они быстро активируются во время вторичной инфекции.

Таким образом, вакцина может генерировать и/или увеличивать количество наивных В-клеток, В-клеток памяти, плазматических клеток и/или плазмобластов, которые распознают YFV и которые перекрестно реактивны по отношению к другому флавивирусу. В-клетки могут связываться с неструктурным белком флавивируса, таким как NS5 или NS3.

В одном варианте осуществления В-клетки, генерируемые и/или увеличивающиеся посредством вакцины YFV, связываются с любым из эпитопов ALNTLTNIKVQLI MME (SEQ ID NO: 31); ALNTLTNIKVQLIRMMEG (SEQ ID NO: 32); GKALYFLNDMAKTRKDIG (SEQ ID NO: 33); или WSIHASGAWMTTEDMLDV (SEQ ID NO: 34). Эти эпитопы обнаружены в белке NS5 TBEV (Kuivanen S, Hepojoki J, Vene S, Vaheri A, Vapalahti O. «Identification of linear human B-cell epitopes of tick-borne encephalitis

virus». Virol J 2014; 11: 115).

В другом варианте осуществления В-клетки, генерируемые и/или повышающиеся посредством вакцины YFV, связываются с эпитопом PWLAWHVAANVSSVTDRS (SEQ ID NO: 35). Этот эпитоп обнаружен в белке NS3 TBEV.

Перекрестную реактивность популяции В-клеток можно измерить с использованием обычного анализа стимуляции В-клеток, который хорошо известен в данной области техники и описан в примерах. Такие анализы обычно выполняют *ex vivo*, когда пробы крови берут у доноров и обрабатывают таким образом, что первичные культуры клеток крови используются непосредственно в таких анализах. Способы широко включают инкубацию пептидных или белковых образцов с В-клетками и измерение ответа В-клеток. Таким образом, является ли конкретная популяция В-клеток перекрестно-реактивной по отношению к другому флавивирусу, можно оценить путем стимуляции этой популяции В-клеток пептидным или белковым образцом, полученным из этого другого флавивируса, и измерения ответа. Если пептидный или белковый образец вызывает ответ, тогда популяция В-клеток перекрестно реактивна к этому флавивирусу. Ответы В-клеток обычно измеряют путем включения радиоактивной метки, такой как меченный тритием тимидин (3HTdR), в пролиферирующие В-клетки («пролиферация В-клеток») или путем увеличения внутриклеточной экспрессии маркера пролиферации Ki67. Можно использовать проточную цитометрию, как показано в примерах.

Вакцина может генерировать антитела, которые связываются с YFV, но которые также связываются (то есть перекрестно реагируют) с другим флавивирусом. Обычно антитела включают антитела класса IgG и/или IgM. Перекрестно-реактивные антитела могут быть обнаружены стандартными способами, известными в данной области техники, включая метод иммуноферментных пятен (ELISPOT) (например, для определения IgM или IgG) (Czerkinsky C, Nilsson L, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A (1983). «A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells». J Immunol Methods. 65 (1-2): 109-121) и реакцию подавления бляшкообразования (PRNT) (Schmidt, N J; J Dennis; E H Lennette (1976-07). «Plaque reduction neutralization test for human cytomegalovirus based upon enhanced uptake of neutral red by virus-infected cells». Journal of Clinical Microbiology. 4 (1): 61-66) и Vene S, Haglund M, Vapalahti O, Lundkvist A. «A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis virus». J Virol Methods 1998; 73(1): 71-5) (см. также Пример 1). Можно также использовать ИФА (см. также Jolles S, Sewell WA, Misbah SA. «Clinical uses of intravenous immunoglobulin». Clin Exp Immunol 2005; 142 (1): 1-11).

Базовая схема анализа PRNT обеспечивает взаимодействие вируса и антитела в

пробирке или на планшете для микротитрования, а затем измеряет влияние антител на вирусную инфекционность путем нанесения смеси на чувствительные к вирусу клетки. Клетки покрыты полутвердой средой, которая ограничивает распространение потомства вируса. Каждый вирус, который вызывает продуктивную инфекцию, производит локализованную область инфекции (бляшку), которая может быть обнаружена различными способами. Бляшки подсчитывают и сравнивают с начальной концентрацией вируса, чтобы определить процент снижения общей инфекционности вируса. В анализе PRNT исследуемый образец сыворотки обычно подвергают серийным разведениям перед смешиванием со стандартизованным количеством вируса. Концентрацию вируса поддерживают постоянной, так что при добавлении к чувствительным клеткам и нанесении полутвердой среды отдельные бляшки могут быть обнаружены и подсчитаны. Таким образом, титры конечной точки PRNT могут быть рассчитаны для каждого образца сыворотки при любом выбранном процентном снижении активности вируса. Например, уменьшение количества бляшек на 50% (PRNT_{50}) можно использовать в качестве конечной точки нейтрализации. Это дает значение PRNT_{50} . Подсчитывают бляшки, генерируемые тестируемыми сыворотками при различных разведениях и контрольных препаратах. Процент бляшек, подсчитанных в тестовых сыворотках, сравнивают с количеством бляшек для контрольного препарата. Обратная величина наименьшего разбавления тестируемой сыворотки для нейтрализации 50% введенного контрольного вируса представляет собой титр PRNT_{50} . Таким образом, титр PRNT_{50} рассчитывают путем подсчета бляшек и регистрации титра как обратной величины последнего разведения сыворотки, чтобы показать уменьшение количества контрольных бляшек на 50% по данным обратного титрования контрольных бляшек (Cutchins et al. (J. Immunol. 1960 Sep; 85: 275-83). Следует понимать, что могут быть использованы другие конечные точки нейтрализации (например, PRNT_{80} или PRNT_{90} , что соответствует уменьшению количества бляшек на 80% или 90% соответственно).

Как правило, вакцина YFV индуцирует иммунную систему человека к выработке антител, которые специфически связываются с YFV и другим флавивирусом. Первичными мишенями антител являются Е-белок и NS1. Предпочтительно полученное таким образом антитело специфически связывает YFV и другой флавивирус (например, его Е-белок или белок NS1) с большей аффинностью, чем к любой другой молекуле (например, любой молекуле, не являющейся производным флавивируса), у индивидуума, такой как по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 50 раз более высокая аффинность, чем к любой другой молекуле (например, любой молекуле, полученной не из флавивируса) у индивидуума. Более

предпочтительно, антитело связывает YFV и другой флавивирус (например, его Е-белок или белок NS1) с по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 1000 раз, или по меньшей мере в 10000 раз большей аффинностью, чем к любой другой молекуле (например, любой не флавивирусной молекуле) у индивидуума. Методы обнаружения антител хорошо известны в данной области, и можно использовать любую подходящую методику, такую как ELISA.

Не желая углубляться в какую-либо теорию, авторы изобретения полагают, что вакцина YFV будет вакцинировать человека против инфекции флавивирусом независимо от того, был ли человек ранее инфицирован этим флавивирусом и/или вакцинирован против этого флавивируса. Например, ранее инфицированные или вакцинированные индивидуумы могут получить стимулирующий эффект с помощью перекрестно-реактивных YFV-специфических Т-клеток. Предварительная инфекция и/или вакцинация против других флавивирусов может повысить защиту к другому флавивирусу. Следовательно, в одном варианте осуществления индивидуум ранее был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса. Конечно, если индивидуум ранее не был инфицирован или вакцинирован против флавивируса, можно ожидать, что полученные перекрестно реактивные YFV-специфические Т-клетки дадут первый иммунитет против флавивируса у индивидуума. Таким образом, в альтернативном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса.

Был или не был индивидуум ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, можно определить стандартными способами, известными в данной области техники, такими как любой серологический анализ, который обнаруживает антитела, например, специфические антитела к флавивирусу.

Не желая углубляться в какую-либо теорию, авторы изобретения полагают, что вакцина YFV будет вакцинировать человека против инфекции флавивирусом, независимо от того, был ли человек ранее инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV. Таким образом, в одном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован вакциной YFV, тогда как в альтернативном варианте индивидуум ранее был инфицирован YFV и/или вакцинирован вакциной YFV. Ожидается, что индивидуумы, которые ранее были инфицированы YFV и/или вакцинированы против YFV, получают выгоду от повышенного иммунитета против флавивируса после получения YFV. Ожидается, что иммунная система получит стимул благодаря ответным реакциям, вызванным вакциной YFV.

Был или не был индивидуум ранее инфицирован YFV и/или вакцинирован против

YFV, можно определить стандартными способами, известными в данной области техники, такими как любой серологический анализ, который выявляет антитела, например, специфические антитела к YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум был ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, но ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, и ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум был ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса и ранее был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, и ранее был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

Предпочтительно, если индивидуум находится в интактном состоянии по отношению к YFV, то есть индивидуум ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV. Не желая углубляться в какую-либо теорию, если у индивидуума имеется настоящая инфекция YFV, иммунная система может напрямую убить вакцину, и адьювантный эффект будет уменьшен или потерян. Однако перекрестно-реактивные Т-клетки и антитела получать стимул, индуцируя тем самым защиту. Таким образом, защитный механизм может отличаться по сравнению с интактными по отношению к YFV индивидуумами.

В предпочтительном варианте осуществления индивидуум ранее был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, но ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В предпочтительном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, и ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

Как объяснено выше, действенность вакцины - это процент снижения заболеваемости у вакцинированной группы людей по сравнению с невакцинированной группой, при использовании наиболее благоприятных условий. Авторы изобретения обнаружили, что вакцина YFV обеспечивает иммунитет у индивидуума против флавивируса, где этот флавивирус не является YFV. Как правило, вакцина YFV имеет действенность при обеспечении иммунитета против этого другого флавивируса по

меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. Предпочтительно, если вакцина YFV имеет действенность по меньшей мере 85%. Понятно, что точное значение будет зависеть от факторов хозяина (например, генетики хозяина и иммунного статуса хозяина), дозы инфекции и, вероятно, многих других факторов), хотя обычно значение действенности в обеспечении иммунитета против этого другого флавивируса будет выше 50%. Для измерения действенности вакцины можно использовать любую из методик, описанных выше, для оценки уровня иммунитета к данному флавивирусу, включая серологию (например, измерение перекрестно-реактивных антител IgG с помощью ELISA) или путем измерения перекрестно-нейтрализующих антител с использованием PRNT.

В одном варианте осуществления иммунитет против флавивируса, который обеспечивается вакциной YFV (например, предотвращение и/или уменьшение последующего инфицирования флавивирусом, или предупреждение и/или уменьшение одного или нескольких расстройств и/или состояний, связанных с заражением флавивирусом) длится до 1 года или 5 лет, или 10 лет. Удобно, чтобы это было измерено путем оценки концентрации перекрестно-реактивных антител против флавивируса у индивидуума с использованием способов, известных в данной области техники и описанных выше. Измерение будет измерением концентрации антител без заражения флавивирусом. Например, можно измерить уровни IgG с помощью ИФА и нейтрализующих антител с помощью PRNT. Как правило, это осуществляют путем взятия образца у индивидуума в определенный момент времени и сравнения уровней перекрестно-реактивных антител против флавивируса с уровнями в положительном и/или отрицательном контроле. Положительными контролями могут быть индивидуумы, вакцинированные и/или ранее инфицированные YFV или TBE. Отрицательным контролем могут быть индивидуумы, которые не были вакцинированы и/или ранее инфицированы YFV или TBE. Поддерживаемый иммунитет может рассматриваться как наличие нейтрализующих антител, которые уменьшают количество бляшек в анализе PRNT по сравнению с отрицательным контролем, или сохраняющиеся титры IgG, которые сопоставимы с уровнями IgG в положительных контролях.

Как более подробно описано в примерах, следует понимать, что количество бляшек в анализе PRNT можно использовать в качестве индикатора концентрации нейтрализующего антитела в образце сыворотки. Чем выше титр нейтрализующего антитела, тем больше уменьшение количества бляшек по сравнению с отрицательным контролем (например, один вирус без образца сыворотки). Предпочтительно, титр нейтрализующего антитела, который указывает на иммунитет против флавивируса,

обеспечиваемого вакциной YFV, представляет собой титр, который дает по меньшей мере 80% уменьшение количества бляшек по сравнению с отрицательным контролем, такое как по меньшей мере 85%, или 90%, или 95%, или 99%, или 100%. В одном варианте осуществления титр нейтрализующего антитела, который указывает на иммунитет против флавивируса, обеспечиваемого вакциной YFV, представляет собой титр, который дает значение PRNT₉₀ 5 или более.

В одном варианте осуществления уменьшение последующей инфекции флавивирусом и/или уменьшение одного или нескольких расстройств и/или состояний, связанных с инфекцией флавивирусом, которое обеспечивается вакциной YFV, представляет собой снижение на 100%, или на 90%, или на 80%, или на 70%, или на 60%, или на 50%.

Ожидается, что после вакцинации индивидуума вакциной YFV вирусная нагрузка флавивируса, отличного от YFV, в любой момент времени после инфицирования (другим флавивирусом) будет меньше, чем вирусная нагрузка YFV, если защитный иммунный ответ не был индуцирован. Как правило, вирусная нагрузка будет снижена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% и более типично по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% по сравнению с вирусной нагрузкой у индивидуума, которому не вводили YFV вакцину. Методы измерения вирусной нагрузки хорошо известны в данной области техники и включают методы, описанные выше. Вирусная нагрузка может быть уменьшена из-за увеличения вирусного клиренса и/или уменьшения вирусной пролиферации (например, в результате нейтрализации свободного вируса перекрестно-реактивными антителами и/или вирус-инфицированных клеток, убиваемых перекрестно-реактивными Т-клетками).

Второй аспект изобретения относится к вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции, вызванной флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки. Таким образом, следует понимать, что вакцинная композиция содержит как вакцину против YFV, так и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса.

Аналогичным образом, изобретение включает применение вакцинной композиции, включающей вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, в производстве медикамента для вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

Аналогичным образом, изобретение включает способ вакцинации индивидуума

против инфекции флавивирусом, включающий стадию введения индивидууму вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

Третий аспект изобретения относится к вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки, для применения при вакцинации индивидуума от инфекции флавивирусом; где применение включает введение индивидууму вакцины против вируса желтой лихорадки и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса; и где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки. Понятно, что в этом аспекте изобретения вакцина YFV и одна или несколько дополнительных вакцин против флавивируса не обязательно должны быть частью одной и той же вакцинной композиции, но могут вводиться отдельно, как дополнительно обсуждается ниже.

Аналогичным образом, изобретение включает применение вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки, в производстве медикамента для вакцинации человека против инфекции флавивирусом; где применение включает введение индивидууму вакцины против вируса желтой лихорадки и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса; и где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

Аналогичным образом, изобретение включает способ вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом, включающий стадии введения индивидууму вакцины против вируса желтой лихорадки и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

Предпочтения для вакцины против YFV, а также пути и способы введения включают те, которые описаны выше в отношении первого аспекта изобретения. Особо предпочтительно вакциной YFV является Stamaril® или YF-VAX®.

В одном варианте осуществления третьего аспекта изобретения вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят индивидууму по существу одновременно.

В альтернативном варианте осуществления третьего аспекта изобретения вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят индивидууму последовательно. Таким образом, индивидуумом может быть тот, кому уже вводили вакцину против YFV, и индивидууму впоследствии вводят одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса. Альтернативно, индивидуумом может быть тот, кому уже вводили одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, и вакцину YFV впоследствии вводят индивидууму.

Таким образом, изобретение включает вакцинную композицию, содержащую вакцину против YFV для применения при вакцинации индивидуума против флавивируса, где индивидуумом является тот, кому вводят одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, и где флавивирус не является YFV. Одна или несколько дополнительных вакцин против флавивируса могут быть применены до введения, одновременно или после введения вакцины против YFV.

Таким образом, изобретение включает применение вакцины против YFV при производстве медикамента для вакцинации индивидуума против флавивируса, где индивидуумом является тот, кому вводят одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, и где флавивирус не является YFV. Одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса можно вводить до, одновременно или после вакцины против YFV.

Изобретение также включает одну или несколько вакцин против флавивируса для применения при вакцинации индивидуума против флавивируса, где индивидуумом является тот, кому вводят вакцину против YFV, и где флавивирус не является YFV. Вакцину YFV можно вводить до, одновременно или после одной или нескольких вакцин против флавивируса.

Изобретение также включает применение одной или нескольких вакцин против флавивируса для изготовления медикамента для вакцинации индивидуума против флавивируса, где индивидуумом является тот, кому вводят вакцину против YFV, и где флавивирус не является YFV. Вакцину YFV можно вводить до, одновременно или после одной или нескольких вакцин против флавивируса.

