

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 034825

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.03.25

(51) Int. Cl. A61K 39/165 (2006.01)  
A61K 39/285 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201591803

(22) Дата подачи заявки  
2014.03.14

(54) РАЗОВЫЕ ВЫСОКИЕ ДОЗЫ МВА ИНДУЦИРУЮТ ЗАЩИТНЫЙ ИММУННЫЙ  
ОТВЕТ У НОВОРОЖДЕННЫХ И МЛАДЕНЦЕВ

(31) 61/788,722

(56) WO-A2-03088994  
WO-A1-2009152969

(32) 2013.03.15

"Safety and Immunogenicity of MVA85A Prime and Bacille Calmette-Guerin Boost Vaccination (MVA(TB)029)", ClinicalTrials.gov 30 January 2013 (2013-01-30), XP002725419, Retrieved from the Internet: URL:<http://clinicaltrials.gov/show/NCT0165 0389> [retrieved on 2014-06-04] the whole document

(33) US

WALSH STEPHEN R ET AL.: "Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara in hematopoietic stem cell transplant recipients: a randomized, controlled trial", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES UNITED STATES 15 DEC 2010, INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, US, vol. 207, no. 12, 12 March 2013 (2013-03-12), pages 1888-1897, XP009178362, ISSN: 1537-6613 abstract

(43) 2016.02.29

(86) РСТ/ЕР2014/000693

(87) WO 2014/139687 2014.09.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БАВАРИАН НОРДИК А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Кеминай Седрик, Фолькманн Ариане,  
Чаплин Пол (DE), Сутер Марк (CH)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам индукции защитного иммунного ответа против поксвируса у новорожденных-людей или младенцев-людей в возрасте менее 6 месяцев. Настоящее изобретение включает введение разовой высокой дозы МВА новорожденному-человеку или младенцу-человеку в возрасте менее 6 месяцев, причем введение индуцирует защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного-человека или младенца-человека.

B1

034825

034825 B1

Настоящее изобретение относится к способу индукции защитного иммунного ответа против поксивируса у новорожденного человека или младенца-человека в возрасте менее 6 месяцев, включающему введение дозы, составляющей по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) новорожденному человеку.

#### Уровень техники

Существует лишь три всемирно одобренных вакцины для иммунизации при рождении: Бацилла Кальмета-Герена (БЦЖ) для профилактики туберкулеза, пероральная вакцина против полиомиелита (OPV) и вакцина против гепатита В (HBV). Sanchez-Schmitz et al., Sci. Transl. Med. 3, 90ps27 (2011). БЦЖ - разовая вакцина на основе лиофилизованной живой *Mycobacterium bovis*. См. там же. OPV - разовая вакцина на основе живого ослабленного полиовируса. См. там же. Вакцина против HBV представляет собой рекомбинантный поверхностный антиген вируса гепатита В, экспрессируемый в дрожжевых клетках, который вводят с квасцами тремя дозами, начиная с рождения. См. там же. Таким образом, две из указанных вакцин представляют собой живые реплицирующиеся вакцины, а третья - рекомбинантный белок, вводимый тремя дозами.

Незрелость иммунной системы новорожденного в настоящее время является основным ограничивающим фактором при разработке безопасных и эффективных вакцин. При разработке современных графиков вакцинации для младенцев только вакцину против гепатита В рекомендуют применять при рождении, в то время как другие вакцины применяют позже в младенческом возрасте (в первые 12 месяцев, например, вакцину против ротавируса, инактивированную вакцину против полиомиелита) или рекомендуют применять только в возрасте 12 месяцев или старше (например, вакцину против кори/паротита/краснухи), хотя во всех случаях множественные вакцинации в младенческом/детском возрасте необходимы для индукции высокого уровня защиты. Согласно Sanchez-Schmitz et al., Sci. промежуток времени с шести до девяти месяцев после рождения характеризуется повышенной восприимчивостью к заболеваниям, которые можно предотвратить с помощью вакцин. См. там же: натуральная оспа, СПИД, малярия, туберкулез и другие заболевания протекают у маленьких детей быстро и зачастую тяжело. Даже для таких детских заболеваний как РСВ или корь вакцинацию нельзя проводить до 9-месячного возраста или вакцины не существует. Следовательно, вакцинация новорожденных (в течение первых 4 недель), и/или сокращенный, или более эффективный график вакцинации младенцев был бы крупным шагом вперед в деле сокращения смертности и заболеваемости, связанной с инфекционными заболеваниями.

Общепризнанно, что у новорожденных развиваются главным образом T<sub>H</sub>2-клеточные ответы, а антитела вообще не продуцируются или продуцируются лишь на низком уровне и характеризуются ограниченной аффинностью. Кроме того, продолжительность этих реакций меньше, чем у взрослых. Adkins et al., Nat. Rev. Immunol. 4, 553-564 (2004); Marshall-Clarke et al., Immunol. Today 21, 35-41 (2000); Siegrist, C.A., Vaccine 19, 3331-3346 (2001).

Однако при определенных обстоятельствах, например активации образраспознающих рецепторов или во время некоторых вирусных инфекций, у новорожденных мышей со временем могут развиваться защитные Т-клеточные ответы, что указывает на возможность иммунизации новорожденных. Forsthuber et al., Science 271, 1728-1730 (1996); Sarzotti et al., Science 271, 1726-1728 (1996).

Параллельно с разработкой адьювантов и совершенствованием существующих вакцин (Gracia et al., Vaccine 29, 1595-1604 (2011); Kamath et al., PLoS. One. 3, e3683 (2008)) показано, что новые системы доставки антигенов, например ДНК-вакцины (Hassett et al., J. Virol. 74, 2620-2627 (2000); Rigato et al., Virology 406, 37-47 (2010)) и три ослабленных реплицирующихся бактериальных штамма: *Salmonella enteric* (Ramirez et al., Vaccine 28, 6065-6075 (2010)), *Listeria monocytogenes* (Kollmann et al., J. Immunol. 178, 3695-3701 (2007)) и БЦЖ (Nascimento et al., Microbes. Infect. 10, 198-202 (2008); Ranganathan et al., Vaccine 28, 152-161 (2009)) индуцируют эффективный иммунный ответ при введении мышам в возрасте 1 недели или даже при рождении. Тем не менее, только живые ослабленные реплицирующиеся вакцины индуцировали защиту от смертельных инфекций и были эффективны, как правило, только после нескольких сеансов иммунизации, т.е. на этапе достигнутой иммунологической зрелости. Следовательно, для успешной защиты с использованием реплицирующихся вакцин требуется значительное время, что наряду с риском неконтролируемого распространения инфекции за счет живых ослабленных реплицирующихся вакцин представляет их серьезные ограничения (Galen et al., Immunol. Cell Biol. 87, 400-412 (2009); Johnson et al., Microbiol. Immunol. 55, 304-317 (2011); Li et al., Zhonghua Er. Ke. Za Zhi. 48, 65-68 (2010); Liu et al., Immunol. Rev. 239, 62-84 (2011)).

Модифицированный вирус осповакцины Ankara (MVA) был введен без каких-либо осложнений более чем 100000 лиц в ходе кампании по ликвидации оспы. В то же время MVA представляет собой сложную смесь вирусов с различными уровнями ослабленности и иммуногенности. Suter et al., Vaccine 27, 7442-7450 (2009). Разработанный компанией Bavarian Nordic клонированный методом бляшкообразования MVA (MVA-BN) полностью неспособен реплицироваться в организме млекопитающих, включая человека, и безопасен даже для хозяев с ослабленным иммунитетом. См. там же. Помимо превосходного профиля безопасности, MVA обладает высокой иммуногенностью в организме человека (Vollmar et al., Vaccine 24, 2065-2070 (2006)), и его эффективность доказана на нескольких моделях натуральной оспы у

животных, например вирусе оспы мышей (ECTV), оспе кроликов или оспе обезьян (Garza et al., Vaccine 27, 5496-5504 (2009); Samuelsson et al., J. Clin. Invest 118, 1776-1784 (2008); Stittelaar et al., J. Virol. 79, 7845-7851 (2005)). Другим важным преимуществом MVA является его способность поддерживать генетическое внедрение нескольких антигенов (Timm et al., Vaccine 24, 4618-4621 (2006)), которые могут одновременно индуцировать защиту против других инфекционных заболеваний или рака ((Harrer et al. Antivir. Ther. 10, 285-300 (2005); Mandl et al., Cancer Immunol. Immunother. (2011); Meyer et al., Cancer Immunol. Immunother. 54, 453-467 (2005)).

ECTV (возбудитель оспы мышей) является хорошей модельной системой поксвирусной инфекции человека у мыши. Esteban et al., Journal of General Virology (2005), 86, 2645-2659. Течение заболевания при оспе мышей аналогично натуральной оспе, включая путь инфицирования, высокую инфекционность при низких дозах, развитие виремии, ограниченный круг хозяев и отсроченный, но фатальный исход. Поэтому оспу мышей можно рассматривать в качестве ценной модели оспы человека у мелких животных и в общем случае модели острых смертельных вирусных заболеваний. Lauterbach et al., PLoS ONE, Volume 5(3): e9659 (2010).

Патогенез инфекции ECTV у мышей, в том числе локализованная репликация и системное распространение, аналогичен патогенезу вируса натуральной оспы у человека. Chapman et al., Vet Pathol 2010 47:852 (2010). Сравнение краткосрочной и постконтактной защиты у мышей, инфицированных VACV-WR и ECTV, указывает на то, что инфекция ECTV больше напоминает натуральную оспу человека. Paran et al., The Journal of Infectious Diseases; 199:39-48 (2009).

Вакцинация мышей вакциной MVA при рождении безопасна и индуцирует повышение уровня лиганда FLT3, что приводит к ускоренному развитию плазмоцитоидных дендритных клеток (pDC) и активации обычных (c) DC, в результате чего повышается устойчивость к гетерологичной вирусной инфекции. (Franchini et al., J. Immunol. 172, 6304-6312 (2004), Vollstedt et al., Eur J Immunol. 34:1849-1860 (2004) Vollstedt et al., Eur J Immunol. 36:1231-1240 (2006). Вакцинация одно- или двухдневных мышей  $2,5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> MVA защищала большинство мышей против заражения летальной дозой вируса простого герпеса 1 (HSV-1) через 7-8 дней после вакцинации и защищала большинство мышей против заражения летальной дозой вируса осповакцины Western Reserve (W-WR) через 4 недели после иммунизации, когда мыши считались взрослыми, WO 03/088994 A2. Для определения дозы вируса, необходимой для максимальной индукции CD11c<sup>+</sup>-клеток исследовали возрастающие дозы MVA. Максимальное количество CD11c<sup>+</sup>-клеток обнаружено после введения  $2,5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> вируса; при этом дозы выше и ниже этой были менее эффективны. См. там же. Таким образом,  $2,5 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> считалось оптимальной дозой MVA для вакцинации новорожденных.

Соответственно в данной области техники существует потребность в композициях и способах вакцинации новорожденных, позволяющих достичь сильного Т-клеточного и гуморального иммунного ответа и защиты от патогенов. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность.

#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение охватывает композиции и способы индукции защитного иммунного ответа против поксвируса у новорожденных людей или младенцев-людей в возрасте менее 6 месяцев. В одном варианте реализации настоящее изобретение включает введение дозы, содержащей по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, новорожденному человеку или младенцу-человеку в возрасте менее 6 месяцев, причем введение вызывает защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного человека в возрасте до 6 месяцев, предпочтительно в течение 2 недель после введения. В наиболее предпочтительном случае иммунный ответ вызывается в отсутствие второго введения MVA.

В различных вариантах реализации введение новорожденному человеку или младенцу-человеку осуществляют в возрасте менее 2 месяцев или в течение 72 ч после рождения.

Предпочтительно введение вызывает защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса. Наиболее предпочтительно введение вызывает защитные Т- и В-клеточные ответы против натуральной оспы.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение охватывает одно или более бустерных введений MVA.

В некоторых вариантах реализации MVA представляет собой рекомбинантный MVA. В некоторых вариантах реализации введение вызывает Т- и В-клеточные ответы против гетерологичного антигена, кодируемого рекомбинантным MVA.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1a-d показано сравнение осповакцина-специфических иммунных реакций у новорожденных и взрослых мышей после однократной вакцинации MVA-BN. Новорожденных или взрослых мышей C57BL/6 иммунизировали высокой дозой ( $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>) или низкой дозой ( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) MVA. У животных брали кровь и умерщвляли их через 1, 2, 3, 4 или 7 недель после иммунизации.

(a) Осповакцина-специфический IgG измеряли в сыворотке с помощью твердофазного ИФА. Показаны средние геометрические титры  $\pm$  стандартная ошибка среднего (GMT $\pm$ SEM). (b) Процент B8R-специфичных ИФН- $\gamma$ -секретирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке определяли методом проточной цитометрии. Показан средний процент  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). (c) Процент гранзим В-экспрессирующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке определяли с помощью проточной цитометрии. Показан

средний процент  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). (d) Распределение (в %) эффекторных клеток ( $CD44^{high}CD62L^-CD127^+$ ), эффекторных клеток памяти ( $CD44^{high}CD62L^-CD127^+$ ) и центральных клеток памяти ( $CD44^{high}CD62L^+CD127^+$ ) в популяции B8R-специфических  $CD8^+$  Т-клеток, выделенных из селезенки, измеряли методом проточной цитометрии. Показан средний процент  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Распределение было идентично у новорожденных мышей, иммунизированных двумя различными дозами MVA-BN, показана только доза  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>. Анализ у мышей в возрасте одной недели был невозможен из-за недостаточного количества  $CD8^+$  Т-клеток в селезенке.

На фиг. 2a-d показано, что иммунизация новорожденных мышей  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA индуцирует полную защиту от заражения ECTV. Мышей C57BL/6 иммунизировали высокой дозой ( $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>) или низкой дозой ( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) или вводили TBS при рождении. Через четыре недели после иммунизации мышей заражали  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV. (a) Выживание и (b) относительное изменение массы тела в % (среднее  $\pm$  SEM) отслеживали в течение 21 суток. Аналогично мышей, иммунизированных при рождении  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, заражали (c)  $3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV через 7 недель после иммунизации или (d)  $1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> ECTV через 2 недели после иммунизации.

На фиг. 3a-d показано, что защита зависит от Т- и В-клеточных иммунных реакций, (a, b) Мышей с нокаутом FLT3 или (c, d) TCR $\beta\delta$  иммунизировали при рождении  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA и заражали  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> of ECTV через 4 недели. (a, c) Выживание отслеживали в течение 21 суток. (b, d) В момент смерти или в конце периода наблюдения легкие подвергали некропсии, гомогенизировали и определяли титр ECTV на легкое анализом бляшек (GMT  $\pm$  SEM).

На фиг. 4a-d показано, что для полной защиты необходимы как Т-, так и В-клеточные ответы. (a, b) Мышей с нокаутом  $\beta2m$  или (c, d) трансгенных мышей T11 $\mu$ MT иммунизировали при рождении  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA и заражали  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV через 4 недели. (a, c) Выживание отслеживали в течение 21 суток, (b, d) В момент смерти или в конце периода наблюдения легкие подвергали некропсии, гомогенизировали и определяли титр ECTV на легкое анализом бляшек (GMT  $\pm$  SEM).

На фиг. 5a-b показана иммуногенность рекомбинантной вакцины MVA-корь у новорожденных и взрослых мышей. (a, b) Новорожденных или взрослых мышей BALB/c дважды иммунизировали  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> вакцины MVA-корь с промежутком три недели. (a) Кроме того, некоторых новорожденных иммунизировали только при рождении. У взрослых мышей брали кровь через 2, 3, 4 и 5 недель после первой иммунизации, тогда как у новорожденных можно было брать кровь лишь через 3 недели после рождения. Затем кровь брали каждые две недели (четыре раза) и еще раз при умерщвлении мышей (через 15 недель после иммунизации новорожденных). Корь-специфические IgG измеряли с помощью твердофазного ИФА (GMT  $\pm$  SEM). (b) Через две недели после второй иммунизации измеряли корь-специфические Т-клетки после стимуляции спленоцитов *in vitro* нуклеокапсид-специфическим пептидом и обнаруживали ИФН $\gamma$ -секретирующие клетки с помощью ELISpot (средние показатели стимуляции  $\pm$  SEM).

На фиг. 6 показаны долгосрочные специфические по отношению к осповакцине В-клеточные ответы у новорожденных мышей после однократной вакцинации MVA или MVA, обработанными УФ. Новорожденных мышей C57BL/6 иммунизировали  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA или  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, обработанного УФ. У животных брали кровь и умерщвляли через 1, 2, 3, 4, 7 или 16 недель после иммунизации. IgG, специфический в отношении осповакцины, измеряли в сыворотке методом твердофазного ИФА. Показаны средние геометрические титры  $\pm$  стандартная ошибка среднего (GMT  $\pm$  SEM).

На фиг. 7 показаны долгосрочные осповакцина-специфические Т-клеточные ответы у новорожденных мышей после однократной вакцинации MVA или MVA, обработанным УФ. Новорожденных мышей C57BL/6 иммунизировали  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA или  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, обработанным УФ. Животных умерщвляли через 1, 2 или 16 недель после иммунизации. Осповакцина-специфические Т-клетки измеряли после стимуляции спленоцитов *in vitro* B8R-специфическим пептидом и обнаруживали ИФН $\gamma$ -секретирующие клетки с помощью ELISpot (средние показатели стимуляции  $\pm$  SEM).

На фиг. 8 показана частота встречаемости  $CD8^+$  Т-клеток у новорожденных мышей по сравнению с взрослыми мышами. Для 1-, 2-, 3-, 4- и 7-недельных новорожденных мышей определяли процент  $CD8^+$  Т-клеток в селезенке проточной цитометрией и сравнивали с аналогичным показателем у взрослых мышей. Показан средний процент  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).

На фиг. 9a-b показано, что для устранения вируса необходимо изменение класса иммуноглобулинов. Мышей с нокаутом цитидиндезаминазы, индуцированным активацией (AID), иммунизировали при рождении  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA и заражали  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV через 4 недели. (a) Выживание отслеживали в течение 21 суток. (b) В момент смерти или в конце периода наблюдения легкие подвергали некропсии, гомогенизировали и определяли титр ECTV на легкое анализом бляшек (GMT  $\pm$  SEM).