Если вакцину YFV и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят не одновременно, их вводят с интервалом не менее 1 дня, например, с интервалом не менее 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней. Вирусная нагрузка достигает пика через 7 дней после введения с обычно используемыми вакцинами против YFV, и, таким образом, в одном варианте осуществления вакцину против YFV и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят с интервалом 7 дней, с интервалом по меньшей мере 7 дней или с интервалом не более 7 дней. Обычно вакцину против YFV и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят с интервалом не более 14 дней, например, с интервалом не более 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 дней.

В одном варианте осуществления вакцину против YFV вводят за 7-14 дней до введения одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса, например, за 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней до этого.

В другом варианте осуществления одну или несколько дополнительных вакцин

против флавивируса вводят за 7-14 дней до вакцины против YFV, например, за 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней.

Понятно, что вакцину YFV и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса можно вводить одновременно, например, одним и тем же путем введения, или что можно вводить вакцину YFV и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса последовательно, например, отдельными путями введения. Подходящие способы и пути введения вакцин включают те, которые описаны выше в отношении первого аспекта изобретения. Как правило, вакцины вводят подкожно или внутримышечно, например, в плечо.

Под вакциной против флавивируса мы подразумеваем иммуноген, который при введении индивидууму (например, тому, у кого нет иммунодефицита или иммуносупрессии) способен вызывать защитный иммунный ответ против флавивируса у индивидуума. Таким образом, вакцина может представлять собой вакцину, защищающую от инфицирования (например, последующего или более позднего инфицирования) самим флавивирусом, например, путем либо полного предотвращения инфекции, либо снижения воздействия этой инфекции путем уменьшения одного или нескольких симптомов заболевания, которые иначе проявляются, если вакцина не была введена индивидууму.

Способна ли вакцина индуцировать защитный иммунный ответ, может быть определено любым подходящим способом в данной области техники, включая те, которые описаны выше в отношении первого аспекта изобретения. Например, это может быть определено путем оценки наличия флавивируса у индивидуума после заражения флавивирусом (например, путем оценки вирусной нагрузки). Это может быть определено путем оценки одного или нескольких клинических симптомов флавивирусной инфекции у индивидуума после инфицирования этого индивидуума флавивирусом. Симптомы ряда флавивирусных инфекций приведены выше. Это также можно определить путем выявления одного или нескольких показателей иммунного ответа непосредственно у индивидуума после заражения индивидуума флавивирусом (например, наличия антител, которые специфически связываются с флавивирусом, Т-клеток, специфичных для флавивируса, и В-клеток, специфичных для флавивируса). Понятно, что любой из способов, описанных выше в отношении определения того, способна ли вакцина YFV индуцировать защитный иммунный ответ против YFV, также применим для определения того, способна ли вакцина против флавивируса индуцировать защитный иммунный ответ против флавивируса.

Обычно вакцина против флавивируса представляет собой инактивированную или аттенуированную вакцину, такую как живая аттенуированная вакцина.

В варианте осуществления второго и третьего аспектов изобретения вакцина против флавивируса содержит один или несколько иммуногенов, которые соответствуют одному или нескольким белковым компонентам флавивируса. Понятно, что вакцина может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный белковый компонент или его часть. Подходящие белковые компоненты и их части, варианты и производные включают те, которые описаны выше в отношении первого аспекта изобретения. Вакцина предпочтительно включает по меньшей мере белок NS5 конкретного флавивируса.

Под одной или несколькими вакцинами против флавивируса мы подразумеваем по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более вакцин против флавивируса.

При использовании двух или более вакцин против флавивируса следует понимать, что две или более вакцин против флавивируса могут представлять собой две или более вакцины против одного и того же флавивируса или против разных флавивирусов. Таким образом, две или более вакцин против флавивируса могут включать две или более вакцин против разных флавивирусов соответственно, например, 3 или более разных флавивирусов, 4 или более разных флавивирусов и так далее.

В дополнительном варианте осуществления одну или несколько дополнительных вакцин выбирают из группы, состоящей из вакцины против вируса Зика, вакцины против вируса клещевого энцефалита, вакцины против вируса японского энцефалита, вакцины против вируса лихорадки Западного Нила, вакцины против вируса энцефалита Сент-Луис, вакцины против омской геморрагической лихорадки. Предпочтительно одна или несколько дополнительных вакцин выбраны из TBEV, JEV и вирус Зика.

Штаммы флавивируса, которые могут присутствовать в вакцине, включают перечисленные ниже.

1. TBEV Neudorfl (TBEV Eu, FSME и штаммы на основе encephur)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P14336.4>
2. TBEV Sojifin (TBEV Дальневосточный)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/130520>
3. TBEV Fe-205 (вакцина TBEV EnceVir)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/116109053>
4. TBEV Senzhang (Чанчуньский институт биологических продуктов, CIBP)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY182009.1>
5. JEV Nakayama
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF571853.1>
6. JEV SA-14-14-2 (штамм IXIARO + CD. JEVAX)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA46248.1>

7. ZIKV Полинезийский штамм 2013

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/631250743>

Подходящие вакцины против вируса ТВЕ перечислены ниже:

Енсериг для детей: одна доза (0,25 мл) содержит: 0,75 мкг инаktivированного вируса ТВЕ (клещевого энцефалита), штамм K23*, адсорбированного на гидроксиде алюминия (гидрированном) (0,15-0,20 мг Al³⁺), триметамол, сахарозу, хлорид натрия, воду для инъекций.

Енсериг для взрослых: одна доза (0,5 мл) содержит 1,5 мкг инаktivированного штамма вируса ТВЕ (клещевого энцефалита) K23*, адсорбированного на гидроксиде алюминия (гидрированном) (0,3-0,4 мг Al³⁺), триметамол, сахарозу, хлорид натрия, воду для инъекций.

FSME Junior: каждая доза (0,25 мл) суспензии содержит 1,2 мкг инаktivированного вируса ТВЕ (штамм neudorfl), выращенного в фибробластах куриных эмбрионов (клетках CEF) и адсорбированного на гидратированном гидроксиде алюминия (0,17 мг Al³⁺), альбумин человека, хлорид натрия, динатрий фосфат, дигидрофосфат калия, сахарозу, воду для инъекций, гидратированный гидроксид алюминия.

FSME для взрослых: каждая доза (0,5 мл) суспензии содержит 2,4 мкг инаktivированного вируса ТВЕ (штамм neudorfl), выращенного в фибробластах куриных эмбрионов (клетках CEF) и адсорбированного на гидратированном гидроксиде алюминия (0,35 мг Al³⁺), альбумин человека, хлорид натрия, динатрий фосфат, дигидрофосфат калия, сахарозу, воду для инъекций, гидратированный гидроксид алюминия.

ТВЕ Москва: каждая доза (0,5 мл) суспензии содержит 0,5-0,75 мкг инаktivированного вируса ТВЕ (штамм TBEV-FE Sojfin), выращенного в культуре фибробластов куриного эмбриона (клетки CEF) и адсорбированного на гидратированном гидроксиде алюминия (0,35 мг Al³⁺), альбумин человека, хлорид натрия, динатрий фосфат, дигидрофосфат калия, сахарозу, воду для инъекций, гидратированный гидроксид алюминия.

EnceVir: каждая доза (0,5 мл) суспензии содержит 2,0-2,5 мкг инаktivированного вируса ТВЕ (штамм TBEV-Fe-205), выращенного в культуре фибробластов куриного эмбриона (клетки CEF) и адсорбированного на гидратированном гидроксиде алюминия (0,35 мг Al³⁺), человеческий альбумин, натрия хлорид, динатрий фосфат, дигидрофосфат калия, сахарозу, воду для инъекций, гидратированный гидроксид алюминия.

TBEV CIBP: каждая доза (неизвестное количество) суспензии содержит инаktivированный вирус ТВЕ (штамм TBEV-Fe Senzhang), выращенный в первичных клетках почки хомяка (РНКС) и адсорбированный на гидратированном гидроксиде

алюминия (0,35 мг Al³⁺), альбумин человека, хлорид натрия, динатрий фосфат, дигидрофосфат калия, воду для инъекций, гидратированный гидроксид алюминия.

Подходящая вакцина против вируса JE приведена ниже:

IXIARO®: 1 доза (0,5 мл) IXIARO® содержит штамм вируса японского энцефалита SA14-14-2 (инактивированный) 1,2 6 AE₃, соответствующий активности ≤ 460 нг ED₅₀, забуференный фосфатом физиологический раствор, содержащий хлорид натрия, дигидрофосфат калия, динатрий гидрофосфат, воду для инъекций.

Понятно, что вакцины, которые в настоящее время разрабатываются, также могут быть использованы. Например, в настоящее время разрабатывается вакцина против вируса лихорадки Западного Нила (см. Brandler S, Tangy F. «Vaccines in development against West Nile virus». *Viruses* 2013; 5(10): 2384-409), а также вакцина против вируса Зика (см. Vannice KS, Giersing BK, Kaslow DC, et al. «Meeting Report: WHO consultation on considerations for regulatory expectations of Zika virus vaccines for use during an emergency». *Vaccine* 2016).

Подходящие режимы дозирования для выбранных вакцин против флавивируса приведены ниже.

IXIARO® (для взрослых)	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,5 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,5 мл внутримышечно	Спустя 28 дней после первой дозы	Спустя 7 дней после первой дозы
Бустерная доза	0,5 мл внутримышечно	Спустя 12-24 месяца после второй дозы	Спустя 12-24 месяца после второй дозы

IXIARO® (24 месяца – 3 года)	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,25 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,25 мл внутримышечно	Спустя 28 дней после первой дозы	Спустя 7 дней после первой дозы
Бустерная доза	0,25 мл внутримышечно	Спустя 12-24 месяца после второй дозы	Спустя 12-24 месяца после второй дозы

FSME-Vuxen для взрослых (от 16 лет и старше)	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,5 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,5 мл внутримышечно	Спустя 1-3 месяца после первой дозы	Спустя 14 дней после первой дозы
Доза 3	0,5 мл внутримышечно	Спустя 5-12 месяцев после второй дозы	Спустя 5-12 месяцев после второй дозы
Бустерная доза	0,5 мл внутримышечно	Каждые 3-5 лет после третьей дозы	Каждые 3-5 лет после третьей дозы

FSME-Junior для детей	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
-----------------------	------	-------------------	-----------------------

(16 лет и младше)			
Доза 1	0,25 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,25 мл внутримышечно	Спустя 1-3 месяца после первой дозы	Спустя 14 дней после первой дозы
Доза 3	0,25 мл внутримышечно	Спустя 5-12 месяцев после второй дозы	Спустя 5-12 месяцев после второй дозы
Бустерная доза	0,25 мл внутримышечно	Каждые 3-5 лет после третьей дозы	Каждые 3-5 лет после третьей дозы

Енсериг для взрослых (от 12 лет и старше)	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,5 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,5 мл внутримышечно	Спустя 1-3 месяца после первой дозы	Спустя 7 дней после первой дозы
Доза 3	0,5 мл Внутримышечно	Спустя 5-12 месяцев после второй дозы	Спустя 21 день после второй дозы
Бустерная доза	0,5 мл внутримышечно	Каждые 3 года после третьей дозы	Каждые 3 года после третьей дозы

Енсериг Вакс для детей (до 12 лет и младше)	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,25 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,25 мл внутримышечно	Спустя 1-3 месяца после первой дозы	Спустя 7 дней после первой дозы
Доза 3	0,25 мл Внутримышечно	Спустя 9-12 месяцев после второй дозы	Спустя 21 день после второй дозы
Бустерная доза	0,25 мл внутримышечно	Каждые 3 года после третьей дозы	Каждые 3 года после третьей дозы

ТВЕ Москва	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,5 мл внутримышечно	День 0	-
Доза 2	0,5 мл внутримышечно	1-7 месяцев	-
Доза 3	0,5 мл Внутримышечно	12 месяцев	-
Бустерная доза	0,5 мл внутримышечно	Каждые 3 года	-

EnceVir	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	0,5 мл внутримышечно	День 0	День 0
Доза 2	0,5 мл внутримышечно	5-7 месяцев	21-35 дней
Доза 3	0,5 мл внутримышечно	12 месяцев	42-70 дней
Доза 4	0,5 мл внутримышечно	-	6-12 месяцев
Бустерная доза	0,5 мл внутримышечно	Каждые 3 года	-

ТВЕ-СІВР	Доза	Обычный календарь	Сокращенный календарь
Доза 1	Неизвестна	День 0	-

Доза 2	Неизвестно	14 дней	-
Бустерная доза	Неизвестно	Спустя 1 год	-

Понятно, что одна или несколько вакцин против другого флавивируса обычно дополнительно содержат фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или адъювант. Подходящие носители, разбавители и адъюванты, пути введения и способы приготовления вакцины включают те, которые упомянуты выше в связи с первым аспектом изобретения.

Дополнительные варианты осуществления второго и третьего аспектов изобретения описаны ниже.

Предпочтения для другого флавивируса включают те, которые упомянуты выше в связи с первым аспектом изобретения. Таким образом, флавивирус может представлять собой один или несколько флавивирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса Зика, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила, вируса энцефалита Сент-Луис, вируса омской геморрагической лихорадки. Особо предпочтительно флавивирус представляет собой один или несколько флавивирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса Зика, вируса клещевого энцефалита и вируса японского энцефалита.

В одном варианте осуществления флавивирус не является вирусом лихорадки денге.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса клещевого энцефалита и предназначены для вакцинации индивидуума от заражения клещевым энцефалитом.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса японского энцефалита и предназначены для вакцинации индивидуума от заражения вирусом японского энцефалита.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса Зика и предназначены для вакцинации человека от инфекции вирусом Зика.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса клещевого энцефалита и вакцину против вируса японского энцефалита, и предназначены для вакцинации человека от инфекции вирусом клещевого энцефалита и вирусом японского энцефалита.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса клещевого энцефалита и против вируса Зика, и предназначены для вакцинации человека против инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита и вирусом Зика.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса японского энцефалита и против вируса Зика, и предназначены для вакцинации индивидуума от заражения вирусом японского энцефалита и вирусом Зика.

В одном варианте осуществления одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса японского энцефалита, вакцину против вируса Зика и вакцину против вируса клещевого энцефалита и предназначены для вакцинации человека против инфекции вирусом японского энцефалита, вирусом Зика и вирусом клещевого энцефалита.

В одном варианте осуществления индивидуум ранее не был заражен флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса. Предпочтительно индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом, поскольку возможно, что пожизненный иммунитет создается таким образом, что вакцинация против этого флавивируса не требуется.

В одном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован вирусом желтой лихорадки и/или вакцинирован вакциной против вируса желтой лихорадки. Может быть предпочтительно, чтобы у индивидуума не было предшествующей иммунной памяти на YFV, поскольку вакцина YFV будет тогда основной инфекцией и будет генерировать лучший иммунный ответ вместе с одной или несколькими дополнительными вакцинами (например, TBEV или JEV).

В одном варианте осуществления индивидуум был ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса.

В одном варианте осуществления индивидуум был ранее инфицирован вирусом желтой лихорадки и/или вакцинирован вакциной против вируса желтой лихорадки. Ожидается, что индивидуум все же получит выгоду от защиты от другого флавивируса, но, не желая углубляться в какую-либо теорию, считается, что баланс в основных механизмах может быть другим. Например, по сравнению с индивидуумами, которые ранее не были инфицированы YFV и/или вакцинированы вакциной YFV, адъювантный эффект вакцины YFV может быть ниже, а перекрестная реактивность, вызванная вакциной YFV, может быть выше.

В одном варианте осуществления индивидуум был ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, но ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса и ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум был ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, и ранее был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В одном варианте осуществления индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, и ранее был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

В особо предпочтительном варианте осуществления индивидуум ранее не был заражен флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса, и ранее не был инфицирован YFV и/или вакцинирован против YFV.

Понятно, что вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом во втором и третьем аспектах изобретения включает то же значение, что и вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом в первом аспекте изобретения, и поэтому все предпочтения, ограничения и определения, изложенные в первом аспекте изобретения, в равной степени относятся ко второму и третьему аспектам изобретения.

Например, вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом в контексте второго и третьего аспекта изобретения позволяет предотвратить и/или уменьшить последующую инфекцию флавивирусом. Подобным образом, вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом в контексте второго и третьего аспектов изобретения позволяет предотвратить и/или уменьшить одно или несколько расстройств и/или состояний, связанных с инфекцией флавивирусом. Способы оценки такой профилактики и снижения описаны выше в связи с первым аспектом изобретения.

Как правило, иммунитет против флавивируса, который обеспечивается в контексте второго и третьего аспектов изобретения (например, предотвращение и/или уменьшение последующей инфекции флавивирусом, или предупреждение и/или уменьшение одного или нескольких расстройств и/или состояний, связанные с инфекцией флавивирусом), сохраняются в течение периода до 1 года, или 5 лет, или 10 лет, как описано выше в отношении первого аспекта изобретения.