#### Подробное описание изобретения

Угроза потенциального биотеррористического нападения или появления зоонозных поксвирусов в популяции людей вызвала ряд усилий по разработке более безопасной противовоспаленной вакцины третьего поколения для уязвимой популяции, в которой противопоказано применение ACAM2000<sup>TM</sup>, противовоспаленной вакцины, в настоящее время допущенной к применению в США. Вместе с тем, в группу риска входят не только лица с нарушениями иммунитета, например пациенты с ВИЧ или лица, страдающие кожными заболеваниями, например, атопическим дерматитом, но и дети в возрасте до года из-за незре-

лости их иммунной системы. Ранее было показано, что MVA-BN с его превосходным профилем безопасности, являясь живым вирусом с дефектом репликации, усиливает устойчивость широкого спектра к вирусным инфекциям в течение первой недели жизни у мышей. Franchini, J. Immunol. 172, 6304-6312 (2004).

Считается, что защитить "наивных" новорожденных против смертельных инфекций вскоре после рождения сложно, если не невозможно. Однако при увеличении дозы, используемой для вакцинации, до  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> модифицированного вируса осповакцины Ankara (MVA) продемонстрировано, что разовая иммунизация мышей при рождении индуцировала полностью функциональные Т- и В-клеточные ответы, за счет которых быстро развивалась полная защита от летального заражения ортопоксвирусом. Как ни странно, защита индуцировалась в течение 2 недель и была обусловлена главным образом Т-клетками. Кроме того, за счет указанной разовой вакцинации были получены постоянные иммунологические Т-клетки памяти и нейтрализующие антитела. Таким образом, MVA, введенный при рождении, индуцирует немедленную и долгосрочную защиту против смертельных заболеваний и представляется привлекательной платформой для разработки вакцин, применяемых в раннем детском возрасте.

Разовая вакцинация мышей MVA при рождении индуцирует не только врожденные, но и адаптивные иммунные реакции, включающие участие эффекторных клеток и долгосрочных Т-клеток памяти, а также нейтрализующих антител. Важно отметить, что в течение двух недель после вакцинации адаптивный иммунный ответ полностью защищает мышей против летального интраназального заражения ECTV.

В настоящем документе продемонстрировано, что Т-клетки играют важную роль у новорожденных мышей. При иммунизации низкой дозой  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> MVA индуцировалась сильная реакция цитотоксических Т-клеток, что привело к частичной защите от заражения ECTV в отсутствие обнаружимых реакций на основе антител. Полная защита достигалась лишь после вакцинации высокой дозой  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, которая индуцировала также В-клеточные ответы. Это было подтверждено на трансгенных мышах T11μMT, у которых частичная защита показала, что В-клетки также необходимы для полной защиты после разовой вакцинации MVA при рождении.

Настоящее изобретение включает композиции и способы индукции защитного иммунного ответа против поксвируса у новорожденных или младенцев-людей. В одном варианте реализации изобретение включает введение дозы, содержащей по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, новорожденному человеку или младенцу-человеку. MVA можно вводить новорожденному человеку или младенцу-человеку до полного созревания иммунной системы.

Настоящее изобретение также включает MVA для применения в индукции защитного иммунного ответа против поксвируса у новорожденного или младенца-человека.

Настоящее изобретение также включает MVA для применения в вакцинации новорожденного человека или младенца-человека. Изобретение также включает применение MVA в качестве вакцин для лечения новорожденного или младенца-человека и применение MVA при получении вакцин или медикаментов для лечения или вакцинации новорожденного или младенца-человека.

#### Новорожденные и младенцы-люди

В контексте настоящего изобретения, термин "новорожденный человек" относится к новорожденному человеку в возрасте менее 1 месяца, а термин "младенец-человек" относится к человеку в возрасте от рождения до 1 года. Предпочтительно возраст новорожденного человека составляет менее 4 недель, менее 3 недель, менее 2 недель или менее 1 недели. Более предпочтительно возраст новорожденного человека составляет менее 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня.

В одном варианте реализации дозу MVA вводят новорожденному человеку. В различных вариантах реализации дозу MVA вводят новорожденному человеку в возрасте менее 4 недель, менее 3 недель, менее 2 недель или менее 1 недели. В различных вариантах реализации дозу MVA вводят новорожденному человеку в возрасте менее 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня. В предпочтительных вариантах реализации дозу MVA вводят новорожденному человеку в возрасте 3, 2 или 1 дня.

В одном варианте реализации дозу MVA вводят младенцу-человеку в возрасте менее 6, 5, 4, 3, 2 или 1 месяца. В различных вариантах реализации дозу MVA вводят младенцу-человеку в возрасте менее 8 недель, менее 7 недель, менее 6 недель или менее 5 недели. В предпочтительных вариантах реализации дозу MVA вводят младенцу-человеку в возрасте менее 2 месяцев.

#### Модифицированные вирусы осповакцины Ankara (MVA)

Настоящее изобретение включает любые и все возможные вирусы MVA. Предпочтительные вирусы MVA включают варианты штаммов MVA, например, MVA-BN (депонированный в Европейской коллекции культур клеток животных, лаборатории по исследованию и производству вакцин, службы лабораторий общественного здравоохранения Центра прикладной микробиологии и исследований, Портон-Даун, Солсбери, Уилтшир SP4 0JG, Великобритания (ECACC) 30 августа 2000 года под учетным номером V00083008), MVA-575 (депонированный в ECACC 7 декабря 2000 года под учетным номером V00120707) и MVA-572 (депонированный в ECACC 27 января 1994 года под учетным номером V94012707). Кроме того, предпочтительными являются производные депонированного штамма.

Предпочтительно MVA способен к репродуктивной репликации *in vitro* в фибробластах куриных эмбрионов (CEF) или клетках других линий птиц или *in vivo* в яйцах с развивающимися эмбрионами, но

не способен к репродуктивной репликации в клетках человека, в которых MVA 575 или MVA 572 может репродуктивно реплицироваться. Наиболее предпочтительно MVA не способен к репродуктивной репликации в линии кератиноцитов человека HaCaT, эмбриональной линии клеток почки человека 293 (также называемой HEK293), линии клеток остеосаркомы костей человека 143B и линии клеток adenокарциномы шейки матки человека HeLa.

В предпочтительных вариантах модифицированный вирус осповакцины Ankara (MVA) характеризуется способностью к репродуктивной репликации *in vitro* в фибробластах куриных эмбрионов (CEF) и является более ослабленным, чем MVA-575, в линии кератиноцитов человека HaCaT, в линии клеток остеосаркомы костей человека 143B и в линии клеток adenокарциномы шейки матки человека HeLa. Предпочтительно вирус MVA обладает коэффициентом амплификации в клетках CEF более 500. "Коэффициент амплификации" вируса представляет собой отношение количества вирусов, полученных из инфицированной клетки (выход) к количеству, первоначально использованному для инфицирования клеток (вход). Коэффициент "1" между "выходом" и "входом" определяет состояние амплификации, при котором количество вируса, полученного из инфицированных клеток, является таким же, как количество, первоначально использованное для инфицирования клеток.

#### Рекомбинантные MVA

Настоящее изобретение включает рекомбинантные вирусы MVA, полученные на основе любых и всех возможных вирусов MVA. В одном варианте реализации рекомбинантный вирус MVA представляет собой рекомбинантный вирус MVA-BN. Рекомбинантный вирус MVA содержит по меньшей мере одну гетерологичную нуклеотидную последовательность. В контексте настоящего изобретения термин "гетерологичная" нуклеотидная последовательность относится к нуклеотидной последовательности, в естественных условиях не встречающейся в MVA.

Предпочтительно гетерологичная нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность, кодирующую по меньшей мере один антиген, антигенный эпитоп и/или терапевтическое соединение. Антигенные эпитопы и/или антигены могут представлять собой антигенные эпитопы и/или антигены инфекционного агента. Инфекционные агенты могут представлять собой вирусы, грибы, патогенные одноклеточные эукариотические или прокариотические организмы и паразитические организмы. В некоторых вариантах реализации инфекционный агент является вирусом, выбранным из ротавируса, вируса краснухи, полiovirusa, вируса гриппа, flavivirusa (в частности, вируса денге и вируса желтой лихорадки), парамикосвируса (в частности, вируса кори, вируса инфекционного паротита и респираторно-синцитиального вируса (RSV)), вируса гепатита (в частности, вирусов гепатита A, B и C), вируса иммунодефицита человека (в частности, HIV-1), филовируса (в частности, вируса Эбола и вируса Марбург) или других вирусов, вызывающих геморрагическую лихорадку. В некоторых вариантах реализации инфекционный агент является бактерией, выбранной из *Bacillus anthracis*, *mенингококка*, *пневмококка*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Burkholderia*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* или *Bordetella pertussis*.

Любой антиген, в том числе антиген, индуцирующий Т-клеточный ответ, может экспрессироваться рекомбинантным MVA согласно настоящему изобретению. Предпочтительными являются вирусные, бактериальные, грибковые и раковые антигены. Предпочтительными антигенами являются антигены любого из описанных выше вирусов или бактерий. Особенно предпочтительными антигенами являются антигены HIV-1, антигены вируса денге, антигены возбудителя сибирской язвы, антигены вируса кори, антигены вируса гриппа, антигены пикорнавируса, антигены коронавируса и антигены респираторно-синцитиального вируса. Предпочтительно антиген является чужеродным антигеном или неоантигеном. В контексте настоящего изобретения термин "неоантиген" относится к антигену, не экспрессирующемуся в поксвирусном векторе в естественных условиях.

В некоторых вариантах реализации введение вызывает Т- и/или В-клеточные ответы против гетерологичного антигена, кодируемого рекомбинантным MVA. Т-клеточный ответ может представлять собой ответ эффекторных клеток и/или долгосрочный ответ Т-клеток памяти. В-клеточный ответ может представлять собой ответ нейтрализующих антител.

#### Введение MVA

Настоящее изобретение включает введение дозы MVA новорожденному человеку или младенцу-человеку любым путем. Предпочтительные пути введения включают подкожную (п/к), внутрикожную (i.d.), внутримышечную (в/м), внутривенную (в/в) инъекцию, инъекцию в костный мозг (i.bm.), пероральное введение и мукозальное введение, в частности интраназальное введение, или ингаляцию. Вводимое количество (дозировка) зависит от субъекта, которого лечат, с учетом в числе прочего его состояния, состояния его иммунной системы, пути введения и размеров субъекта.

Изобретение также включает MVA для применения в качестве фармацевтической композиции или вакцины для вакцинирования новорожденного человека или младенца-человека, применение MVA в качестве фармацевтических композиций или вакцин для лечения новорожденного или младенца-человека и применение MVA для получения фармацевтических композиций или вакцин или медикаментов для лечения или вакцинации новорожденного или младенца-человека.

Фармацевтическая композиция, вакцина или лекарственный препарат в общем случае может вклю-

чать одно или более вспомогательных веществ, например фармацевтически приемлемых и/или одобренных носителей, добавок, антибиотиков, консервантов, адьювантов, разбавителей и/или стабилизаторов. Такими вспомогательными веществами могут являться вода, физиологический раствор, глицерин, этиanol, масло, увлажнители или эмульгаторы, pH-буферные вещества и т.п. Подходящие носители обычно представляют собой высокомолекулярные, медленно метаболизируемые вещества, например белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты и т.п.

Для получения фармацевтических композиций или вакцин или лекарственных препаратов MVA согласно изобретению можно перевести в физиологически приемлемую форму. Это можно сделать на основе опыта получения поксвирусных вакцин, используемых для вакцинации против натуральной оспы (как описано в публикации Stickl et al. 1974). Очищенный вирус можно хранить в замороженном состоянии при -20°C или -80°C в жидкости. Предпочтительно титр вируса составляет  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл; вирус может содержаться в буферном растворе, например в 10 mM три, 140 NaCl, pH 7,4.

Состав на основе вируса может содержать дополнительные добавки, например маннит, декстроза, сахар, глицин, лактозу или поливинилпирролидон или другие вспомогательные вещества, например антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, человеческий сывороточный альбумин, или ЧСА), подходящие для введения *in vivo*.

В альтернативном варианте вакцину можно получить путем поэтапной лиофилизации состава на основе вируса. Например, 108 частиц вируса можно лиофилизировать в объеме 100 мкл - 1 мл физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS) в присутствии 2% пептона и 1% ЧСА в ампуле, предпочтительно стеклянной ампуле. Затем стеклянную ампулу запаивают и хранят между 4°C и комнатной температурой в течение нескольких месяцев. Однако при отсутствии необходимости ампулу предпочтительно хранят при температуре ниже -20°C.

Для вакцинации или терапии вирус можно вводить системно или местно, т.е. парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально или посредством любого другого пути введения, известного квалифицированным практикующим врачам.

#### Доза

Изобретение включает введение дозы, содержащей по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, новорожденному человеку или младенцу-человеку. Предпочтительно доза составляет по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $3 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $4 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $6 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $7 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $8 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $9 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> или  $10^9$  TCID<sub>50</sub> MVA. Особо предпочтительная доза составляет  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $3 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $4 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $6 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $7 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $8 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $9 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> или  $10^9$  TCID<sub>50</sub> MVA. Особенно предпочтительной является доза  $10^8$  TCID<sub>50</sub>.

Новорожденного человека или младенца-человека можно вакцинировать путем разового введения MVA в отсутствие дополнительного ("бустерного") введения. В других вариантах реализации выполняют одно или большее число бустерных введений. В одном варианте реализации второе введение выполняют через четыре-восемь недель после первой вакцинации. В предпочтительном варианте второе введение выполняют через 2, 4, 6 или 8 недель после первого введения. В других вариантах реализации выполняют третье, четвертое, пятое, шестое, седьмое, восьмое, девятое, десятое или дополнительные введения.

Бустерное введение можно выполнять для усиления иммунного ответа при ослаблении первоначального ответа или для дополнительного усиления первоначального ответа. Таким образом, в некоторых вариантах реализации бустерное введение осуществляют для дополнения или восстановления желательного уровня иммунного ответа.

Время между первым и вторым введениями и между введением и последующим введением может меняться. В одном варианте реализации время между введениями составляет от двух до шести недель. В различных вариантах реализации время между введениями составляет по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 30 или 52 недели. В различных вариантах реализации время между введениями составляет по меньшей мере 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36 или 48 месяцев. В различных вариантах реализации время между введениями составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

#### Защитный иммунный ответ

Изобретение включает индукцию защитного иммунного ответа против поксвируса посредством введения дозы MVA новорожденному человеку или младенцу-человеку. Предпочтительно введение вызывает защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного или младенца-человека в возрасте до 6 месяцев. В наиболее предпочтительном случае иммунный ответ вызывается в отсутствие второго введения MVA. В контексте настоящего изобретения фраза "иммунный ответ вызывается в отсутствие второго введения MVA" означает, что иммунный ответ не зависит от введения второй (т.е. бустерной) дозы MVA. Иммунный ответ вызывается первым введением. Таким образом, в контексте настоящего изобретения фраза "иммунный ответ вызывается в отсутствие второго введения MVA" не означает отсутствие второго введения; она означает лишь, что второе введение не требуется для индукции защитного иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации осуществляют второе или последующее введение. Второе или последующее введение может усилить иммунный ответ и/или продолжительность иммунного ответа.

Защитный иммунный ответ может защитить по меньшей мере 75, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% новорожденных или младенцев, которым вводят MVA, от смерти и/или симптомов заболевания.

Предпочтительно защитный иммунный ответ направлен против поксвируса, в частности ортопоксвируса. В некоторых вариантах реализации поксвирус представляет собой вирус осповакцины или вирус натуральной оспы. Наиболее предпочтительно защитный иммунный ответ направлен против натуральной оспы.

Предпочтительно защитный иммунный ответ вызывают у новорожденного или младенца-человека в возрасте до 6 месяцев. Более предпочтительно защитный иммунный ответ вызывают у новорожденного или младенца-человека в возрасте до 5, 4, 3, 2 или 1 месяца. Наиболее предпочтительно защитный иммунный ответ вызывают у новорожденного или младенца-человека в течение 4, 3 или 2 недель после введения.

#### Композиции

Изобретение включает фармацевтические композиции и вакцины, содержащие по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, для введения новорожденному или младенцу с целью индукции защитного иммунного ответа. Предпочтительно композиция содержит 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 2×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 3×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 4×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 5×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 6×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 7×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 8×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 9×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> или 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub> MVA. Особо предпочтительная доза составляет 2×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 3×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 4×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 5×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 6×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 7×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 8×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>, 9×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> или 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub> MVA. Особенно предпочтительной является доза 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>.

#### Примеры

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение. Специалисту в данной области техники понятно, что приведенные примеры никоим образом нельзя толковать в смысле, который ограничивает применимость технологии, предложенной в настоящем изобретении, данными примерами.

##### Пример 1. Мышь.

Одновременно оплодотворенных самок мышей C57BL/6J и BALB/c получили из Harlan Winkelmann, в то время как мышей, трансгенных по В-клеточному рецептору/T11μMT, с недостаточностью активационно индуцируемой цитидиндезаминазы (AID-дефектных), с недостаточностью ГКГС I/β2m, с недостаточностью Т-клеточного рецептора βδ и с недостаточностью FLT3 на основе линии C57BL/6 получили из вивариев университета Цюриха или Bavarian Nordic-Munich. Пометы были смешанного пола. Детенышей отсаживали от матери в возрасте 4 недель.

##### Пример 2. Вирус для вакцин и заражения.

Используемый MVA представлял собой MVA-BN, разработанный Bavarian Nordic и депонированный в ECACC под учетным номером V00083008 (см. выше). Рекомбинантная вакцина MVA-mBN85B против MVA и кори кодирует 3 гена вируса кори: Fusion- (встраивание), Hemagglutinin- (гемагглютинин) и Nucleo (нуклеопротеин). Последовательности генов получили из РНК штамма вируса кори Khartoum SUD/34.97 (генотип B3). Оба вируса размножали и титровали в первичных фибробластах куриного эмбриона, полученных из 11-дневных оплодотворенных, не содержащих возбудителя куриных яиц (Чарльз-Ривер, штат Массачусетс, США) и культивированных в среде RPMI 1640. Штамм ECTV Moscow получили из американской коллекции типовых культур (ATCC) под учетным номером VR-1372, размножали и титровали в клетках Vero C1008 (ECACC, учетный номер 85020206), поддерживаемых в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM; Invitrogen) с добавлением 10% FCS без антибиотиков. Все вирусы очищали в градиенте сахарозы.