Как правило, уменьшение последующей инфекции флавивирусом и/или уменьшение одного или нескольких расстройств и/или состояний, связанных с инфекцией флавивирусом, которое предусмотрено в контексте второго и третьего аспектов изобретения, представляет собой сокращение на 100%, или на 90%, или на 80%, или на 70%, или на 60%, или на 50%.

Как правило, режим вакцинации по второму и третьему аспектам изобретения имеет действенность вакцины при обеспечении иммунитета против другого флавивируса, по меньшей мере 50%, например, по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,

90% или 95%. Предпочтительно режим вакцинации имеет действенность вакцины не менее 85%. Измерение действенности вакцины может быть выполнено любым из способов, описанных выше в отношении первого аспекта изобретения.

Как описано выше в отношении первого аспекта изобретения, вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом в контексте второго или третьего аспекта изобретения может генерировать и/или повышать иммунитет индивидуума против флавивируса. Иммунитет может включать клеточный иммунитет и/или адаптивный иммунитет у индивидуума против флавивируса, и предпочтения в отношении такого иммунитета включают те, которые описаны выше в отношении первого аспекта изобретения.

Не желая углубляться в какую-либо теорию, авторы изобретения полагают, что введение как вакцины против YFV, так и одной или нескольких вакцин против флавивируса индивидууму в соответствии со вторым и третьим аспектами изобретения действует синергетически, обеспечивая защитный иммунитет против флавивируса. Например, как описано более подробно в Примерах, авторы изобретения показали, что плазмобласты, продуцирующие антитела, резко увеличиваются, если применять две вакцины вместо одной. Это означает, что вырабатывается больше антител к инфекциям, чем при введении одной вакцины. Кроме того, клетки ТВЕ-Т возникают, если применяют две вакцины, тогда как это не достигается, если применяют несколько доз однократной ТВЕ, что указывает на синергизм в компартментах В- и Т-клеток. Авторы изобретения полагают, что такой синергизм обеспечивает более низкие и/или меньшие дозы соответствующих вакцин, которые позволяют увеличить соблюдение режима лечения в популяции пациентов. Более низкие и/или меньшие дозы также более рентабельны. Авторы изобретения также полагают, что такой синергизм позволяет избежать необходимости применения адъювантных вакцин против флавивируса. Например, может не понадобиться адъювант гидроксид алюминия в вакцинах ТВЕ/JE, если можно использовать вакцины YFV + ТВЕ и YFV + JE.

Авторы изобретения полагают, что вакцина YFV не только повышает иммунитет, обеспечиваемый другими вакцинами против флавивируса, но, как ожидается, будет действовать в качестве общего адъюванта для других вакцин. Таким образом, четвертый аспект изобретения предусматривает использование вакцины против вируса желтой лихорадки в качестве адъюванта.

Предпочтения для вакцины YFV включают те, которые описаны выше в отношении первого аспекта изобретения. Например, предпочтительно, если YFV представляет собой живую аттенуированную вакцину, такую как Stamaril®.

Под адьювантом мы подразумеваем, что вакцина YFV усиливает иммунный ответ на антиген. Другими словами, когда антиген и вакцину YFV вводят индивидууму, иммунный ответ на антиген проявляется больше, чем иммунный ответ на антиген, если вакцину YFV не вводили вместе с ним. Например, иммунный ответ может быть по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5 или 10 раз или даже по меньшей мере в 20 раз, например, в 50 или в 100 раз больше. Как правило, иммунный ответ может быть по меньшей мере в 1-3 раза больше, но следует понимать, что присутствие адьюванта может обеспечивать разницу между обнаруживаемым иммунным ответом и его отсутствием.

В одном варианте осуществления вакцину YFV используют в качестве адьюванта для вакцины, такой как инактивированная вакцина. Однако следует понимать, что вакцина YFV может быть использована в качестве адьюванта для других форм вакцин, таких как вакцины на основе ДНК и белков.

Инактивированная вакцина может представлять собой вирусную вакцину, такую как вакцина против гепатита А, вакцина против гриппа (инъекция), вакцина против бешенства, вакцина против японского энцефалита.

Инактивированная вакцина может представлять собой бактериальную вакцину, такую как любая инактивированная вакцина против брюшного тифа, инактивированная вакцина против холеры, вакцина против чумы, вакцина (вакцины) против дифтерии, столбняка и коклюша.

Инактивированная вакцина может представлять собой субъединичную вакцину, такую как вакцина против гепатита В или ВПЧ.

Понятно, что этот аспект изобретения, следовательно, включает способ усиления иммунного ответа на антиген (например, вакцину, такую как инактивированная вакцина), причем способ включает введение вакцины против вируса желтой лихорадки индивидууму, которому вводят антиген. Антиген может вводиться по существу одновременно с вакциной YFV, но следует понимать, что их можно вводить последовательно. Предпочтительно YFV и антиген вводят одновременно.

Используемый в настоящей заявке в отношении всех аспектов изобретения термин «индивидуум» предпочтительно представляет собой млекопитающего индивидуума. Предпочтительно, млекопитающее является человеком, хотя следует понимать, что индивидуум может быть млекопитающим, не являющимся человеком, таким как любое из лошади, собаки, свиньи, коровы, овцы, крысы, мыши, морской свинки или примата.

Понятно, что некоторые флавивирусы преобладают в педиатрической популяции, и поэтому в одном варианте осуществления индивидуум представляет собой ребенка (то есть в возрасте до 18 лет). Авторы изобретения полагают, что режимы вакцинации по

изобретению (т.е. в соответствии с первым, вторым и третьим аспектами изобретения) будут полезны для предотвращения более поздних инфекций, и может быть необходимо вакцинировать индивидуумов в раннем возрасте (например, от 6 месяцев, например, 1 года, 2 лет, 3 лет, 4 лет или 5 лет).

Пятый аспект изобретения относится к вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, а также фармацевтически приемлемый наполнитель или разбавитель.

Предпочтения для вакцины YFV и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса включают те, которые упомянуты выше в связи с первым, вторым и третьим аспектами изобретения.

Шестой аспект изобретения относится к набору, содержащему вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько вакцин против флавивируса. Опять же, предпочтения для вакцины против YFV и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса включают те, которые упомянуты выше в связи с первым, вторым и третьим аспектами изобретения.

Вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения и набор по шестому аспекту изобретения могут включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более вакцин против флавивируса.

При использовании двух или более вакцин против флавивируса следует понимать, что две или более вакцин против флавивируса могут представлять собой две или более вакцины против одного и того же флавивируса или против разных флавивирусов. Таким образом, две или более вакцин против флавивируса могут включать две или более вакцин против разных флавивирусов, соответственно, например, 3 или более разных флавивирусов, 4 или более разных флавивирусов, и так далее.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения включает вакцину против вируса ТВЕ.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения включает вакцину против вируса JEV.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения включает вакцину против вируса Зика.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения включает вакцину против вируса

ТВЕ и вакцину против вируса JEV.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения содержат вакцину против вируса ТВЕ и вакцину против вируса Зика.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения содержат вакцину против вируса Зика и вакцину против JEV.

В одном варианте осуществления вакцинная композиция по пятому аспекту изобретения или набор по шестому аспекту изобретения содержат вакцину против вируса ТВЕ и вакцину против JEV, и вакцину против вируса Зика.

Седьмой аспект изобретения относится к способу получения иммунной сыворотки, включающему:

(a) вакцинацию индивидуума вакцинной композицией из второго или третьего аспекта изобретения; и

(b) получение иммунной сыворотки от индивидуума.

Получение иммунной сыворотки может быть осуществлено любым подходящим способом в данной области техники, включая способ, описанный в McKinney et al. (J. Immunol Methods 1987; 96 (2): 271-8).

Понятно, что изобретение включает иммунную сыворотку, полученную способом по седьмому аспекту изобретения.

Понятно, что полученная таким образом иммунная сыворотка может быть использована для обеспечения пассивного иммунитета у индивидуума-реципиента, например, у человека с иммунодефицитом или с иммуносупрессией, или у человека, для которого требуется быстрая нейтрализация вирусных частиц. Таким образом, иммунную сыворотку можно использовать как часть лечения иммуноглобулином для внутривенного введения (Weissbach FH, Hirsch HH. Comparison of Two Commercial Tick-Borne Encephalitis Virus IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. Clin Vaccine Immunol ' 2015; 22(7): 754-60 and Jolles et al, Clin Exp Immunol 2005; 142(1): 1-11)).

Таким образом, понятно, что изобретение включает способ обеспечения пассивного иммунитета индивидуума, причем этот способ включает введение индивидуальной иммунной сыворотки, полученной от индивидуума, который был вакцинирован вакцинной композицией по второму или третьему аспекту изобретения. Понятно, что иммунная сыворотка может быть получена из популяции индивидуумов, которые были вакцинированы вакцинной композицией по второму или третьему аспектам изобретения.

Например, иммуноглобулин для внутривенного введения (IVIG) может представлять собой продукт крови, приготовленный из сыворотки от 1000 до 15 000 доноров на серию. Это терапия выбора для пациентов с дефицитом антител. Для этого показания IVIG можно использовать в «замещающей дозе» 200-400 мг/кг массы тела, примерно 3 раза в неделю. Напротив, «высокая доза» IVIG (hdlIVIG), назначаемая чаще всего в дозе 2 г/кг/месяц, используется в качестве «иммуномодулирующего» агента при растущем количестве иммунных и воспалительных расстройств. Первоначальное использование hdlIVIG осуществляли для иммунной тромбоцитопенической пурпуры (ИТП) у детей. Понятно, что под пассивным иммунитетом мы подразумеваем введение как IVIG, так и hdlIVIG.

Изобретение включает вакцинную композицию для применения, или применение, или способ, по существу, как заявлено в данном документе со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, описание, примеры и фигуры.

Изобретение включает вакцинную композицию, по существу, как заявлено в настоящем документе со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, описание, примеры и фигуры.

Изобретение включает набор, по существу, как заявлено в данном документе со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, описание, примеры и фигуры.

Фиг. 1. Флавивирусная РНК, кодирующая 10 белков.

Фиг. 2. Схематическое изображение сайтов оценки прогноза NetCTL.

Фиг. 3. Появление короткоживущих плазмобластов, секретирующих антитела, на 0, 7 и 15 или 28 день (28 после вакцины против ТВЕ) после вакцинации. (А) Поточная диаграмма, показывающая плазмобласты у одного альфа донора до вакцинации и на 7 и 15 день после вакцинации. (В) Графики, показывающие плазмобласты после введения одной вакцины YFV (синий цвет), одной вакцины ТВЕ (черный цвет), и вакцин YFV и ТВЕ, вводимых одновременно (красный цвет). На графиках показаны плазмобласты в процентах от общего количества В-клеток.

Фиг. 4. Уровни ТБЕV-нейтрализующих антител после вакцинации против желтой лихорадки. ТБЕV-нейтрализующие антитела в сыворотках от трех доноров, вакцинированных вакциной YFV. Донор альфа Т0 получил одновременно вакцины YFV и ТБЕ, а затем две дополнительные дозы вакцины ТБЕ. Время отбора проб составляло три года после первичной иммунизации, а уровни нейтрализующих антител измеряли до 80%. Донор бета Y1 ранее получал несколько вакцин против ТБЕ, причем последняя вакцинация была проведена за 4 месяца до вакцины против YFV, и уровень нейтрализующих антител увеличился с 20% (до вакцины против YFV) до 40% (через 80

дней после вакцинации против YFV). Донор бета Y2 не получал вакцину вакцину TBE и получал вакцину YFV, а нейтрализующие TBEV антитела обнаружены не были (данные не показаны).

Фиг. 5. Перекрестно-реактивные CD4 Т-клетки против TBEV и ZIKV возникают после одновременного введения вакцин YFV и TBE. (А) МНКПК до и в дни 15 и 22 после сопутствующей вакцинации активировали с использованием ZIKV или TBEV перекрывающихся библиотек NS5 у одного донора (альфа Т2). (В) МНКПК до и на 15-й день после вакцинации активировали TBEV перекрывающимися библиотеками NS5 у одного донора (альфа Т1). (С) МНКПК, активированные TBEV перекрывающимися библиотеками NS5 у одного донора с 28-го дня после 2-й и 3-й дозы FMSE.

Фиг. 6. Перекрестно-реактивные CD8 Т-клетки против TBEV и ZIKV появляются после введения вакцин YFV и TBE. (А) На графиках показаны IFN- γ и TNF двойные позитивные CD8 Т-клетки либо без активации (-cntr), либо после активации библиотекой, охватывающей YFV-NS4B (+cntr), библиотекой, охватывающей TBEV NS5, или библиотекой, охватывающей ZIKV NS5 у одного донора, вакцинированного только YFV (бета Y1). (В) На графиках показаны IFN- γ и TNF двойные позитивные CD8 Т-клетки в день 0 (вверху), 15 (в середине) и 22 (внизу) после вакцинации. Клетки активировали либо библиотекой, охватывающей YFV-NS4B (+cntr), либо библиотекой, охватывающей ZIKV NS5, у одного донора (альфа Т2), получавшего одновременную вакцинацию против YFV и TBE. (С) Графики показывают IFN- γ и TNF двойные позитивные CD8 Т-клетки с течением времени после активации пептидной библиотекой, охватывающей ZIKV NS5, у одного донора (альфа Т1), получавшего одновременную вакцинацию YFV и TBE. (D) Графики показывают МНКПК от одной вакцины TBE, через 28 дней после введения, после второй и третьей бустерной дозы TBE, при активации пептидной библиотекой TBEV NS5.

Фиг. 7. Перекрестно-реактивные Т-клетки против TBEV и ZIKV, появившиеся после вакцинации одной вакциной YFV. (А) МНКПК от двух вакцинированных YFV доноров (HLA-A1-положительных) были размножены в течение 6 дней без стимуляции (отрицательный контроль, левая панель) или с прогнозированным пептидом TBEV ETACLSKAY (SEQ ID NO: 1) (правая панель), 15 дней после вакцинации YFV. Специфические клетки были измерены как пролиферирующие (низкий CFSE (метка - карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир)) и IFN- γ -положительные. (В) Т-клетки через 1 день и 15 дней после вакцинации активировали в течение 6 часов с помощью прогнозированных ZIKV NS5 CD8 эпитопов. Специфические клетки измеряли по одновременной экспрессии CD107a (дегрануляция) и TNF.

Фиг. 8. Т-клетки, специфичные для вируса Зика, появившиеся после вакцинации против желтой лихорадки. МНКПК от двух индивидуумов (донора 1 и донора 2), активированных библиотекой NS5, специфичной к вирусу Зика, до (день 0) и на 15 день после вакцинации против YFV. CD4 и CD8 Т-клетки, отвечающие на библиотеку Zika-NS5, идентифицированные по продукции IFN- γ и TNF. Числа на фигуре указывают процент CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток.

Фиг. 9. График вакцинации и отбора крови для одновременной вакцинации YFV и TBEV. Вспомогательная вакцина против TBEV будет введена в день 28 с отбором крови в тот же день.

Фиг. 10. Вирусные штаммы, полученные из штаммов Asibi.

Фиг. 11. Стимуляция JEV NS5 CD8 Т-клеток (12 ч) на замороженных МНКПК от здорового донора, получающего вакцину YVF (донор By4), до (день 0) и через 15 дней после вакцинации. Продукция TNF увеличивается с 0,03 до 0,3%, что является 10-кратным увеличением ответа на пептидную библиотеку JEV NS5.

Пример 1. Вакцина YFV индуцирует/усиливает иммунный ответ против других флавивирусов.

Флавивирусы относятся к семейству Flaviviridae и содержат более 70 вирусов, вызывающих тяжелые заболевания. Эти вирусы являются причиной сотен тысяч смертей в год, а также значительной заболеваемости. В настоящее время имеются коммерческие вакцины против трех флавивирусов; YFV, JEV и TBEV (таблица 1). Из этих вакцин живая аттенуированная вакцина YFV является одной из наиболее эффективных и используемых вакцины на земле.

Таблица 1. Обзор флавивирусов, эндемичной области и доступных вакцин.

Вирус	Переносчик	Эндемичная область	Доступная вакцина
JEV	Комар (Culex)	Азия	IXIARO® - инактивированная
ZIKV	Комар (Aedes)	Африка, Латинская Америка	Нет
YFV			Stamaril®/YF-VAX® - живая аттенуированная
TBE	Клещ (Ixodes)	Евразия	FMSE-IMMUN и Encerix® - инактивированные

В этом примере исследуется перекрестная реактивность вакцины YFV с другими флавивирусами, в частности с TBEV и ZIKV.

Методы

Пептидные библиотеки

Пептидные библиотеки используются для параллельного отображения нескольких линейных пептидных фрагментов для определения специфических эпитопов. Мы разработали пептидные библиотеки, охватывающие белки TBEV и ZIKV NS5,

предназначенные для активации как CD4, так и CD8 Т-клеток с перекрывающимися пептидными сегментами всего антигена. Связывание оценивают с помощью проточной цитометрии, и этот метод особенно полезен для разработки вакцин.

Прогнозирование CD8 Т-клеточных эпитопов

Чтобы идентифицировать вирус-специфические CD8 Т-клетки с помощью проточной цитометрии, необходимо идентифицировать Т-клеточные эпитопы в вирусе, если они еще не известны. Идентификация эпитопа требует систематического скрининга антигена, что может быть затруднено, когда антиген имеет множественные конформации или связывающие домены. Другой метод идентификации Т-клеточных эпитопов для конкретного патогена заключается в использовании онлайн-поисковых систем, которые рассматривают HLA-тип и возможную презентацию пептида молекулой МНС на клеточной поверхности. Преимущество традиционной библиотеки всего генома состоит в том, что HLA не смещены, а прогностические алгоритмы представляют собой технологию с более высокой пропускной способностью. Мы создали ZIKV и TBEV CD8 пулы прогнозируемых эпитопов в белках NS5 ZIKV (таблица 2) и TBEV (таблица 3) для наиболее распространенных типов HLA (HLA-A1, A2, A3, B7 и B8). Мы использовали поисковую систему NetCTL для прогнозирования эпитопов, которая объединяет прогноз связывания пептида - МНС класса I, расщепление протеасомного С-конца и эффективность транспорта ТАР (фиг. 2).

Таблица 2. Прогнозируемые эпитопы ZIKV.

№	ZIKV	SEQ ID NO:	HLA Супертип	NetCTL шкала
1	ETACLAQSY	1	A1	1.7742
2	RTWAYHGSY	2	A1	1.6323
3	ALNTFTNLV	3	A2	1.2792
4	YMWLGARFL	4	A2	1.1720
5	RTTWSIHGK	5	A3	1.3336
6	CVYNMMGKR	6	A3	1.2696
7	GLVRVPLSR	7	A3	1.1146
8	YTYQNKVVK	8	A3	0.9942
9	NMMGKREKK	9	A3	0.8719
10	GLGLQRLGY	10	A3	0.8095
11	VPCRHQDEL	11	B7	0.9698
12	GLQRLGYVL	12	B8, A2	1.1986
13	WLGARFLEF	13	B8	1.0892
14	LLYFHRRDL	14	B8, A2	1.0109
15	SGQVVTYAL	15	B8	1.0040

Таблица 3. Прогнозируемые эпитопы TBEV.

№	TBEV	SEQ ID NO:	HLA Супертип	NetCTL шкала
1	STLNGGLFY	16	A1	2.9180
2	ETACLSKAY	17	A1	2.0304
3	GVEGISLNY	18	A1	1.9546
4	VMEWRDVPY	19	A1	1.2679
5	VLAPYRPEV	20	A2	1.2973
6	YMWLGSRFL	21	A2, B8	1.1707
7	MLVSGDDCV	22	A2	0.8937
8	YALNTLTNI	23	A2	0.8088
9	TLTNIKVQL	24	A2	0.7921
10	CVYNMMGKR	25	A3	1.2472
11	KLGEFGVAK	26	A3	1.2261
12	AKVKSNAAL	27	B7	0.8632
13	VVTYALNTL	28	B7	0.8505
14	IAKVKSNAAL	29	B8	1.4929
15	SGQVVTYAL	30	B8	1.0018

Дизайн и предметы исследования

Периферическую кровь и сыворотку собирали до вакцинации и в дни 7 и 15 от четырех доноров, вакцинированных первичной дозой вакцины против YFV (доноры бета-Y), и до вакцинации и в дни 7, 15 и 22 от двух доноров, которые получали сопутствующую вакцинацию первичными дозами YFV и TBE (доноры альфа-T). В качестве группы отрицательного контроля МНКПК собирали на 28 день от второй и третьей дозы введения вакцины от индивидуумов, вакцинированных только TBE (FSME). МНКПК выделяли из пробирок с ЭДТА (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния). МНКПК либо окрашивали свежими, либо криоконсервировали в 90% ЭТС и 10% ДМСО для последующего анализа.

Антитела для проточной цитометрии

Иммунные ответы оценивали, используя многоцветную проточную цитометрию, и использовали моноклональные антитела (мАт): анти-CD107a FITC, анти-CD4 Brilliant Ultraviolet 395, анти-CD19 Brilliant Ultraviolet 395, анти-CD4 Brilliant Ultraviolet 737, анти-HLA-DR APC, анти-Ki67 Alexa Fluor 700, анти-MIP-1 β Alexa Fluor 700, анти-CD14 BD horizon V500, анти-CD19 BD horizon V500 и анти-TNF PE-CF594; все они были получены от BD Biosciences (Сан-Хосе, Калифорния). Анти-CD45RA APC-Cy7, анти-IFN- γ Brilliant Violet 421, анти-CD27 Brilliant Violet 650, анти-CD38 Brilliant Violet 785, анти-IgG PE, анти-IgD PE-Cy7 были получены от Biolegend (Сан-Диего, Калифорния), анти-CD8 Qdot 605 и Aqua Live/Dead были получены от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Анти-CD3

PE-Cy5 и анти-CD56 ECD были получены от Beckman Coulter (Бреа, Калифорния).

Проточная цитометрия

Для фенотипического анализа клеток МНКПК инкубировали в течение 30 минут при 4°C в темноте с мАт на поверхности с последующим промыванием PBS. Для окрашивания CD107a, CD107a антитело присутствовало во время 6-часовой стимуляции, и затем добавляли дополнительное антитело CD107a вместе с поверхностными мАт в течение 30 минут инкубации при 4°C в темноте. Клетки фиксировали и пермеабелизировали с помощью Fix/perm (eBioscience) в течение 30 минут при 4°C в темноте. Затем клетки промывали и окрашивали внутриклеточными мАт. Образцы были получены на приборе BD LSRFortessa (BD Biosciences) и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo версии 9.4 (Tree Star, Ашленд, Орегон). В-клеточные плазмобласты были идентифицированы как лимфоциты (расширенная область), одиночные клетки, живые клетки и CD14/ CD123-негативные, CD3 и CD4-негативные, CD20-негативные и CD19-позитивные, CD27 и CD38-двойные позитивные. Т-клетки были идентифицированы как лимфоциты, синглеты, dump-негативные (CD19, CD14 и маркер мертвых клеток «Aqua dead cell marker») и CD3, CD4 или CD8-позитивные.

Функциональные анализы *in vitro*

МНКПК содержали в среде RPMI 1640, содержащей 10% ЭТС, 2 mM L-глутамина, 1% пенициллина и стрептомицина (Invitrogen), в течение ночи при 37°C. Клетки стимулировали 10 мкг пептидов в течение 12 или 6 часов в 96-луночных круглодонных планшетах в присутствии брефельдина А (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), монензина (BD Biosciences) и очищенного анти-CD28/CD49d (1 мкл/мл) (BD Biosciences). Окрашивание, проточную цитометрию и анализы выполняли, как описано выше.

Реакция нейтрализации бляшкообразования (PRNT)

Сыворотки от вакцинированных индивидуумов готовили в соответствии со стандартным протоколом клинической диагностики в Шведском институте контроля инфекционных заболеваний (22). Сыворотки, включая положительные и отрицательные контроли, инактивировали и разбавляли в два раза в основном растворе Хенкса с 2% инактивированной ЭТС, 2% 1 M HEPES. Равные количества разведений сыворотки и вируса при приблизительно 50 БОЕ/100 мл меня смешивали, и пробирки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 часа. После инкубации 200 мкл сывороточно-вирусной смеси добавляли в планшеты с клеточными монослоями Vero. После инкубации при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 часа лунки покрывали 2 мл смеси из одной части 1% агарозы и одной части 2 основной среды Игла с добавлением 8% ЭТС, 2% 1 M HEPES. Планшеты

инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 6 дней, когда добавляли второй слой, содержащий 3,3% нейтрального красного, при 2 мл/лунку. Чашки возвращали в инкубатор, и бляшки подсчитывали на следующий день. Тест соответствовал требованиям, если доза вируса находилась в диапазоне 30-70 БОЕ. Титры нейтрализующих антител рассчитывали как обратную величину разведения сыворотки, которое давало уменьшение количества бляшек на 80% по сравнению с вирусным контролем.

Результаты

Высокая перекрестная гомология в флавивирусном белке NS5

NS5 является многофункциональным, консервативным белком во флавивирусах и представляет собой вирусную полимеразу. Мы сравнили последовательности белка NS5 в YFV, TBEV JEV и ZIKV и обнаружили, что белок NS5 YFV имеет более 60% гомологии с белками NS5 TBEV, JEV и ZIKV (таблица 4).

Таблица 4. Результаты анализа BLAST последовательностей белка флавивируса.

Вирус и штамм (наименование вакцины)	Полная белковая гомология с YFV-17D204 (%)	Гомология с белком NS5 YFV-17D204 (%)
YFV 17D204 (Stamaril®)	100	100
JEV-SA14-14-2 (IXIARO®)	45	63
TBEV Neudeurfl (FSME®)	43	61
ZIKV полинезийский изолят	46	64
Вирус лихорадки Западного Нила – человеческий изолят	46	63
Вирус энцефалита Сент-Луис – 2015	47	65
Вирус омской геморрагической лихорадки	43	61
Вирус энцефалита долины Мюррей	Нет доступной вирусной последовательности	-

Вирус	Полная белковая гомология с YFV-17D204 (%)	Гомология с белком NS3 YFV-17D204 (%)
YFV 17D204	100	100
JEV-SA14-14-2	45	55
TBEV Neudeurfl	43	48
ZIKV полинезийский	46	56
WNV человеческий изолят	46	57
SLEV-2015	47	58
OHFV	43	47
MVEV	ND	ND

Мы выделяли кровь от индивидуумов, либо вакцинированных только YFV, либо получивших одновременную вакцинацию YFV и TBE вакцинами.

Сопутствующая вакцинация против YFV и TBE генерирует большее количество антитело-продуцирующих В-клеток, чем одна вакцина YFV.

Иммунные ответы после вакцинации могут быть измерены несколькими

способами. Одними из самых ранних иммунных клеток при инфекции и вакцинации являются В-клетки. Зародышевые центры временно развиваются после воздействия антигена/вакцины и являются критическими участками для отбора и дифференцировки В-клеток, становящихся короткоживущими антитело-продуцирующими плазмобластами и В-клетками памяти. Было показано, что ответы плазмобластов являются прогностической мерой уровней антител, индуцированных вакцинацией, и следовательно, могут помочь в ранней оценке действенности вакцины (23). Плазмобласты могут быть обнаружены с помощью проточной цитометрии в острой стадии инфекции (24), однако их немного сложнее обнаружить после первичной вакцинации из-за низкого количества генерируемых клеток. Обычно требуется несколько бустерных доз, чтобы обнаружить их после вакцинации.

Чтобы оценить появление плазмобластов после вакцинации, мы окрашивали свежевыделенные МНКПК до вакцинации и на 7 и 15 день после введения только YFV (доноры бета-Y) или после одновременного введения YFV и TBE (доноры альфа-T) (фиг. 3А и Б). Плазмобласты видны в обеих когортах на 7-й день после вакцинации, однако альфа-доноры имеют пик с числом, достигающим 10-30% от общего количества В-клеток на 15-й день (фиг. 3А и В). Эти уровни можно измерить при острой инфекции вирусом лихорадки денге (24).

Чтобы измерить нейтрализующий эффект генерируемых антител, мы выполнили анализ нейтрализации бляшкообразования (PRNT) для TBEV22 на трех донорах, вакцинированных вакциной YFV. Один донор ранее был отрицательным как для вакцин против YFV, так и против TBE (бета Y2), один донор ранее получал несколько вакцин против TBE, с последней бустерной иммунизацией против YFV (бета Y1), а один донор получал сопутствующие вакцины против YFV и TBE, и после этого следовал программе вакцинации против TBE (две дополнительные дозы вакцины TBE, с последней бустерной дозой за четыре месяца до момента отбора проб (альфа-T0)). Донор бета Y1 показал 100% увеличение (с 20-40% нейтрализации) до и после введения вакцины против YFV (фиг. 4). Кроме того, у донора альфа-T0 были определены наивысшие уровни нейтрализующих антител против TBEV (80% нейтрализация). Вместе это указывает на то, что 1) вакцина YFV не генерирует перекрестно нейтрализующие антитела против TBEV (измерено с помощью этого анализа); 2) вакцина YFV усиливает уже существующие TBEV Nab и 3) высокая концентрация TBEV Nab генерируется, если одновременно вводят первичные вакцины YFV и TBE.

Вакцина YFV генерирует защитные перекрестно-реактивные CD4 T-клетки к TBEV и ZIKV

CD4 Т-клетки, отвечающие на антигены, выполняют критические функции в активации и регуляции иммунных реакций посредством продукции и высвобождения различных цитокинов, и играют важную роль в защитном иммунитете против вирусов, примированных инфекцией или вакцинацией. CD4 Т-клетки могут способствовать контакту CD8 Т-клеток с DC во вторичной лимфоидной ткани (25, 26), а также рекрутировать лимфоидные клетки в дренирующие лимфатические узлы (27) и рекрутировать врожденные или антигенспецифические эффекторы в участок репликации вируса (28, 29). CD4 Т-клетки могут быть разделены на отдельные субпопуляции в зависимости от их цитокинового профиля. В упрощенном виде субпопуляции Th1 активируют клеточные иммунные ответы посредством продукции IFN- γ , TNF и IL-2, а субпопуляции Th2 в основном продуцируют цитокины, поддерживающие активацию В-клеток (30).

Чтобы выяснить, возникают ли после вакцинации специфичные к YFV и TBEV, а также перекрестно-реагирующие с ZIKV CD4 Т-клетки, мы культивировали МНКПК с TBEV или ZIKV NS5, охватывая библиотеки с 0 и 15 дня (фиг. 5) от доноров, вакцинированных YFV и TBE. У донора альфа Т2 могут быть обнаружены специфические клетки против библиотек TBEV и ZIKV NS5. Специфичные для ZIKV клетки также появились на 15-й день у дважды вакцинированного донора альфа-Т1 (фиг. 5В). Однако одна только вакцина TBE, по-видимому, не индуцирует CD4-специфические Т-клетки после второй или третьей дозы вакцины TBE (фиг. 5С).

Вакцина YFV усиливает выработку специфических Т-клеток TBEV после сопутствующей вакцинации TBEV и генерирует перекрестно-реактивные Т-клетки против ZIKV.

CD8 Т-клетки обладают спектром функций для контроля вирусных инфекций. Здесь мы оценили экспрессию цитокинов (IFN- γ и TNF) и дегрануляцию (CD107a) после активации с помощью TBE/ZIKV NS5 библиотек (фиг. 6) или с помощью прогнозированных пулов ZIKV/TBEV CD8 Т-клеток (фиг. 6) до вакцинации (день 0) и на 15 и 22 дни после вакцинации. Вакцина YFV по отдельности генерирует небольшое количество перекрестно-реактивных CD8 Т-клеток против обоих TBEV NS5 и ZIKV NS5 на 15 день у донора бета Y1 (фиг. 6А). ZIKV-специфичные CD8 Т-клетки отсутствуют до вакцинации, но обнаруживаются через 15 дней после одновременного введения вакцин YFV и TBEV (фиг. 6В и С). Эти клетки полностью отсутствуют после многократной второй и третьей дозы вакцины TBE (фиг. 6D), демонстрируя, что вакцина TBEV по отдельности может не вызывать генерацию специфических CD8 Т-клеток. Вместе это указывает на то, что TBEV CD8 Т-клетки генерируются после однократного введения

вакцины TBE, если ее вводить одновременно с вакциной YFV.

Чтобы оценить наличие CD8 Т-клеточных ответов против единичных пептидных последовательностей TBEV (таблица 3), мы метили CFSE МНКПК от 2 HLA-A1-позитивных доноров, недавно вакцинированных YFV, и клетки культивировали с соответствующими синтетическими пептидами в течение 6 дней. К концу дня 6 эти культуры повторно стимулировали в течение 12 часов в присутствии пептида, и ответы определяли путем внутриклеточного окрашивания на IFN- γ (фиг. 7A). Отвечающие клетки были идентифицированы как двойные позитивные по разведению CFSE, что свидетельствует о пролиферации во время культивирования с пептидом и продукции IFN- γ . Один пептид, предположительно представленный у HLA-A1-позитивных доноров, индуцировал ответы у обоих доноров, вплоть до 1,9% IFN- γ -позитивных клеток. Затем мы активировали Т-клетки с прогнозированным пулом CD8 ZIKV (таблица 2) у одного донора, ранее активированного вакциной YFV до вакцинации и через 15 дней после вакцинации. ZIKV-специфические Т-клетки, продуцирующие CD107a и TNF, возникают на 15 день после введения YFV.