##### Пример 3. Иммунизация и контрольное заражение.

Мышей иммунизировали путем подкожной инъекции 50 мкл суспензии вируса в течение 6-24 ч после рождения. 8-недельных животных использовали для сравнения новорожденных с взрослыми (т.е. возраст взрослых животных составлял 8 недель). Применили 1×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> MVA или MVA-mBN85B, однако некоторые животные получали пониженную дозу (2×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>) или 1×10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub> УФ-инактивированного MVA. Samuelsson et al., J. Clin. Invest. 118, 1776-1784 (2008). Контрольным животным вводили физиологический раствор с трис-буфером, pH 7,7. Для MVA-mBN85B мышей иммунизировали дважды с промежутком три недели. Для исследования иммуногенности у животных брали пробы крови и умерщвляли в различные моменты времени, выполняя проточно-цитометрический анализ клеток селезенки.

Для контрольного заражения ECTV мышей анестезировали кетамином/ксиламином и вводили вирус интраназально в объеме 25 мкл, за исключением 2-недельных животных, которые получали вирус в объеме 12,5 мкл. Для каждой возрастной группы и линии мышей определяли оптимальную дозу, вызывающую 100% смерть в течение 2 недель при вирусной нагрузке приблизительно 8 log<sub>10</sub> БОЕ в легких после некропсии. Для 29-дневных мышей оптимальная доза составляла 1×10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> (в 4 раза выше LD<sub>50</sub> для взрослых мышей C57BL/6J; Samuelsson et al., J. Clin. Invest 118, 1776-1784 (2008)), за исключением мышей с недостаточностью FLT3 и с недостаточностью TCRβδ. Для этих высоковосприимчивых мышей было достаточно 1×10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> ECTV. Для 2-недельных и 7-недельных мышей доза заражения составляла 1×10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub> и 3×10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> соответственно. После заражения выполняли ежедневный мониторинг потери веса, болезненного состояния и смерти в течение 21 суток. В каждую группу включали 5-7 детены-

шей, данные представляли собой результаты двух или трех экспериментов.

Пример 4. Анализ бляшек ECTV.

Анализ бляшек ECTV использовали для определения вирусной нагрузки в легких после некропсии. Легкие гомогенизировали и титровали в клетках Vero C1008, используя четырехкратные последовательные разведения, начиная с 1:100. После 3 дней инкубации и окрашивания кристалл-виолетом (Sigma Aldrich) рассчитывали титр с первого этапа разбавления, что выявило среднее количество бляшек  $\leq 150$ .

Пример 5. Твердофазный ИФА.

Титры осповакцина-специфических IgG измеряли посредством прямого твердофазного ИФА, как описано ранее. Garza et al., Vaccine 27, 5496-5504 (2009). Вкратце, антиген MVA иммобилизовали на 96-луночных планшетах в течение ночи. Тестируемые сыворотки титровали с использованием двухкратных последовательных разведений, начиная с 1:50. В качестве детектирующего антитела использовали конъюгат антитела овцы против IgG мыши с ПХ (AbD Serotec). Титры антител рассчитывали путем линейной регрессии и определяли как разведение сыворотки, приведшее к оптической плотности 0,30 при ОП450. Титры корь-специфических IgG в сыворотке измеряли с помощью набора для твердофазного ИФА Enzygnost® ELISA kit (Dade Behring), однако использовали конъюгат антитела овцы против IgG мыши с пероксидазой хрина.

Пример 6. Анализ на основе реакции нейтрализации бляшкообразования (PRNT).

Анализ PRNT на основе вируса осповакцины выполняли, как описано в статье Garza et al. Vaccine 27, 5496-5504 (2009). Вкратце, термически инактивированную сыворотку последовательно разбавляли и инкубировали с вирусом осповакцины (Advanced Biotechnologies Inc.). После инкубирования смесь оставляли для адсорбции на клетках Vero на 70 мин. Затем добавляли покровную среду и инкубировали планшеты в течение 24 ч. После окрашивания кристалл-виолетом определяли титр нейтрализующих антител как разведение сыворотки, которое могло нейтрализовать 50% зрелого вируса.

Пример 7. Проточная цитометрия и ELISpot.

После эритролиза часть спленоцитов инкубировали в течение 5 ч с пептидом B8R или без него (Tscharke et al., J. Exp. Med. 201, 95-104 (2005)) (5 мкг/мл B8R<sub>20-27</sub>), Coring) в присутствии GolgiPlug™ (BD Biosciences). Затем клетки окрашивали eFluor™-450 против CD8<sup>+</sup> и eFluor™-780 против CD4+, FITC против CD44, PercP-Cy5.5 против CD62L, CD127-APC, PE-Cy7 против ИФН $\gamma$  (все реактивы получены из eBioscience) и PE против гранзима B (Invitrogen). Внутриклеточное окрашивание выполняли после фиксации/пермеабилизации (BD Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences). Проточно-цитометрический анализ выполняли с помощью LSR II (BD Biosciences). Данные анализировали в FlowJo (Tree Star). Остальные спленоциты стимулировали в течение 20 ч с использованием B8R/осповакцина- или N/корь-специфических пептидов или без них (Halassy et al., Vaccine 24, 185-194 (2006); Bergen et al., PLoS one 5(4):e10297, 2010) (5 мкг/мл; AK 335-345; N) и обнаруживали ИФН $\gamma$ -секретирующие клетки с помощью анализа ELISpot (BD Biosciences). Показатель стимуляции получали путем вычитания количества неспецифических пятен от нестимулированных клеток из количества пятен, полученных при специфической стимуляции.

Пример 8. MVA индуцировал нейтрализующие антитела, а также эффекторные Т-клетки и Т-клетки долговременной памяти у новорожденных мышей.

Новорожденных мышей иммунизировали при рождении высокой ( $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>) или низкой дозой ( $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) MVA, который ранее использовался у новорожденных мышей. Franchini et al., J. Immunol. 172, 6304-6312 (2004). Реакции осповакцина-специфических IgG определяли путем твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) через 1, 2, 3, 4 и 7 недель после иммунизации (фиг. 1а). У взрослых мышей осповакцина-специфические антитела обнаруживались через 7 дней после разовой иммунизации  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA и достигали плато спустя неделю. Как ни странно, реакции специфических IgG после иммунизации разовой высокой дозой при рождении достигали сопоставимого уровня антител, хотя и с задержкой на 1-2 недели (фиг. 1а). Несмотря на незрелость иммунной системы у новорожденных, индуцировались даже антитела, нейтрализующие вирус осповакцины, хотя полной конверсии сыворотки не наблюдалось и титры были приблизительно в 10 раз ниже, чем у взрослых мышей (см. таблицу).

Реакции на основе осповакцина-специфических нейтрализующих антител

Возрастная группа	Обработка	недель после иммунизации	1	2	3	4	7
Новорожденные	TBS	конверсия сыворотки <sup>a</sup>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Титр <sup>b</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	2×10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> MVA	конверсия сыворотки <sup>a</sup>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Титр <sup>b</sup>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	1×10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub> MVA	конверсия сыворотки <sup>a</sup>	0,0	16,7	33,3	66,7	66,7
		Титр <sup>b</sup>	1,0	1,3	2,6	11,6	5,7
Взрослые	1×10 <sup>8</sup> TCID <sub>50</sub> MVA	конверсия сыворотки <sup>a</sup>	33,3	100,0	66,7	100,0	00,0
		Титр <sup>b</sup>	1,8	18,9	11,5	163,7	37,9

<sup>a</sup> в процентах

<sup>b</sup> средний геометрический титр

В-клеточный ответ, индуцированный разовой иммунизацией MVA-BN при рождении, по-прежнему обнаруживался через 16 недель после иммунизации (фиг. 6) и мог усиливаться за счет второй иммунизации через 3 или 4 недели после рождения. Как и в случае с В-клеточным ответом, наблюдалась небольшая задержка CD8<sup>+</sup> Т-клеточных реакций, индуцированных иммунизацией MVA при рождении. Осповакцина-специфический Т-клеточный ответ, измеренный путем внутриклеточного окрашивания ИФН $\gamma$  через 2 недели после иммунизации новорожденных мышей, был аналогичен максимальному ответу у взрослых мышей, наблюдавшемуся через одну неделю после иммунизации (фиг. 1b). Хотя гуморальный ответ после вакцинации низкой дозой MVA не обнаруживался (фиг. 1a), вакцинация низкой дозой индуцировала аналогичный или даже более высокий Т-клеточный ответ (фиг. 1b). Присутствие осповакцина-специфических Т-клеток, вызванное вакцинацией MVA при рождении, подтверждали с помощью спот-иммуноферментного анализа (ELISpot), который обнаружил осповакцина-специфические ИФН $\gamma$ -продуцирующие клетки уже через неделю после иммунизации (фиг. 7). Этот ранний момент времени является еще более примечательным, учитывая низкое количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке у недельных мышей (фиг. 8). Активацию Т-клеток также подтверждали анализом экспрессии гранзима B в популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Это эффекторное соединение цитотоксических Т-клеток индуцировали иммунизацией обеими дозами MVA при рождении с уровнем экспрессии, аналогичным наблюдаемому у взрослых, хотя и с задержкой на одну неделю (фиг. 1c). Для более детального анализа осповакцина-специфические CD8<sup>+</sup> Т-клетки разделяли на эффекторные клетки, эффекторные клетки памяти и клетки центральной памяти на основе дифференциальной экспрессии CD44, CD62L и CD127, как описано в статье Kaech et al., *Nat. Immunol.* 4, 1191-1198 (2003). Как и ожидалось, большинство из осповакцина-специфических Т-клеток являлись эффекторными клетками на пике Т-клеточного ответа у новорожденных и взрослых мышей (фиг. 1d). В последующей фазе ослабления у них развился фенотип, аналогичный эффекторным клеткам памяти или центральной памяти, в обеих возрастных группах (фиг. 1d). Как и для В-клеточного ответа, Т-клетки, специфичные к MVA, по-прежнему обнаруживались через 16 недель после вакцинации новорожденных (фиг. 7). Антигенспецифические В- и Т-клетки не индуцировались после УФ-обработки MVA до иммунизации (фиг. 6 и 7), что указывало на необходимость транскрипции и синтеза белка нереплицирующегося MVA. Отсутствие антигенспецифических В- и Т-клеточных ответов после УФ-обработки ранее было показано для вируса простого герпеса (Franchini et al. *J. Virol.* 75, 83-89 (2001)).