Заключение

На основе этих данных мы показываем, что антитело-продуцирующие плазмобласты возникают и достигают пика на 15-й день после введения YFV и YFV вместе с вакциной TBE. Уровни плазмобластов были выше у людей, получавших комбинированные вакцинации, по сравнению с людьми, получавшими только YFV (фиг. 3). Это может указывать на то, что существует синергетический адъювантный эффект, возникающий при получении одновременных вакцинаций TBEV и YFV.

YFV по отдельности генерирует небольшие, но обнаруживаемые защитные перекрестно-реактивные CD8 Т-клетки против ZIKV, JEV и TBEV (фиг. 6 и 7). Однако у индивидуумов, получающих одновременные вакцинации YFV и TBE, был обнаружен лучший ответ CD4 Т-клеток против пептидов TBEV NS5 по сравнению с индивидуумами, которые получали только вакцину TBE (фиг. 5). Индивидуумы, получающие сопутствующие вакцинации YFV и TBE, демонстрируют сильный ответ CD8 Т-клеток на библиотеку ZIKV NS5 (фиг. 5), что указывает на межвидовые защитные эффекты флавивирусных вакцин.

Обсуждение

В течение нескольких лет мы выбрали и изучили когорту здоровых добровольцев, которые были вакцинированы YFV, с акцентом на то, как со временем развиваются реакции NK и Т-клеток. На разработку вакцин уходят годы, что может нанести вред глобальному здоровью с появлением новых патогенов. Если бы у нас было

лучшее понимание того, как работают флавивирусные вакцины и реакции, которые они вызывают, мы могли бы лучше разработать вакцины против появляющихся вирусов, таких как ZIKV, и/или улучшить вакцины TBEV или JEV, или графики иммунизации. Пока еще нет коммерческой вакцины против ZIKV, но перекрестная реактивность в иммунитете, полученная от других прививок против флавивируса, может потенциально помочь защитить людей в районах высокого риска от инфекции. Кроме того, если будущие вакцины ZIKV окажутся не совсем эффективными, совместная вакцинация с вакциной YFV может привести к улучшению вакцинации.

Вакцины TBE и JE являются относительно слабыми и требуют многократных бустерных доз, а в связи с количеством неудачных вакцин, о которых сообщалось в последние годы, существует большая потребность в улучшении. Если одновременные иммунизации приводят к более сильным иммунным реакциям, может быть получена лучшая защита от инфекции, и будет меньше неудачных вакцин. Результаты также приведут к более рентабельным схемам вакцинации, поскольку требуется меньшее количество бустерных иммунизаций, а вакцинированные будут иметь достаточную защиту в течение более длительного периода. Вакцинация может быть более экономически доступной для людей, живущих в эндемичных районах TBEV или JEV, что в конечном итоге приведет к сокращению числа инфекций и, следовательно, к снижению смертности или пожизненных осложнений, связанных с этими заболеваниями.

Изучение перекрестной реактивности вакцин к родственным патогенам важно для понимания того, как развиваются иммунные реакции на вакцины, и механизмов, вовлеченных в процесс. Полученные данные могут дать существенное представление об иммунных механизмах, стоящих за этими прививками, что может привести к улучшению стратегий вакцинации против флавивируса, а также обеспечить потенциальную защиту от вируса Зика, пока его вакцина еще находится в разработке. Собранные здесь данные способствуют нашему пониманию флавивирусных вакцин и ведут к потенциальному новому способу вакцинации.

Пример 2. Т-клеточные ответы против вируса Зика, генерируемые вакциной против желтой лихорадки.

1 февраля 2016 г. ВОЗ объявила, что отмеченные группы микроцефалии и других неврологических расстройств представляют собой чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения, имеющую международное значение (PHEIC). Эпидемия вируса Зика представляет собой беспрецедентный кризис в области здравоохранения, затрагивающий значительные районы мира (32). Эпидемия в настоящее время продолжается в Латинской Америке и Карибском бассейне, и воздействие инфекции уже наблюдается в больших

группах населения в Бразилии, Колумбии, Мексике, Перу и за их пределами. Инфекция в настоящее время остается без специального лечения или вакцины, хотя несколько вакцин-кандидатов в настоящее время находятся в стадии разработки (33).

Вирус Зика представляет собой вирус, переносимый комарами, принадлежащий к группе флавивирусов (семейство *Flaviviridae*), тесно связанный, например, с вирусом желтой лихорадки (YFV). В 1939 году Макс Тейлеру удалось аттенуировать YFV. Вскоре после этого была разработана и распространена вакцина против YFV во всем мире, и на сегодняшний день более 300 миллионов доз вакцины было введено людям (34). Действительно, вакцина YFV по-прежнему считается одной из самых эффективных вакцин в мире, где однократная доза дает иммунитет к инфекции как минимум на 10 лет (или, скорее всего, на всю жизнь) (35). В настоящей заявке мы сообщаем, что вакцина YFV генерирует перекрестно-реактивные ответы CD4 и CD8 Т-клеток на антигены вируса Зика. Обнаруженные ответы направлены на NS5-белок вируса Зика.

NS5-белок является многофункциональным, консервативным белком флавивирусов, который составляет вирусную полимеразу. Путем сравнительного анализа последовательностей белка NS5 используемой в настоящее время живой аттенуированной вакцины YFV и вируса Зика (36) мы обнаружили, что белок NS5, полученный из вакцины против желтой лихорадки, имеет 64% гомологии с вирусом Зика NS5. Это привело нас к гипотезе о том, что перекрестные реакции могут возникать между Т-клетками, полученными после вакцинации против YFV, и специфическими антигенами вируса Зика. Чтобы проверить это, у двух доноров, инфицированных вирусом Зика, брали периферическую кровь до вакцинации (день 0) и через 15 дней после (день 15) введения вакцины против YFV. Клетки стимулировали (в соответствии со стандартными методами (37)) с помощью Zika-NS5 перекрывающейся библиотеки пептидов (изолят вируса Зика из Французской Полинезии, длина 18 аминокислот и 10 перекрывающихся аминокислот; библиотека из GenScript) в течение 12 часов. Специфические для вируса Зика Т-клетки были впоследствии идентифицированы как лимфоциты, синглеты, dump- (CD19, CD14 и маркер мертвых клеток), CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ и IFN- γ ⁺TNF⁺ клетки. CD4 Т-клетки, продуцирующие как IFN- γ , так и TNF в ответ на библиотеку Zika-NS5, явно увеличивались через 15 дней после вакцинации против YFV. Аналогично, CD8 Т-клетки, продуцирующие как IFN- γ , так и TNF в ответ на библиотеку Zika-NS5, были явно увеличены через 15 дней после вакцинации против YFV (см. фиг. 8). Эти результаты показывают, что гомология между вакциной YFV и NS5 вируса Зика достаточно высока, чтобы индуцировать Зика-специфические Т-клетки как CD4, так и CD8 популяций.

Нейтрализующие антитела, продуцируемые В-клетками, являются критическими

для опосредованной вакциной защиты от вирусных заболеваний. Ранее сообщалось о перекрестно-реактивных антителах среди флавивирусов, и в настоящее время обсуждается, являются ли они защитными или вносят вклад в патогенез (38–39). Напротив, перекрестно-реактивный Т-клеточно-опосредованный иммунитет среди флавивирусов изучен недостаточно хорошо. Недавно было продемонстрировано, что вакцина против японского энцефалита генерирует Т-клетки, которые перекрестно реагируют с вирусом Денге и вирусом Западного Нила (40). Настоящие результаты показывают, что вакцина YFV генерирует клеточно-опосредованные иммунные ответы против вируса Зика.

Пример 3. Синергия в ответах, индуцированных одновременной вакцинацией против YFV и TBEV.

Методология: Кровь от первых 20 индивидуумов, иммунизированных вакцинами против YFV (день 0) и TBE (день 0 + 28) одновременно, собирали до вакцинации и в несколько моментов времени после вакцинации (фиг. 9). Индивидуумов, иммунизированных вакцинами против YFV и TBE, использовали в качестве контрольных групп. Иммунные ответы определяли несколькими различными подходами.

Ранее мы идентифицировали эпитопы как YFV, так и TBEV (10, 31), и они используются для (i) изучения фенотипа специфичных для TBE и YFV Т-клеток (включая маркеры для CD3, CD8, CD4, CD28, CTLA-4, CCR5, CD127, T-bet, Eomes, CD45RA, Ki67, CD69, перфорина, гранзима В и CD38) и (ii) изучения функций Т-клеток, индуцированных вакцинами, включая маркеры дегрануляции (CD107a), а также цитокины и хемокины (TNF, IFN- γ , MIP-1 β и IL-2).

Кинетику и амплитуду появления плазмобластов после вакцинации изучали с помощью многоцветной проточной цитометрии. Фенотипическую оценку во времени выполняли с маркерами для CD20, внутриклеточного IgG, Ki67, PD-1, HLA-DR и CD80. Наши пилотные эксперименты показали, что плазмобласты легко обнаруживаются после бустерной иммунизации против TBEV, что указывает на осуществимость этого подхода (фиг. 3).

Elispot используют для функциональной проверки того, что обнаруженные плазмобласты специфичны для вакцины. Такие методы в настоящее время установлены в нашей лаборатории (см. Jahnmatz et al, 2013, J Immunol Methods, 391 (1-2): 50-9).

Нейтрализующие антитела оценивали с использованием реакции нейтрализации бляшкообразования (22) и сопоставляли с количеством специфических для вакцины В-клеток памяти и количеством плазмобластов.

Проводят мультиплексный анализ сывороток во всех моментах времени, и будут

определены воспалительные цитокины вместе с врожденными и адаптивными цитокинами.

Пример 4. Синергизм в ответах, вызванных одновременной вакцинацией с YFV и JEV.

Методология: Кровь от 20 индивидуумов, иммунизированных вакцинами YFV (день 0) и JEV (день 0 + 28) одновременно, собирали до и в несколько моментов времени после вакцинации (с тем же графиком сбора, что и в Примере 3, фиг. 1). Индивидуумов, иммунизированных вакцинами YFV и JE, использовали в качестве контрольных групп. Иммунные ответы затем определяли с помощью тех же подходов, что и в Примере 3.

Вакцину YFV вводили в день 0 одновременно с вакциной JEV и бустерной вакциной JEV в день 28. Раннюю активацию врожденного механизма оценивали с использованием тех же подходов, которые описаны в Примере 3.

Пример 5. Перекрестная реактивность YFV-вакцинации к ZIKV.

Методология. Мы собрали группу здоровых добровольцев, которые были вакцинированы против вируса желтой лихорадки. МНПК и сыворотки собирали до и через 10, 15 и 90 дней после введения вакцины. Чтобы измерить возможные перекрестно-реактивные Т-клетки, мы создали перекрывающиеся пептидные библиотеки консервативной области NS5 вирусов ZIKV и TBE.

Перекрывающиеся пептидные библиотеки ZIKV и TBEV использовали для активации Т-клеток у вакцинированных YFV доноров.

Ответы, индуцированные пептидами ZIKV и TBEV у вакцинированных YFV индивидуумов, изучают с помощью проточной цитометрии. У нас будут маркеры для CD4 (Т-хелперы) и CD8 (цитотоксические Т-клетки) вместе с классическими маркерами для функции Т-клеток (IFN- γ , MIP-1 β , IL-2).

Тетрамеры HLA класса I генерируются для выбранных эпитопов для изучения внешнего вида, амплитуды и фенотипа перекрестно-реактивных Т-клеток.

Последовательности NS5

YFV asibi (SEQ ID NO: 36)

VSRGTAKLRWFHERGYVKLEGRVIDLGCGRGGWCYAAAAQKEVSGVKGFTLGRDGHEKPMNVQSLGWNIIITF
KDKTDIHRLEPVKCDTLLCDIGESSSSSVTEGERTVRVLDTVEKWLACGVDNFCVKVLAPYMPDVLEKLELL
QRRFGGTIVRNPLSRNSTHEMYVSGAR

TLEADVILPIGTRSVETDKGPLDKEAIEERVERIKSEYMTSWFYDNDNPYRTWHYCGSYVTKTSGSAASMVN
GVIKILTYPDRIEEVTRMAMTDITPFGQQRVFKEKVDTRAKDPPAGTRKIMKVVNRWLFRLHAREKNPRLC
TKEEFIKVRSHAAIGAYLEEQQWKTANEAVQDPKFELVDEERKLHQQGRCTCVYNNMGKREKKLSEFG
KAKGSRAIWYMWLGARYLEFEALGFLNEDHWASRENSGGGVEGIGLQYLYGVIRDLAAMDGGGFFYADDTAGW
DTRITEADLDDEQEILNYMSPHHKKLAQAVMEMTYKNKVVKVLRPAPGGKAYMDVISRRDQRGSGQVVTYAL
NTITNLKVQLIRMAEAEMVIHHQHVDQDCESVLTRLEAWLTHGNCNRLKRMVSGDDCVVRPIDDRFGLALS
HLNAMS KVRKDI SEWQPSKGWNDWENVFPCSHHFELQLKDGRRI VVPCREQDELIGRGRVSPGNGWMIKET
ACLSKAYANMWSLMYFHKRDMRLLSLAVSSAVPTSWVPQGRITWTSIHGKGEWMTTEDMLEVWNRVWITNNPH
MQDKTMVKWRDVPYLTQRQDKLCSLIGMTNRATWASHIHLVIRIRTLIGQEKYTDYLTVM DRYSDADL
Q

YFV 17DD (YF VAX) (SEQ ID NO: 37)

VSRGTAKLRWFHERGYVKLEGRVIDLGCGRGGWCYAAAAQKEVSGVKGFTLGRDGHEKPMNVQSLGWNIIITF
KDKTDIHRLEPVKCDTLLCDIGESSSSSVTEGERTVRVLDTVEKWLACGVDNFCVKVLAPYMPDVLEK
LELLQRRFGGTIVRNPLSRNSTHEMYVSGAR

TLEADVILPIGTRSVETDKGPLDKEAIEERVERIKSEYMTSWFYDNDNPYRTWHYCGSYVTKTSGSAASMVN
GVIKILTYPDRIEEVTRMAMTDITPFGQQRVFKEKVDTRAKDPPAGTRKIMKVVNRWLFRLHAREKSPRLC
TKEEFIKVRSHAAIGAYLEEQQWKTANEAVQDPKFELVDEERKLHQQGRCTCVYNNMGKREKKLSEFG
KAKGSRAIWYMWLGARYLEFEALGFLNEDHWASRENSGGGVEGIGLQYLYGVIRDLAAMDGGGFFYADDTAGW
DTRITEADLDDEQEILNYMSPHHKKLAQAVMEMTYKNKVVKVLRPAPGGKAYMDVISRRDQRGSGQVVTYAL
NTITNLKVQLIRMAEAEMVIHHQHVDQDCESVLTRLEAWLTHGNCNRLKRMVSGDDCVVRPIDDRFGLALS
HLNAMS KVRKDI SEWQPSKGWNDWENVFPCSHRFELQLKDGRRI VVPCREQDELIGRGRVSPGNGWMIKET
ACLSKAYANMWSLMYFHKRDMRLLSLAVSSAVPTSWVPQGRITWTSIHGKGEWMTTEDMLEVWNRVWITNNPH
MQDKTMVKWRDVPYLTQRQDKLCSLIGMTNRATWASHIHLVIRIRTLIGQE
KYTDYLTVM DRYSDADLQ

YFV 17D204 (Stamaril) (SEQ ID NO: 38)

VSRGTAKLRWFHERGYVKLEGRVIDLGCGRGGWCYAAAAQKEVSGVKGFTLGRDGHEKPMNVQSLGWNIIITF
KDKTDIHRLEPVKCDTLLCDIGESSSSSVTEGERTVRVLDTVEKWLACGVDNFCVKVLAPYMPDVLEKLELL
QRRFGGTIVRNPLSRNSTHEMYVSGAR

TLEADVILPIGTRSVETDKGPLDKEAIEERVERIKSEYMTSWFYDNDNPYRTWHYCGSYVTKTSGSAASMVN
GVIKILTYPDRIEEVTRMAMTDITPFGQQRVFKEKVDTRAKDPPAGTRKIMKVVNRWLFRLHAREKNPRLC
TKEEFIKVRSHAAIGAYLEEQQWKTANEAVQDPKFELVDEERKLHQQGRCTCVYNNMGKREKKLSEFG
KAKGSRAIWYMWLGARYLEFEALGFLNEDHWASRENSGGGVEGIGLQYLYGVIRDLAAMDGGGFFYADDTAGW
DTRITEADLDDEQEILNYMSPHHKKLAQAVMEMTYKNKVVKVLRPAPGGKAYMDVISRRDQRGSGQVVTYAL
NTITNLKVQLIRMAEAEMVIHHQHVDQDCESVLTRLEAWLTHGNCNRLKRMVSGDDCVVRPIDDRFGLALS
HLNAMS KVRKDI SEWQPSKGWNDWENVFPCSHHFELQLKDGRRI VVPCREQDELIGRGRVSPGNGWMIKET
ACLSKAYANMWSLMYFHKRDMRLLSLAVSSAVPTSWVPQGRITWTSIHGKGEWMTTEDMLEVWNRVWITNNPH
MQDKTMVKWRDVPYLTQRQDKLCSLIGMTNRATWASHIHLVIRIRTLIGQEKYTDYLTVM DRYSDADL
Q

Пример 6. Перекрестная реактивность YFV-вакцинации с JEV

Методология:

Для картирования Т-клеточных эпитопов свежеизолированные МНКПК от одного ранее JEV-отрицательного донора, получающего вакцину YFV, инкубировали с библиотекой пептидов JEV NS5 (18-мерные пептиды, чистота 70%, перекрывание белка NS5 JEV) в течение 12 часов в присутствии брэфельдина А и монензина (Sigma-Aldrich).