Пример 9. MVA индуцировал защиту против летального заражения ECTV у двухнедельных мышей.

Для дальнейшего исследования функциональности Т- и В-клеточных реакций, вызванных иммунизацией MVA при рождении, использовали модель интраназального заражения ECTV у молодых мышей. Через четыре недели после иммунизации новорожденных низкой или высокой дозой MVA животных интраназально заражали  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV. Все контрольные мыши, которым вводили плацебо (физиологический раствор с буфером трис, TBS pH 7,7; 1,21 мг/мл трис-(гидроксиметил)-аминометан, 8,18 мг/мл хлорид натрия), погибли через 9-12 дней после заражения (фиг. 2a); их легкие содержали приблизительно 8 IgG бляшкообразующих единиц (БОЕ) ECTV, в то время как все мыши, которым вводили  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA, выжили после данного летального в ином случае заражения и полностью выздоровели после незначительной временной потери веса (фиг. 2a и 2b). Легкие всех вакцинированных мышей не содержали ECTV, что подтверждало полную защиту. Иммунизация низкой дозой MVA обеспечивала защиту у 80% мышей, несмотря на то, что перед заражением в данной группе были выявлены только Т-клеточные реакции, но не антитела (фиг. 2a). Помимо снижения выживаемости мыши, иммунизированные низкой дозой, демонстрировали усиление симптомов заболевания и потери массы тела (фиг. 2b) по сравнению с мышами, вакцинированными  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> of MVA. Продолжительность В- и Т-клеточных реакций, наблюдавшихся после иммунизации новорожденных MVA-BN (фиг. 6 и 7) приводила к долговременной защите в зрелом возрасте: мыши были полностью защищены от заражения летальной дозой  $3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV на время последней проверки, т.е. через 7 недель после иммунизации новорожденных (фиг. 2c). С другой стороны, защита могла проявляться уже через 2 недели после иммунизации новорожденных, в самый ранний момент времени, когда заражение ECTV было технически возможно, исходя из размера животных. В этом возрасте  $10^2$  TCID<sub>50</sub> ECTV убивали не получавших лечения мышей в течение 6-8 суток, в то время как иммунизация MVA при рождении обеспечивала 100% защиту (фиг. 2d).

Пример 10. Защита от летального заражения ECTV зависела от адаптивного иммунного ответа.

Ранее было показано, что инъекция MVA при рождении повышала раннее развитие рpDC и предшественников лейкоцитов за счет увеличения уровня лиганда FLT3 (FLT3-L), что приводило к повышенной устойчивости к вирусной инфекции в течение первой недели жизни. Franchini et al., *J. Immunol.* 172, 6304-6312 (2004); Vollstedt et al., *Eur. J. Immunol.* 36, 1231-1240 (2006). Поэтому роль FLT3-L в защите от летального заражения ECTV исследовали с помощью мышей с нокаутом FLT3-L. У данных мышей уровень рpDC приблизительно в десять раз ниже, чем у мышей C57BL/6 дикого типа, и повышение рpDC невозможно. Кроме того, у данных мышей отсутствуют другие типы клеток врожденной иммунной системы. Vollstedt et al., *Eur. J. Immunol.* 36, 1231-1240 (2006). Мышей с нокаутом FLT3-L иммунизировали MVA при рождении и 4 недели спустя заражали  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ECTV. Все вакцинированные мыши выжи-

ли после заражения (фиг. 3а), и ECTV был полностью выведен из их легких (фиг. 3б), в то время как все невакцинированные мыши погибли после заражения. Так как мыши с нокаутом FLT3-L более чувствительны к вирусной инфекции, была выбрана пониженная доза  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ECTV (фиг. 3а). Аналогичные результаты были получены у 2-недельных мышей с нокаутом FLT3-L. Поскольку пониженный уровень pDC и отсутствие других врожденных клеток не влияет ни на В-, ни на Т-клеточный иммунный ответ, эти результаты ясно показывали, что врожденная иммунная система не является единственным механизмом защиты, индуцируемым MVA.

Исследовали роль адаптивного иммунного ответа в защите, обеспечиваемой иммунизацией новорожденных. У мышей с нокаутом Т-клеточного рецептора  $\beta$  (TCR $\beta$ ) отсутствуют Т-клетки и не могут развиваться осповакцина-специфические В-клеточные ответы ввиду отсутствия Т-хелперов. Мыши с нокаутом TCR $\beta$ , вакцинированные MVA при рождении, погибли через 11-12 дней после интраназального заражения  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> ECTV, что указывало на необходимость адаптивного иммунного ответа для защиты (фиг. 3с). Аналогично мышам с нокаутом FLT3-L, данная пониженная доза для заражения была выбрана на основании высокой чувствительности мышей с нокаутом TCR $\beta$  к вирусной инфекции. После смерти как у не получавших лечение, так и у иммунизированных MVA мышей вирусная нагрузка в легких была сопоставима с таковой у не получавших лечение мышей дикого типа, зараженных  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> ECTV (фиг. 3д). С помощью этих двух моделей мышей с нокаутом показано, что защита, обеспечиваемая иммунизацией новорожденных, была обусловлена не неспецифической устойчивостью за счет усиления врожденного иммунитета, а осповакцина-специфическими адаптивными иммунными реакциями, развившимися в относительно неразвитой иммунной системе.

Пример 11. Для полной защиты необходимы как Т-, так и В-клеточные ответы.

Исследовали роль клеточного и гуморального иммунного ответа в защите. Тот факт, что защита у 2-недельных мышей присутствовала на момент времени, когда обнаруживались Т-клеточные ответы, но не антитела, привел к мнению о доминирующей роли Т-клеток в защите у новорожденных мышей. Фактически, в отсутствие CD8<sup>+</sup> Т-клеток у мышей с нокаутом  $\beta2m$  иммунизация MVA не индуцировала защиту (фиг. 4а и б), хотя и не влияла на гуморальные реакции. Для оценки необходимости осповакцина-специфических В-клеток использовали трансгенные мышей T11 $\mu$ МТ. Данные мыши содержат реанкированный ген тяжелой цепи, специфичный для VSV, и соответственно не способны продуцировать специфические антитела после вакцинации MVA. В отсутствие осповакцина-специфических В-клеточных реакций одна из мышей T11 $\mu$ МТ, иммунизированных MVA, погибла от заражения ECTV за два дня до конца периода наблюдения (фиг. 4с), и только у двух третей мышей наблюдалось выведение ECTV из легких в конце 21-дневного периода наблюдения (фиг. 4д). Аналогичную картину наблюдали у мышей с нокаутом AID, у которых могли развиваться только IgM-реакции (фиг. 9). При совместном рассмотрении данные результаты позволили выявить основную роль цитотоксических Т-клеток, однако для полной защиты, вызываемой вакцинацией MVA при рождении, требовалась поддержка антител.

Пример 12. Рекомбинантный MVA в качестве вектора для вакцин против детских заболеваний.

Тот факт, что разовая иммунизация MVA при рождении индуцировала краткосрочный и долгосрочный защитный иммунитет, указывает на возможность его применения в качестве вирусного вектора для разработки вакцин для детей. В связи с этим исследовали возможность применения рекомбинантного MVA в качестве вакцины против детских заболеваний с использованием вакцины MVA-корь на модели новорожденных мышей. Вирус MVA-корь кодировал три различных белка вируса кори на основе MVA: белки гемагглютинина и встраивания, участвующие в связывании и внедрении в клетку-хозяина, а также белок нуклеокапсида, связанный с одноцепочечной вирусной РНК. Как и при вакцинации новорожденных с использованием MVA, рекомбинантный вирус MVA-корь также вызывал сильные осповакцина-специфические В- и Т-клеточные ответы после иммунизации при рождении и бустерной иммунизации через 3 недели. Что еще более важно, также обнаруживались корь-специфичные В- и Т-клеточные ответы (фиг. 5а и б). Величина ответа была сопоставима с величиной, наблюдавшейся у взрослых мышей, вакцинированных вирусом MVA-корь согласно аналогичному графику, несмотря на 1-2-недельную задержку гуморальных реакций, аналогичную наблюдавшимся реакциям на вирус осповакцины, вызванным MVA. Аналогично вышеописанному разовая вакцинация вирусом MVA-корь при рождении привела к сильному и устойчивому корь-специфическому гуморальному ответу, уровень которого лишь незначительно уступал реакциям, которые наблюдались у мышей, получивших бустерную вакцинацию (фиг. 5а).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ индукции защитного Т- и В-клеточного ответа против поксвируса у новорожденного-человека в возрасте менее 6 месяцев, включающий введение дозы, содержащей по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA-BN или его производного, способного к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не способного к репродуктивной репликации в HaCaT, HEK293, 143B и HeLa, новорожденному-человеку, причем введение индуцирует защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного-человека в возрасте до 6 месяцев в отсутствие второго введения указанного MVA-BN.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение представляет собой введение любому, выбранному из группы, состоящей из младенца-человека в возрасте менее 2 месяцев, новорожденного-человека, новорожденного-человека в течение 72 ч после рождения.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение индуцирует защитные Т- и В-клеточные ответы против любого, выбранного из группы, состоящей из ортопоксвируса, вируса осповакцины, натуральной оспы или гетерологичного антигена, кодируемого рекомбинантным MVA-BN.