Для фенотипического анализа клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C в темноте с поверхностными мАт. Для внутриклеточного окрашивания TNF и IFN-γ клетки фиксировали и пермеабилizировали в Fix/Perm (eBioscience) в течение 30 минут при 4°C в темноте.

Следующие мАт использовали в проточной цитометрии: анти-CD4 Brilliant ultraviolet 737, анти-CD8 Brilliant ultraviolet 395, анти-CD3 PE-Cy5, анти-TNF Pacific Blue, анти-IFN- γ Brilliant Violet 785, ближний ИК, анти-CD19 V500, анти CD14 V500. Данные проточной цитометрии были получены на BD LSRFortessa (BD Biosciences) и проанализированы.

Результаты:

На фиг. 11 показаны CD8 Т-клетки от одного донора, получающего вакцину YVF (донор Ву4), до вакцинации (день 0) и через 15 дней после вакцинации. Продукция TNF увеличилась с 0,03% до 0,3%, что является 10-кратным увеличением ответа на пептидную библиотеку JEV NS5.

Выводы:

Фиг. 11 демонстрирует, что JEV-специфические Т-клетки, способные продуцировать TNF в ответ на пептиды JEV, возникают, когда применяют вакцину YFV по отдельности.

Список литературы

1. Organization, W. H. *Japanese Encephalitis*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs386/en/>> (2015).
2. Organization, W. H. *Yellow fever*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>> (2014).
3. Organization, W. H. *Dengue and severe dengue*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> (2016).
4. Lindquist, L. & Vapalahti, O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* **371**, 1861-1871, doi:10.1016/s0140-6736(08)60800-4 (2008).
5. Organization, W. H. *Zika virus*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>> (2016).
6. Ahmed, R. & Akondy, R. S. Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunol Cell Biol* **89**, 340-345, doi:10.1038/icb.2010.155 (2011).
7. Pulendran, B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol* **9**, 741-747, doi:10.1038/nri2629 (2009).
8. Miller, J. D. *et al.* Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* **28**, 710-722, doi:10.1016/j.immuni.2008.02.020 (2008).
9. Akondy, R. S. *et al.* The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* **183**, 7919-7930, doi:10.4049/jimmunol.0803903 (2009).

10. Blom, K. *et al.* Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol* **190**, 2150-2158, doi:10.4049/jimmunol.1202234 (2013).
11. Marquardt, N. *et al.* The Human NK Cell Response to Yellow Fever Virus 17D Is Primarily Governed by NK Cell Differentiation Independently of NK Cell Education. *J Immunol* **195**, 3262-3272, doi:10.4049/jimmunol.1401811 (2015).
12. Andersson, C. R. *et al.* Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis. *Vaccine* **28**, 2827-2831, doi:10.1016/j.vaccine.2010.02.001 (2010).
13. Haglund, M. & Gunther, G. Tick-borne encephalitis--pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* **21 Suppl 1**, S11-18 (2003).
14. Donoso Mantke, O., Schadler, R. & Niedrig, M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill* **13** (2008).
15. Halstead, S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr* **2**, doi:10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014 (2014).
16. Mansfield, K. L. *et al.* Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol* **92**, 2821-2829, doi:10.1099/vir.0.031641-0 (2011).
17. Dejnirattisai, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*, doi:10.1038/ni.3515 (2016).
18. Hoke, C. H. *et al.* Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines. *N Engl J Med* **319**, 608-614, doi:10.1056/NEJM198809083191004 (1988).
19. Turtle, L. *et al.* Human T cell responses to Japanese encephalitis virus in health and disease. *J Exp Med*, doi:10.1084/jem.20151517 (2016).
20. Turtle, L. *et al.* Cellular Immune Responses to Live Attenuated Japanese Encephalitis (JE) Vaccine SA14-14-2 in Adults in a JE/Dengue Co-Endemic Area. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005263, doi:10.1371/journal.pntd.0005263 (2017).
21. *Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species*, <<http://currents.plos.org/outbreaks/article/identifying-candidate-targets-of-immune-responses-in-zika-virus-based-on-homology-to-epitopes-in-other-flavivirus-species/>> (2016).
22. Vene, S., Haglund, M., Vapalahti, O. & Lundkvist, A. A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis virus. *J Virol Methods* **73**, 71-75 (1998).
23. Querec, T. D. *et al.* Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* **10**, 116-125, doi:10.1038/ni.1688 (2009).
24. Wrammert, J. *et al.* Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during

acute dengue virus infection in humans. *J Virol* **86**, 2911-2918, doi:10.1128/JVI.06075-11 (2012).

25. Beuneu, H., Garcia, Z. & Bousso, P. Cutting edge: cognate CD4 help promotes recruitment of antigen-specific CD8 T cells around dendritic cells. *J Immunol* **177**, 1406-1410 (2006).

26. Castellino, F. *et al.* Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890-895, doi:10.1038/nature04651 (2006).

27. Kumamoto, Y., Mattei, L. M., Sellers, S., Payne, G. W. & Iwasaki, A. CD4+ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 8749-8754, doi:10.1073/pnas.1100567108 (2011).

28. Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. & Iwasaki, A. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* **462**, 510-513, doi:10.1038/nature08511 (2009).

29. Strutt, T. M. *et al.* Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* **16**, 558-564, 551p following 564, doi:10.1038/nm.2142 (2010).

30. Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* **85**, 9-18; quiz 18, 21, doi:10.1016/S1081-1206(10)62426-X (2000).

31. Blom, K. *et al.* Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection. *PLoS Pathog* **11**, e1004622, doi:10.1371/journal.ppat.1004622 (2015).

32. Gostin LO, Hodge JG, Jr. Zika virus and global health security. *The Lancet Infectious Diseases*; 16(10): 1099-100.

33. Vannice KS, Giersing BK, Kaslow DC, et al. Meeting Report: WHO consultation on considerations for regulatory expectations of Zika virus vaccines for use during an emergency. *Vaccine* 2016.

34. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. *Vaccines*: Elsevier/Saunders; 2012.

35. Yellow fever vaccination booster not needed. World Health Organization.

36. Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparac-Goffart I, de Lamballerie X. Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. *Genome Announc* 2014; 2(3).

37. Blom K, Braun M, Pakalniene J, et al. Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection. *PLoS Pathog* 2015; 11(1): e1004622.

38. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, et al. Flavivirus-induced antibody cross-

reactivity. *J Gen Virol* 2011; 92(Pt 12): 2821-9.

39. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol* 2016.

40. Turtle L, Tatullo F, Bali T, et al. Cellular Immune Responses to Live Attenuated Japanese Encephalitis (JE) Vaccine SA14-14-2 in Adults in a JE/Dengue Co-Endemic Area. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11(1): e0005263.

41. Jolles S, Sewell WA, Misbah SA. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* 2005; **142**(1): 1-11.

42. Vene S, Haglund M, Vapalahti O, Lundkvist A. A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis virus. *J Virol Methods* 1998; **73**(1): 71-5.

43. Kuivanen S, Hepojoki J, Vene S, Vaheri A, Vapalahti O. Identification of linear human B-cell epitopes of tick-borne encephalitis virus. *Virol J* 2014; **11**: 115.

44. Brandler S, Tangy F. Vaccines in development against West Nile virus. *Viruses* 2013; **5**(10): 2384-409.

45. Vannice KS, Giersing BK, Kaslow DC, et al. Meeting Report: WHO consultation on considerations for regulatory expectations of Zika virus vaccines for use during an emergency. *Vaccine* 2016.

46. Weissbach FH, Hirsch HH. Comparison of Two Commercial Tick-Borne Encephalitis Virus IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Clin Vaccine Immunol* 2015; **22**(7): 754-60.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинная композиция, содержащая вакцину против вируса желтой лихорадки, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

2. Применение вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки, при изготовлении медикамента для вакцинации индивидуума от инфекции флавивирусом, где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

3. Способ вакцинации индивидуума против флавивирусной инфекции, включающий стадию введения индивидууму вакцинной композиции, содержащей вакцину против вируса желтой лихорадки; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

4. Вакцинная композиция для применения по п. 1, или применения по п. 2, или способ по п. 3, где индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса.

5. Вакцинная композиция для применения по п. 1, или применение по п. 2, или способ по п. 3, где индивидуум ранее не был инфицирован вирусом желтой лихорадки и/или вакцинирован вакциной против вируса желтой лихорадки.

6. Вакцинная композиция для применения по п. 1, или применение по п. 2, или способ по п. 3, где индивидуум ранее был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса.

7. Вакцинная композиция для применения по п. 1, или применение по п. 2, или способ по п. 3, где индивидуум был ранее инфицирован вирусом желтой лихорадки и/или вакцинирован вакциной против вируса желтой лихорадки.

8. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где флавивирус представляет собой один или несколько флавивирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса Зика, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила, вируса энцефалита Сент-Луис, вируса омской геморрагической лихорадки.

9. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где флавивирус не является вирусом лихорадки денге.

10. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом предотвращает и/или уменьшает последующую инфекцию флавивирусом.

11. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где вакцинация индивидуума против инфекции

флавивирусом предотвращает и/или уменьшает одно или несколько расстройств и/или состояний, связанных с инфекцией флавивирусом.

12. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 10 или 11, где профилактика и/или уменьшение эффективны в течение периода до 1 года, или 5 лет, или 10 лет.

13. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 10-12, где уменьшение составляет 100%, или 90%, или 80%, или 70%, или 60% или 50%.

14. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом создает и/или повышает иммунитет индивидуума против флавивируса.

15. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 14, где иммунитет включает клеточный иммунитет и/или адаптивный иммунитет у индивидуума против флавивируса.

16. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 15, где клеточный иммунитет включает активность Т-клеток у индивидуума против флавивируса.

17. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 16, где активность Т-клеток включает активность CD4⁺ Т-клеток и/или активность CD8⁺ Т-клеток.

18. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 15, где адаптивный иммунитет включает активность В-клеток и/или активность антител у индивидуума против флавивируса.

19. Вакцинная композиция, включающая вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции, вызванной флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

20. Применение вакцинной композиции, включающей вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, при производстве медикамента для вакцинации индивидуума против инфекции, вызванной флавивирусом; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

21. Способ вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом, включающий стадию введения индивидууму вакцинной композиции, включающей вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

22. Вакцинная композиция, включающая вакцину против вируса желтой лихорадки, для применения при вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом; где применение включает введение индивидууму вакцины против вируса желтой лихорадки и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса; и где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

23. Применение вакцинной композиции, включающей вакцину против вируса желтой лихорадки, при изготовлении медикамента для вакцинации человека против инфекции флавивирусом; где применение включает введение индивидууму вакцины против вируса желтой лихорадки и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса; и где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

24. Способ вакцинации индивидуума против инфекции флавивирусом, включающий стадии введения индивидууму вакцины против вируса желтой лихорадки и одной или нескольких дополнительных вакцин против флавивируса; где флавивирус не является вирусом желтой лихорадки.

25. Вакцинная композиция для применения по п. 22, или применение по п. 23, или способ по п. 24, где вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят индивидууму одновременно.

26. Вакцинная композиция для применения по п. 22, или применение по п. 23, или способ по п. 24, где вакцину против вируса желтой лихорадки и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса вводят индивидууму последовательно.

27. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-26, где одна или несколько дополнительных вакцин выбраны из группы, состоящей из вакцины против вируса Зика, вакцины против вируса клещевого энцефалита, вакцины против вируса японского энцефалита, вакцины против вируса лихорадки Западного Нила, вакцины против вируса энцефалита Сент-Луис, вакцины против омской геморрагической лихорадки.

28. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-27, где одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса клещевого энцефалита, и предназначены для вакцинации человека против инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита.

29. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-27, где одна или несколько дополнительных вакцин представляют собой вакцину против вируса японского энцефалита, и предназначены для вакцинации человека против инфекции вирусом японского энцефалита.

30. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по

любому из пп. 19-29, где индивидуум ранее не был инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса.

31. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-29, где индивидуум ранее не был инфицирован вирусом желтой лихорадки и/или вакцинирован вакциной против вируса желтой лихорадки.

32. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-29, где индивидуум был ранее инфицирован флавивирусом и/или вакцинирован против флавивируса.

33. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-29, где индивидуум ранее был инфицирован вирусом желтой лихорадки и/или вакцинирован вакциной против вируса желтой лихорадки.

34. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-33, где флавивирус представляет собой один или несколько флавивирусов, выбранных из группы, состоящей из вируса Зика, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила, вируса энцефалита Сент-Луис, вируса омской геморрагической лихорадки.

35. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-33, где флавивирус не является вирусом лихорадки денге.

36. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-35, где вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом предотвращает и/или уменьшает последующую инфекцию флавивирусом.

37. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-36, где вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом предотвращает и/или уменьшает одно или несколько расстройств и/или состояний, связанных с инфекцией флавивирусом.

38. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 36 или п. 37, где профилактика и/или уменьшение эффективны в течение периода до 1 года, или 5 лет, или 10 лет.

39. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из п.п.36-38, где уменьшение составляет 100%, или 90%, или 80%, или 70%, или 60%, или 50%.

40. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из пп. 19-39, где вакцинация индивидуума против инфекции флавивирусом вызывает и/или повышает иммунитет индивидуума против флавивируса.

41. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 40,

где иммунитет включает клеточный иммунитет и/или адаптивный иммунитет у индивидуума против флавивируса.

42. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 41, где клеточный иммунитет включает активность Т-клеток у индивидуума против флавивируса.

43. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 42, где активность Т-клеток включает активность CD4⁺ Т-клеток и/или активность CD8⁺ Т-клеток.

44. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 41, где адаптивный иммунитет включает активность В-клеток и/или активность антител у индивидуума против флавивируса.

45. Применение вакцины против желтой лихорадки в качестве адъюванта.

46. Применение по п. 45, где вакцину против желтой лихорадки используют в качестве адъюванта для вакцины, например, инаktivированной вакцины.

47. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где вакцина против вируса желтой лихорадки представляет собой живую вакцину и предпочтительно представляет собой живую аттенуированную вакцину.

48. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где вакцина против вируса желтой лихорадки содержит неструктурный белок вируса желтой лихорадки или его фрагмент, вариант или производное.

49. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где вакцина против вируса желтой лихорадки содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую неструктурный белок вируса желтой лихорадки, или его фрагмент, вариант или производное.

50. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 48 или п. 49, где неструктурный белок вируса желтой лихорадки включает белок NS5 или его фрагмент, вариант или производное.

51. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по любому из предыдущих пунктов, где индивидуум представляет собой млекопитающее.

52. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ по п. 50, где млекопитающее представляет собой человека или млекопитающее, не являющееся человеком.

53. Вакцинная композиция, содержащая вакцину против вируса желтой лихорадки

и одну или несколько дополнительных вакцин против флавивируса, а также фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

54. Вакцинная композиция по п. 53, где вакцина против вируса желтой лихорадки является такой, как определено в любом из пп. 19-52.

55. Вакцинная композиция по п. 53 или п. 54, в которой одна или несколько дополнительных вакцин против флавивируса являются такими, как определено в любом из пп. 19-52.

56. Вакцинная композиция по любому из пп. 53-55, содержащая вакцину против вируса желтой лихорадки и вакцину против вируса клещевого энцефалита.

57. Вакцинная композиция по любому из пп. 53-55, содержащая вакцину против вируса желтой лихорадки и вакцину против вируса японского энцефалита.

58. Набор, содержащий вакцину против вируса желтой лихорадки по любому из пп. 1-52 и одну или несколько вакцин против флавивируса, как определено в любом из пп. 19-52.