4. Способ по п.1, дополнительно включающий одно или большее число бустерных введений MVA-BN.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что MVA-BN является рекомбинантным MVA-BN.

6. Способ индукции защитного иммунного ответа против поксвируса у новорожденного-человека или младенца-человека, включающий введение дозы, содержащей по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA-BN или его производного, способного к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не способного к репродуктивной репликации в HaCaT, HEK293, 143B и HeLa, новорожденному-человеку или младенцу-человеку в возрасте менее 6 месяцев, причем введение индуцирует защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного или младенца-человека в течение 2 недель после введения.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что введение представляет собой введение любому, выбранному из группы, состоящей из младенца-человека в возрасте менее 2 месяцев, новорожденного-человека, новорожденного-человека в течение 72 ч после рождения.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что введение индуцирует защитные Т- и В-клеточные ответы против любого, выбранного из группы, состоящей из ортопоксвируса, вируса осповакцины, натуральной оспы или гетерологичного антигена, кодируемого рекомбинантным MVA-BN.

9. Способ по п.6, отличающийся тем, что дополнительно включает одно или большее число бустерных введений MVA-BN.

10. Способ по п.6, отличающийся тем, что MVA-BN является рекомбинантным MVA-BN.

11. Применение по меньшей мере  $10^8$  TCID<sub>50</sub> MVA-BN или его производного, способного к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не способного к репродуктивной репликации в HaCaT, HEK293, 143B и HeLa, в индукции защитного иммунного ответа против поксвируса у новорожденного-человека или младенца-человека в возрасте менее 6 месяцев.

12. Применение по п.11, отличающееся тем, что защитный иммунный ответ индуцирован у любого, выбранного из группы, состоящей из младенца-человека в возрасте менее 2 месяцев, новорожденного-человека, новорожденного-человека в течение 72 ч после рождения.

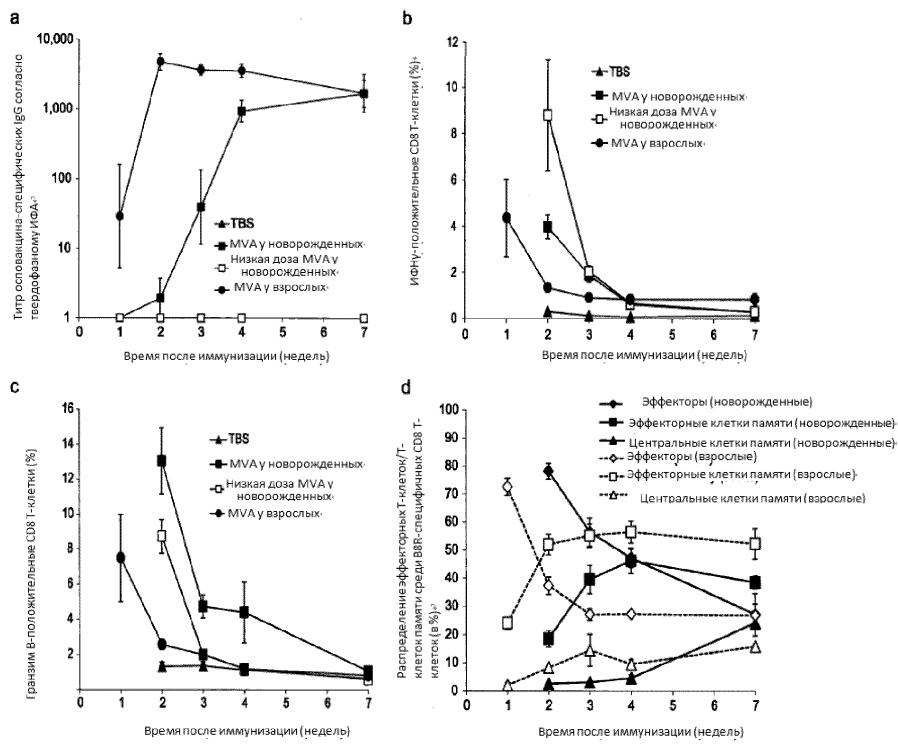
13. Применение по п.11, отличающееся тем, что применение индуцирует защитные Т- и В-клеточные ответы против любого, выбранного из группы, состоящей из ортопоксвируса, вируса осповакцины, против натуральной оспы, гетерологичного антигена, кодируемого рекомбинантным MVA-BN.

14. Применение по п.11, дополнительно включающее одно или большее число бустерных введений MVA-BN.

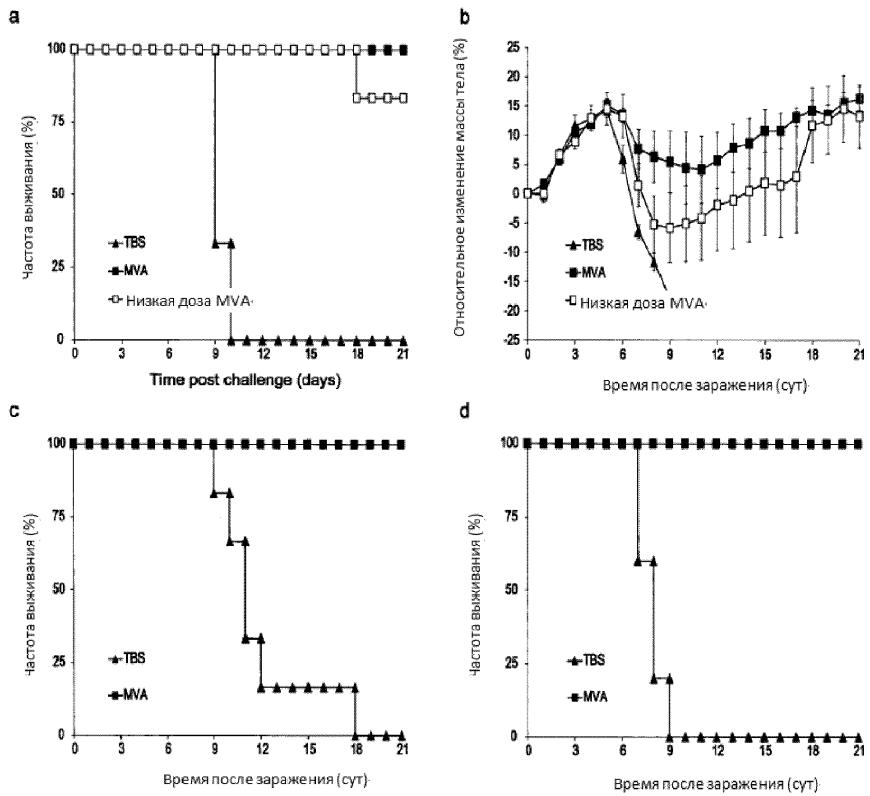
15. Применение по п.11, отличающееся тем, что MVA-BN является рекомбинантным MVA-BN.

16. Применение по п.11, отличающееся тем, что защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного в возрасте до 6 месяцев индуцируются в отсутствие второго введения MVA-BN.

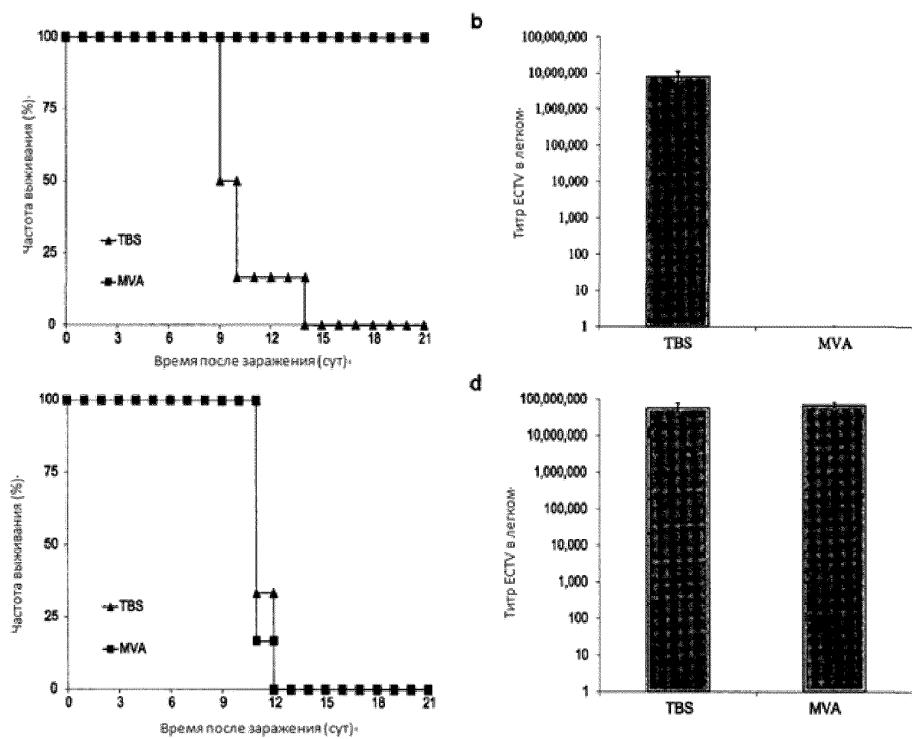
17. Применение по п.11, отличающееся тем, что защитные Т- и В-клеточные ответы против поксвируса у новорожденного или младенца-человека индуцируются в течение 2 недель после введения.



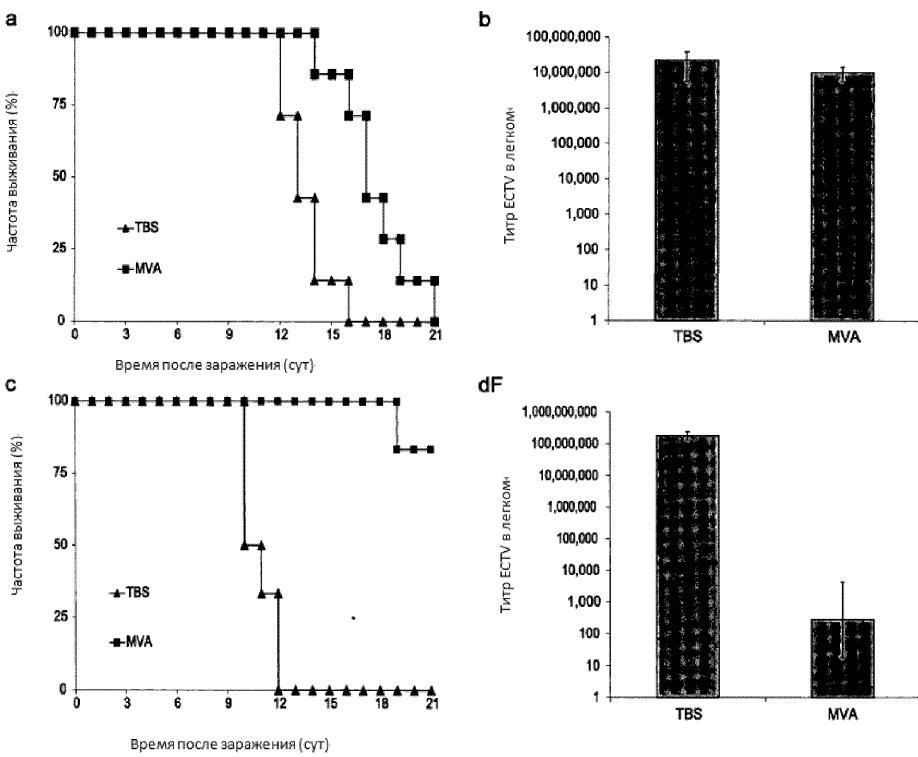
Фиг. 1



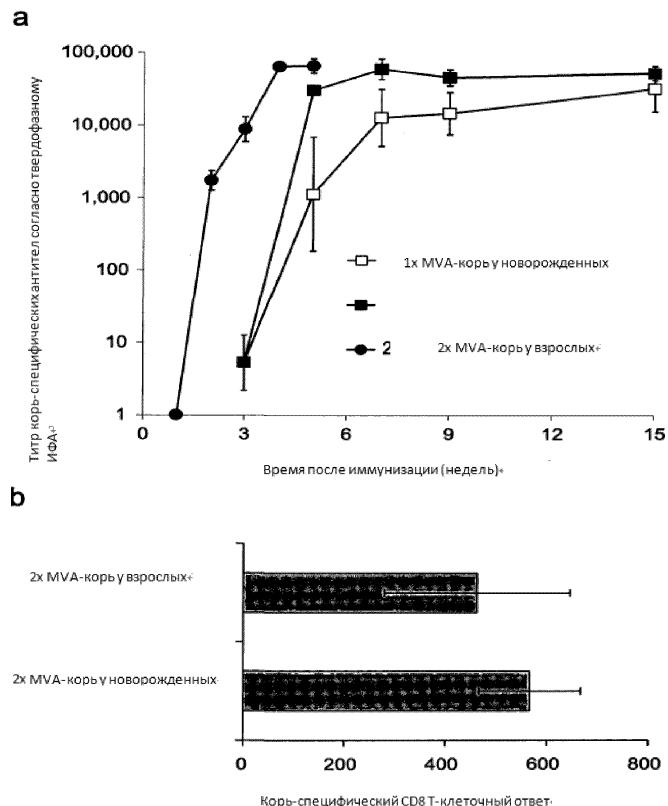
Фиг. 2



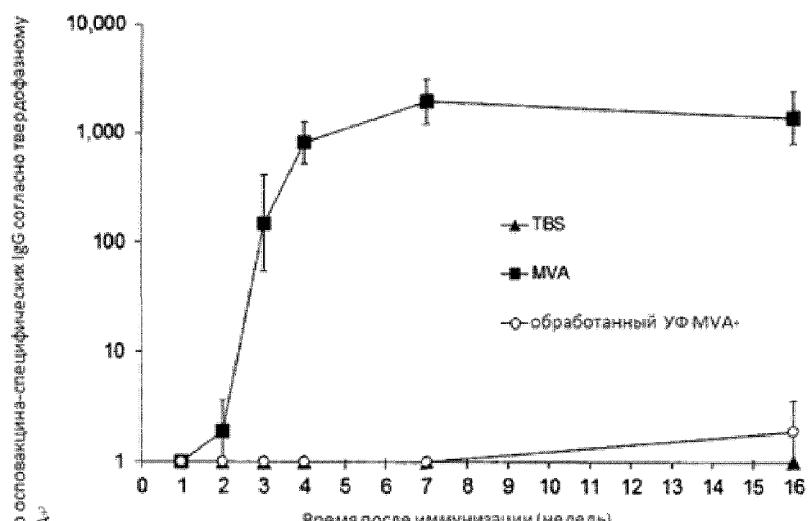
ФИГ. 3



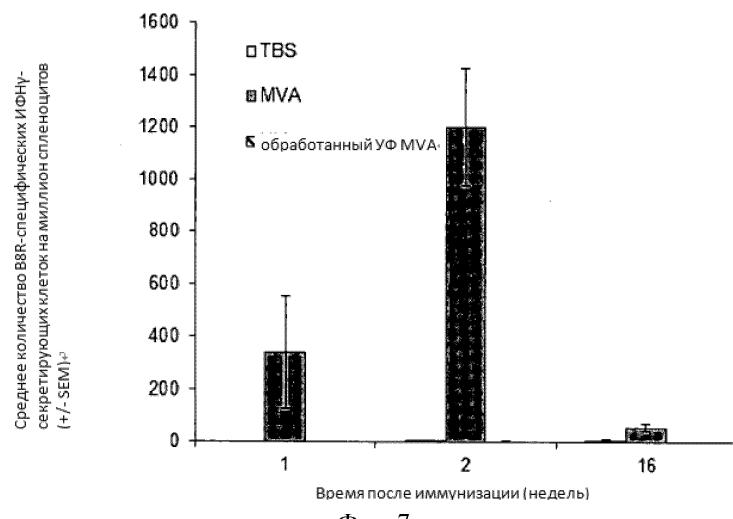
ФИГ. 4



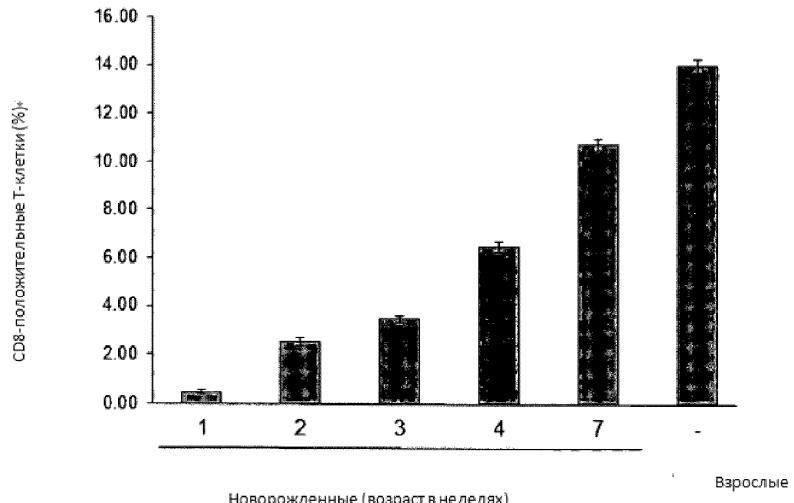
Фиг. 5



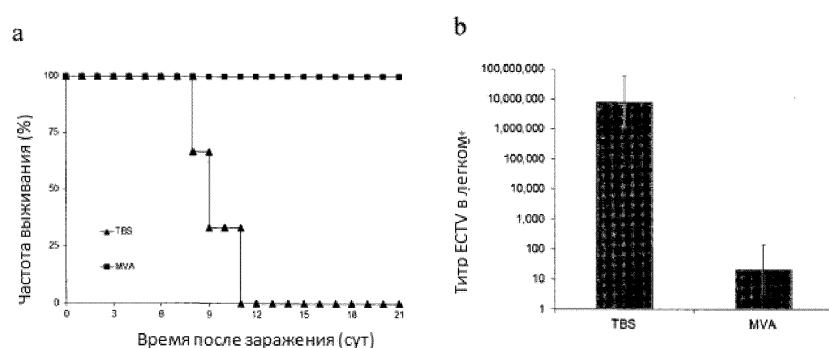
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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