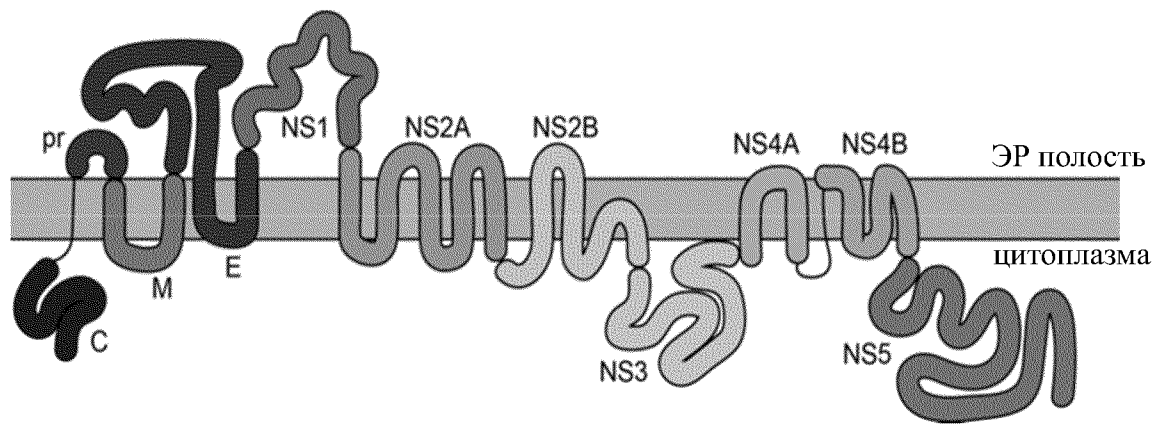
59. Набор по п. 58, в котором одна или несколько вакцин против флавивируса представляет собой вакцину против вируса клещевого энцефалита.

60. Набор по п. 58, в котором одна или несколько вакцин против флавивируса представляет собой вакцину против вируса японского энцефалита.

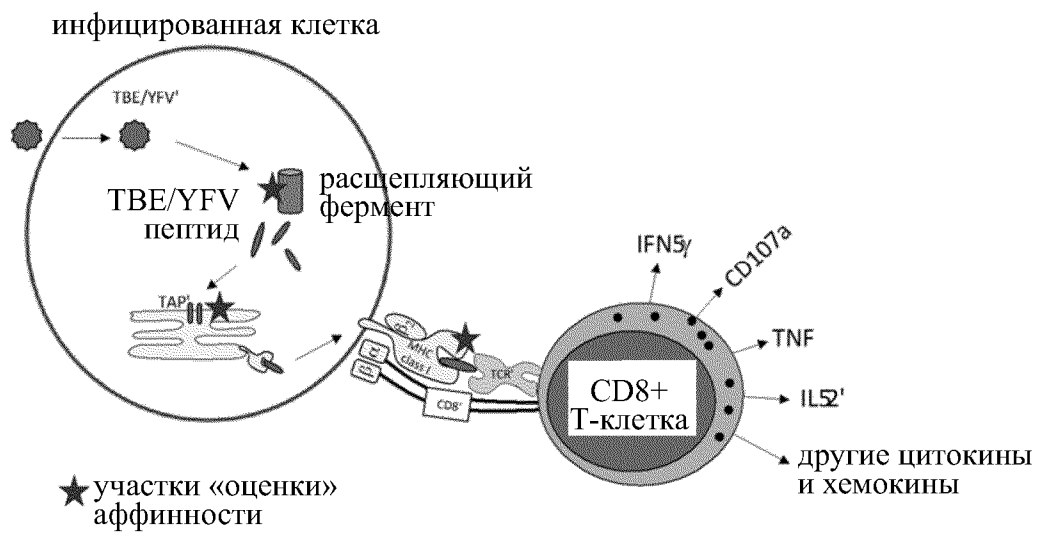
61. Вакцинная композиция для применения, или применение, или способ, по существу, как заявлено в данном документе со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, описание, примеры и фигуры.

62. Вакцинная композиция, по существу, как заявлено в настоящем документе со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, описание, примеры и фигуры.

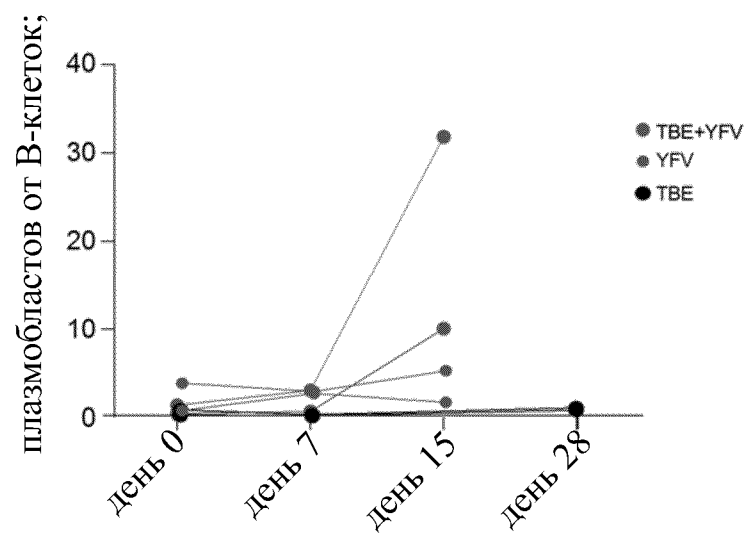
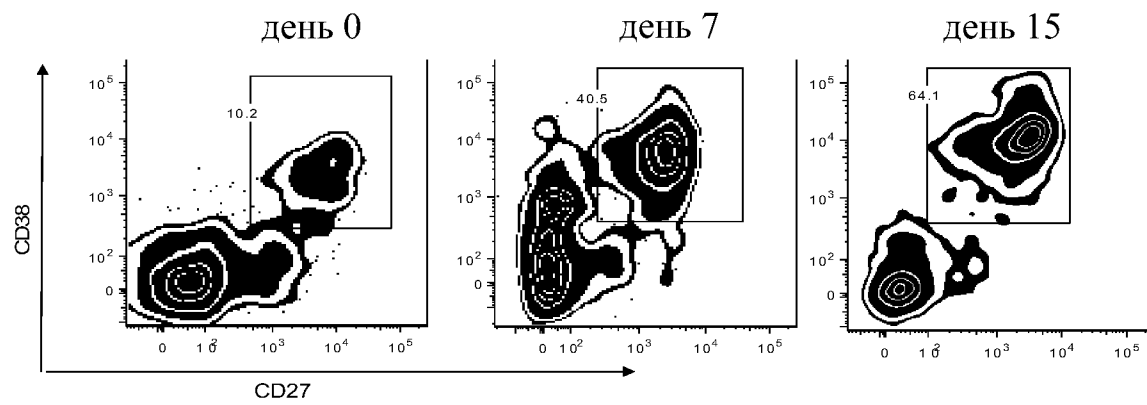
63. Набор, по существу, как заявлено в данном документе со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения, описание, примеры и фигуры.



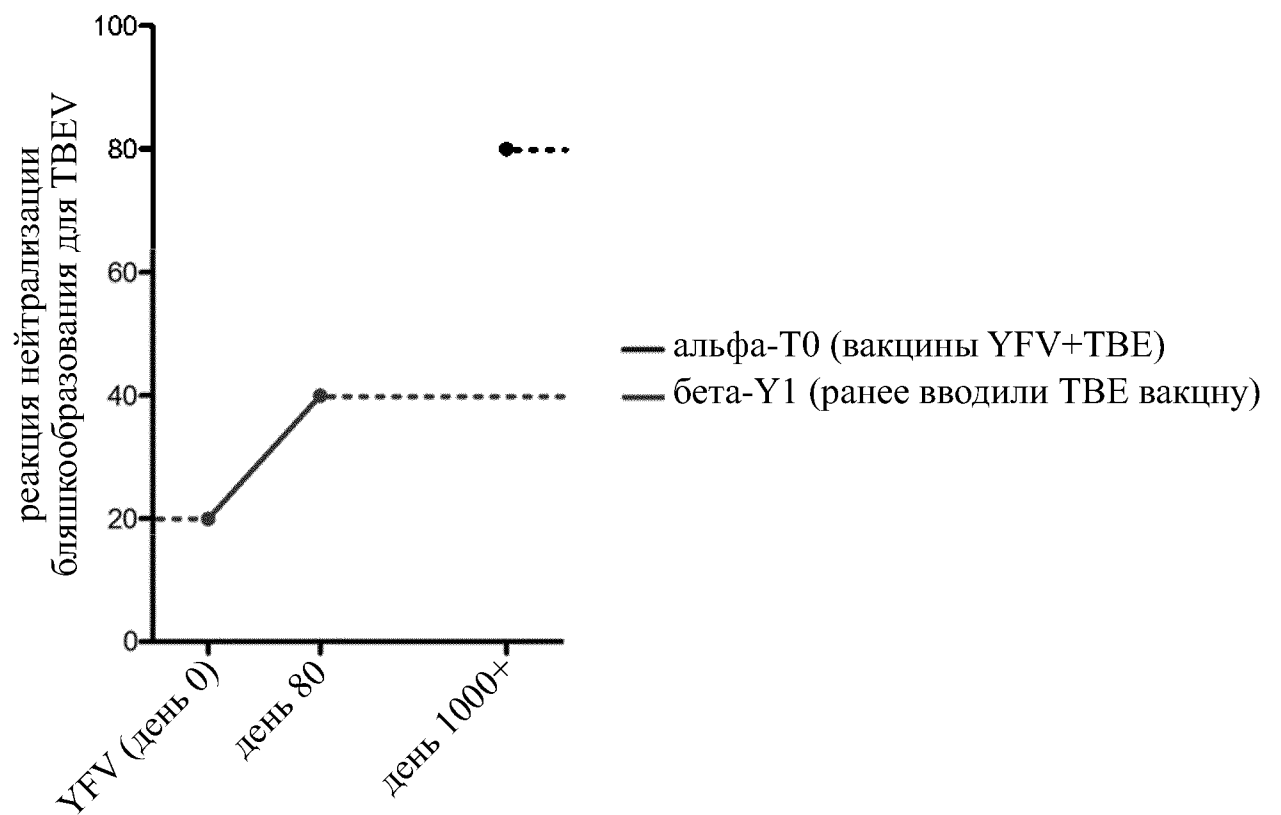
Фиг. 1



Фиг. 2

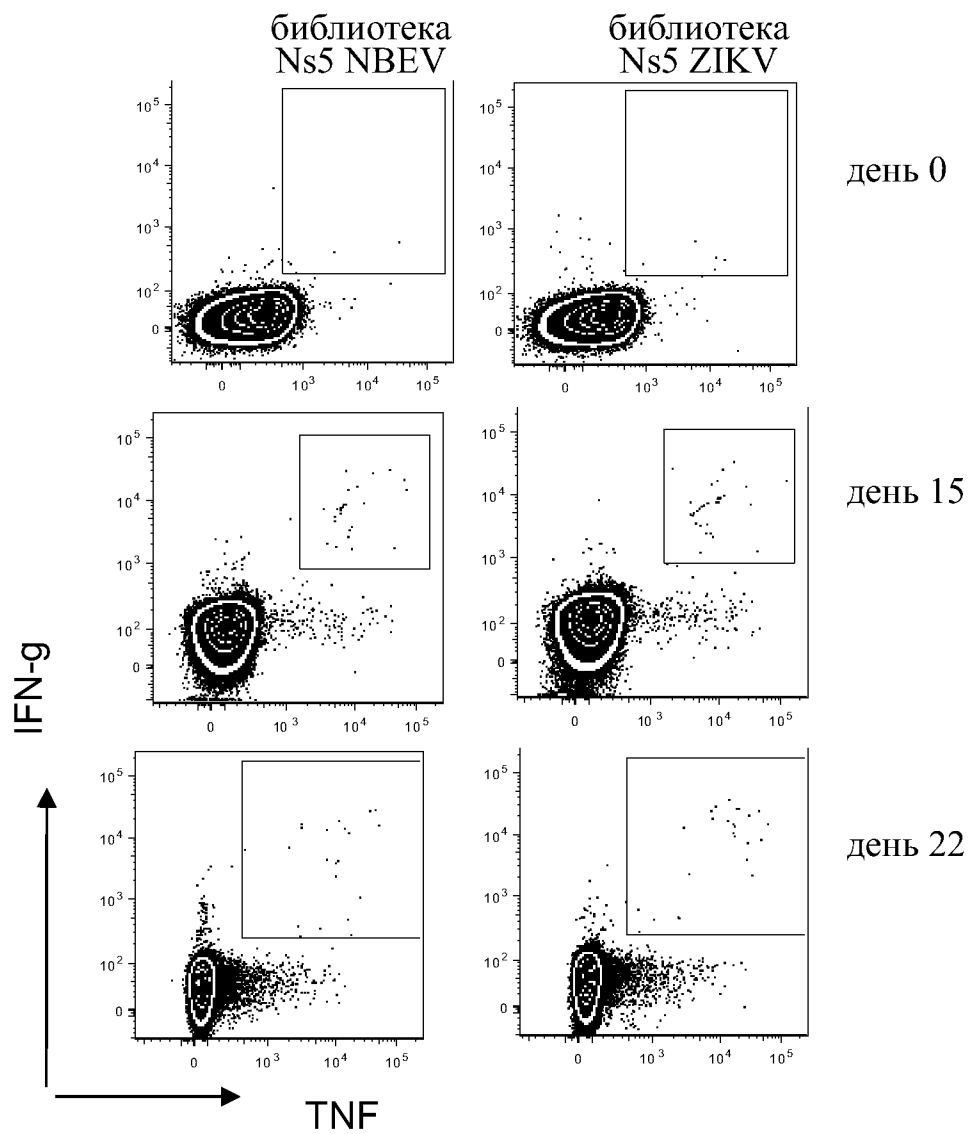


Фиг. 3

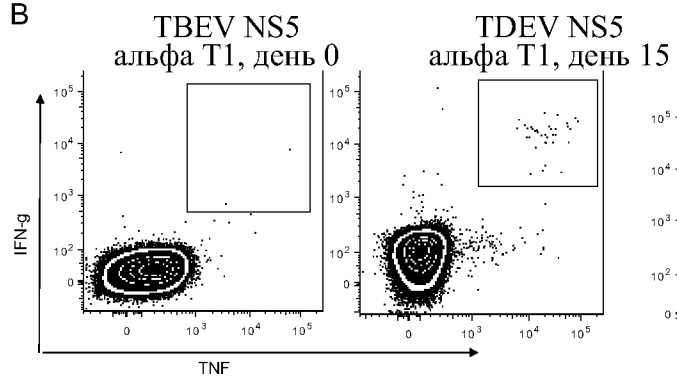


Фиг. 4

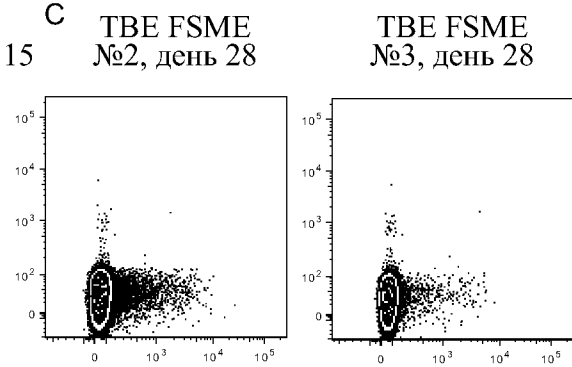
A



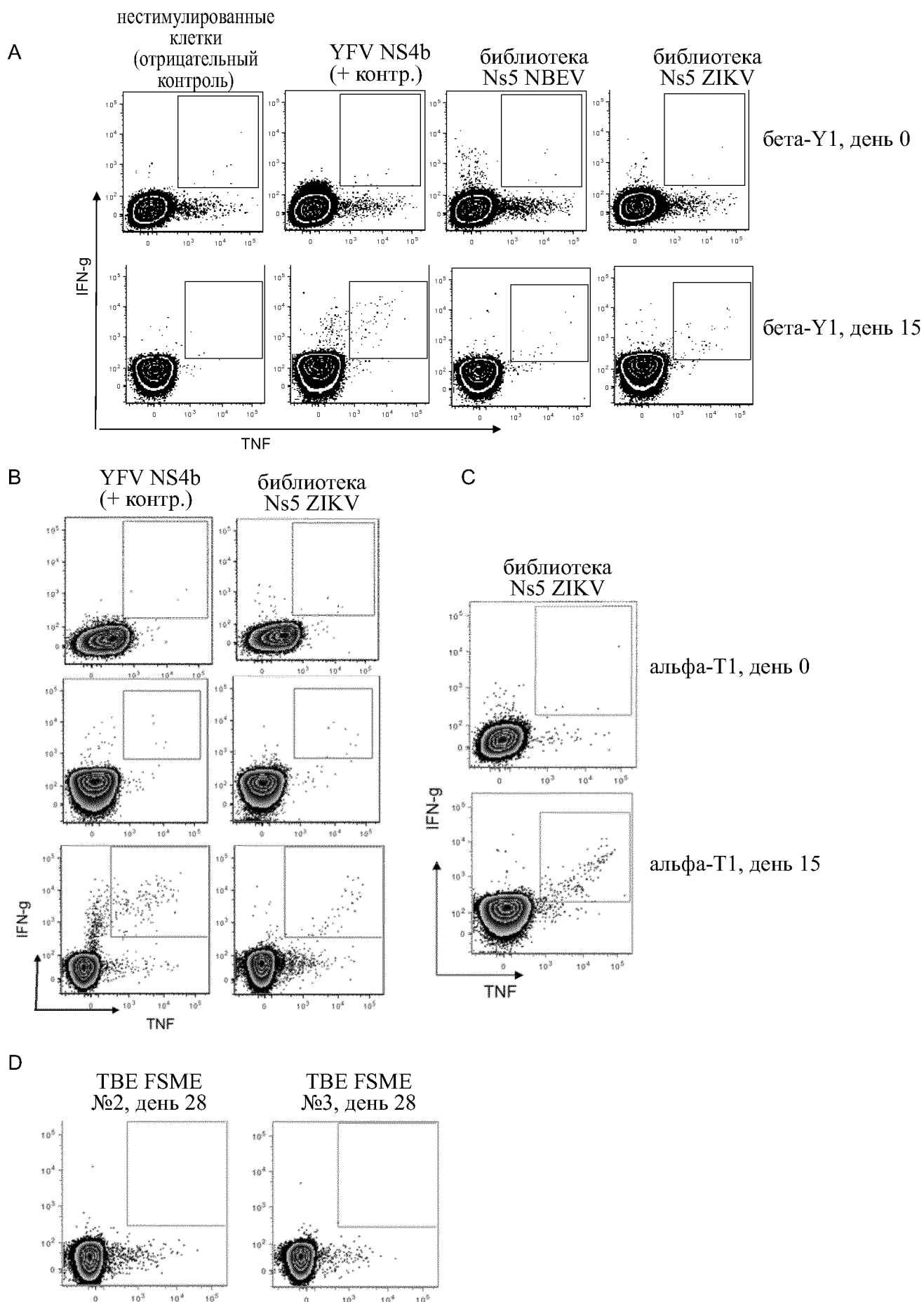
B



C

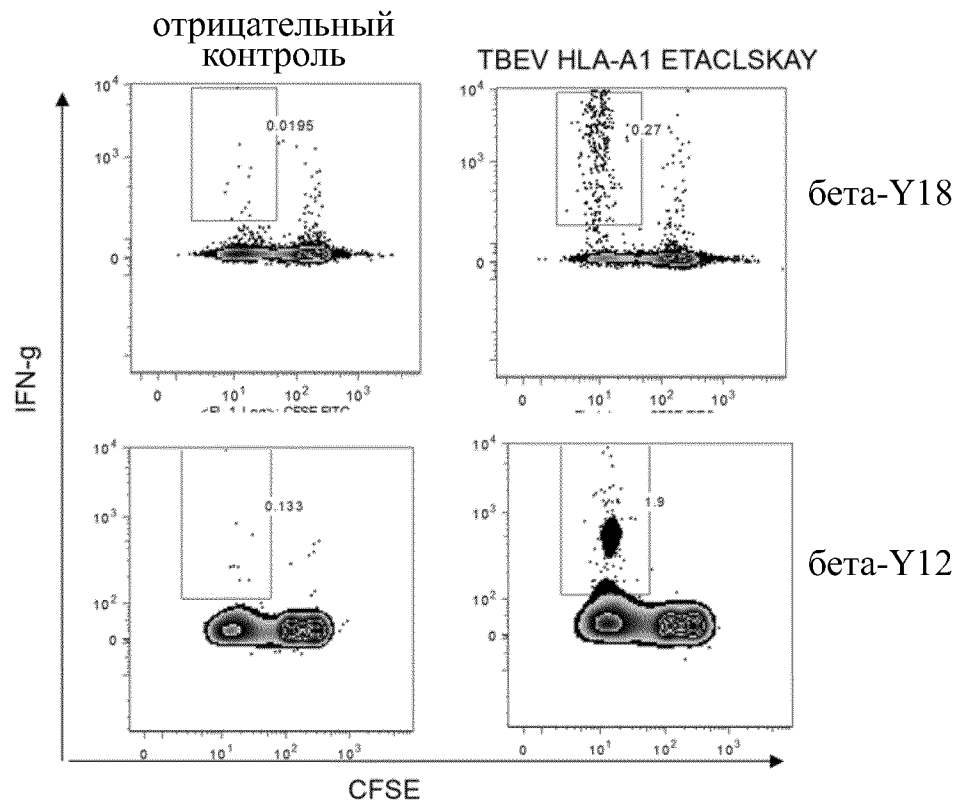


Фиг. 5

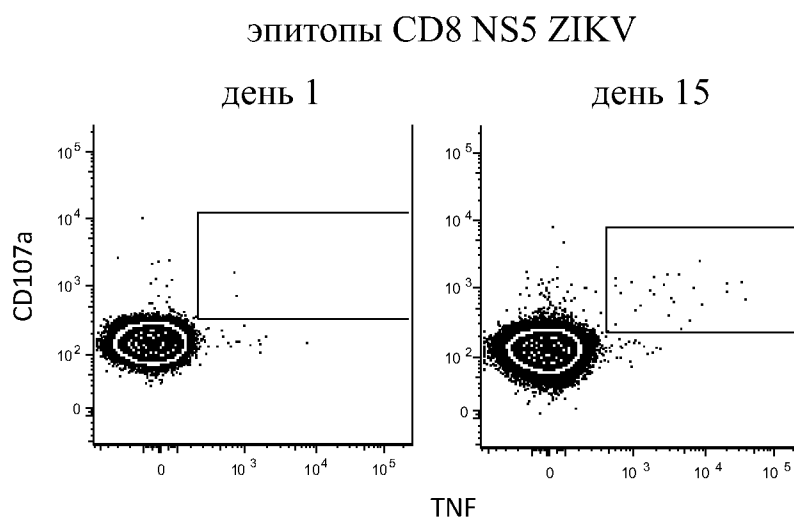


Фиг. 6

A

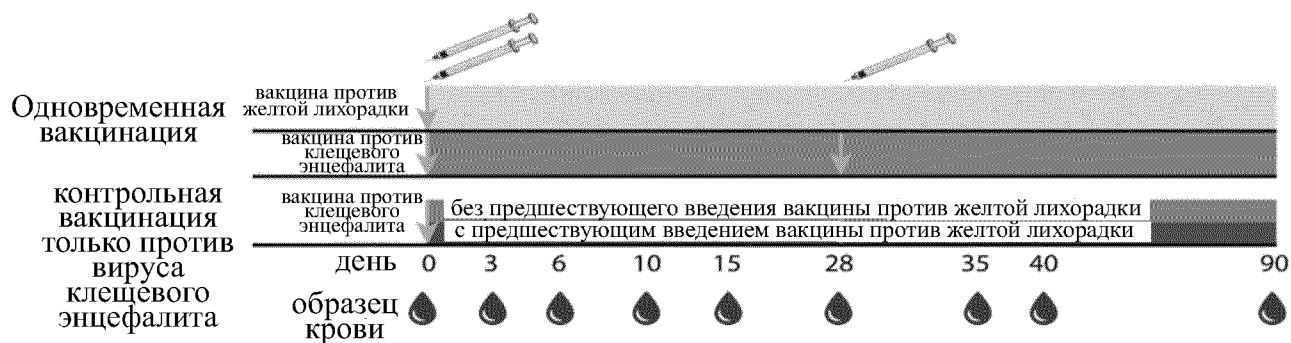
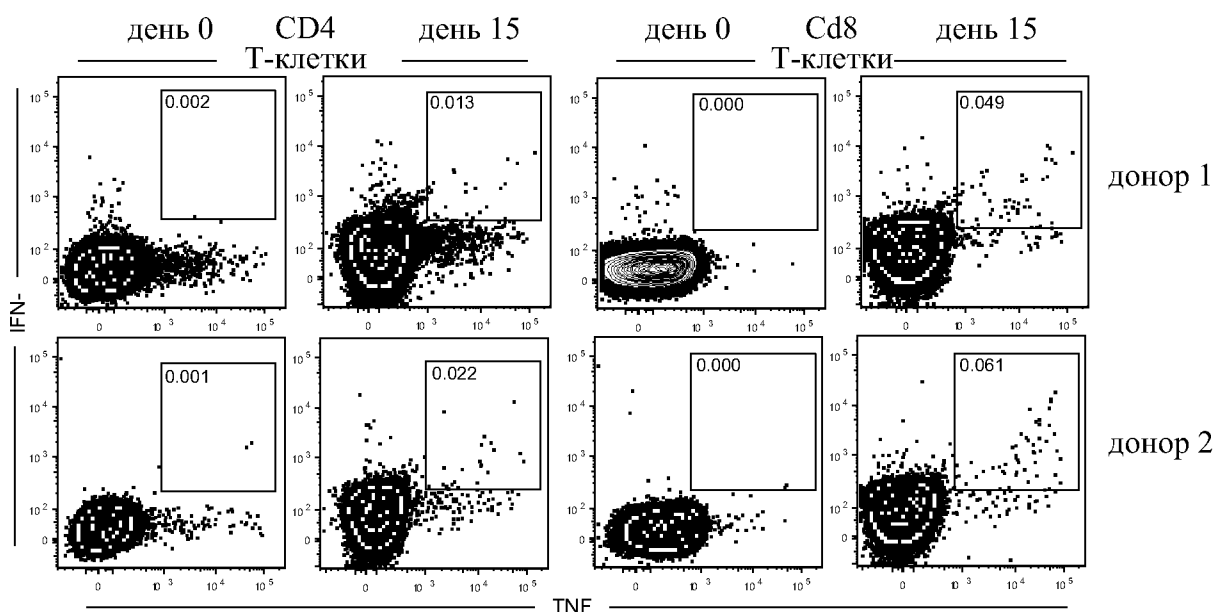


B

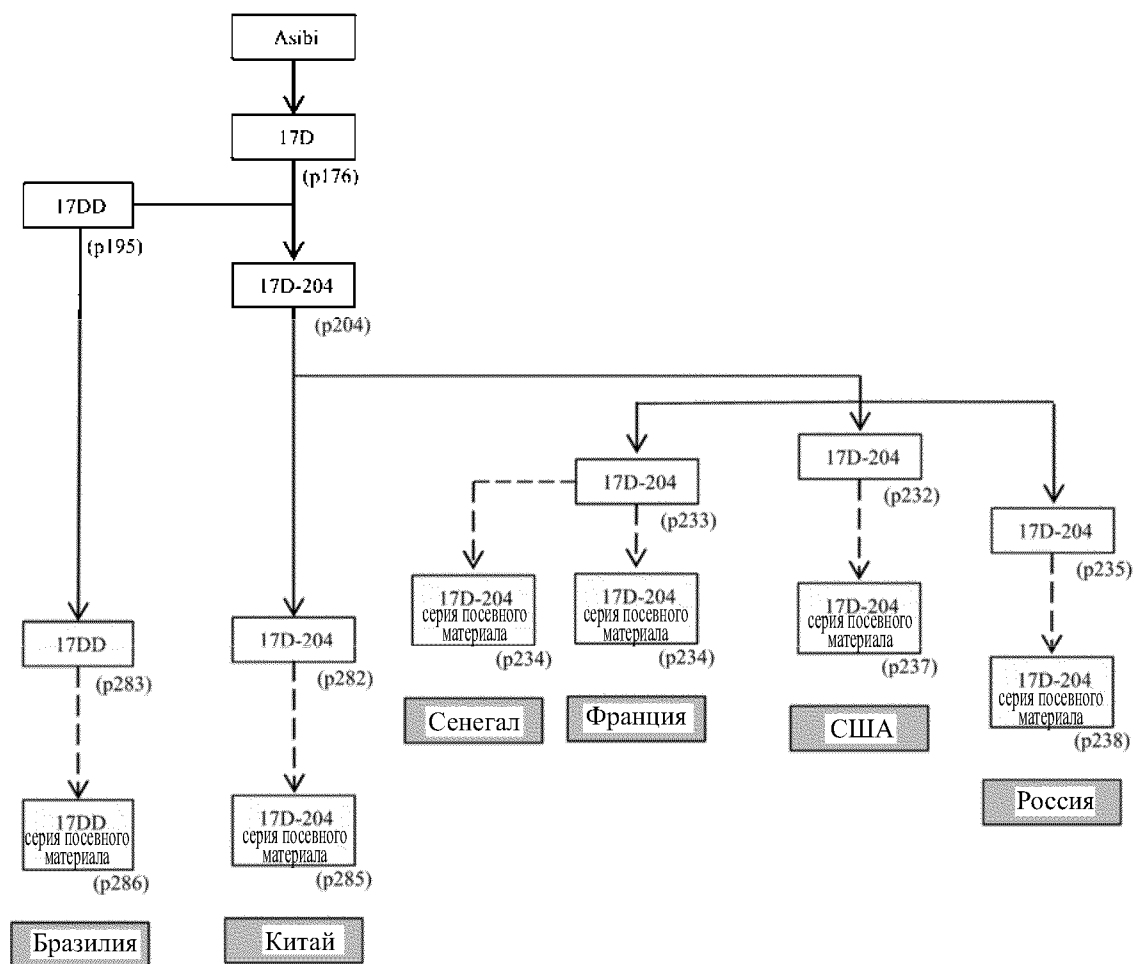


Фиг. 7

Фиг. 8

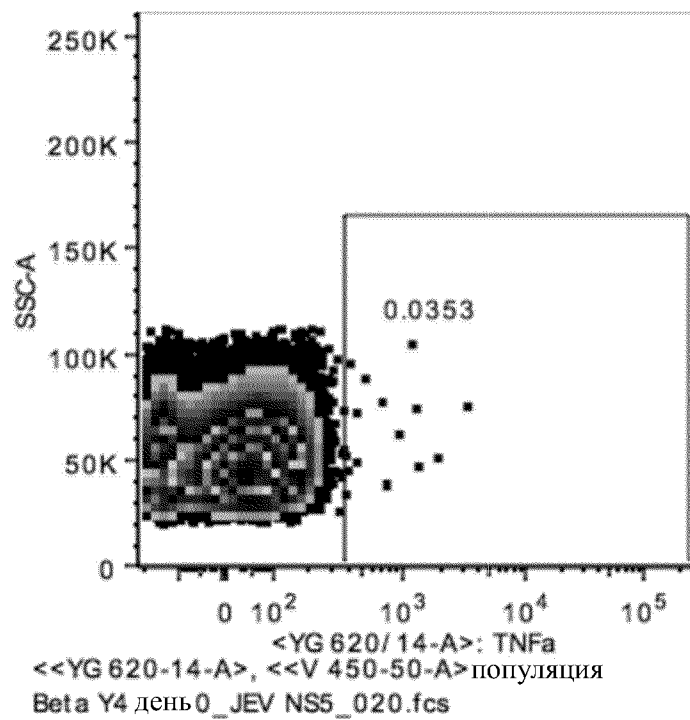


Фиг. 9

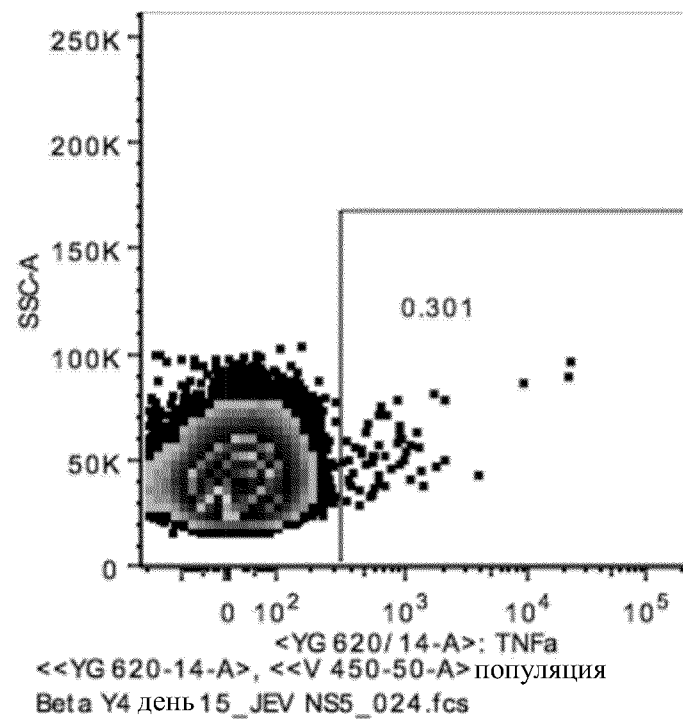


Фиг. 10

библиотека NS5 JEV, день 0



библиотека NS5 JEV, день 15Y 3



Фиг. 11