

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Aneta Holšteinová

Vakcíny proti viru dengue

Dengue vaccines

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

Mgr. Vojtěch Šroller, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Vojtěchu Šrollerovi, Ph.D. za odborné konzultace, cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 9. května 2019

.....

Aneta Holšteinová

Abstrakt

Od poloviny 20. století dochází k neustálému zvyšování počtu jedinců infikovaných virem dengue (DENV). Specifická antivirotika nejsou k dispozici, a tak se hlavním cílem při eliminaci transmise stala konstrukce účinné a bezpečné vakcíny. Důraz je kladen na vyvolání vyvážené imunitní odpovědi proti všem sérotypům DENV. Momentálně je jedinou licencovanou vakcínou CYD-TDV (*Chimeric Yellow Fever-Dengue, Live-Attenuated, Tetravalent Dengue Vaccine*). Ta využívá kostru účinné a bezpečné vakcíny proti viru žluté zimnice (YFV), ze které jsou odebrány sekvence pro povrchové proteiny a nahrazeny odpovídajícími sekvencemi DENV. Zatímco preklinické studie vykazovaly slibné výsledky, při klinických studiích se začaly objevovat komplikace a z nich vycházející omezující kritéria pro její využití. Proto se pokračuje ve vývoji dalších vakcín, které by mohly zajistit lepší ochranu proti DENV širšímu spektru populace a nahradit tak CYD-TDV. Ve III. fázi klinických studií se nachází dvě živé atenuované vakcíny (TetraVax-DV a DENVax). Do I. fáze postoupila podjednotková vakcína (V180), DNA vakcína (TVDV) nebo vakcína obsahující inaktivovaný virus (TDENV PIV). Využívaná je i kombinace více vakcinačních schémat (tetravalentní živá atenuovaná vakcína-tetravalentní purifikovaná inaktivovaná vakcína, TLAV-TPIV). V experimentální fázi na sebe poutá největší pozornost tetravalentní vakcína složená z viru podobných částic, která mimikuje autentický virion.

Klíčová slova

virus dengue (DENV), Flavivirus, CYD-TDV, živá atenuovaná vakcína, antibody dependent enhancement (ADE)

Abstract

Since the middle of the 20th century the number of people infected by the dengue virus (DENV) has been constantly increasing. Specific antiviral drugs are not available, so the objective for eliminating transmission has become the construction of an effective and safe vaccine with an emphasis on inducing a balanced immune reaction against all of the DENV serotypes. Momentarily, the only licenced vaccine is CYD-TDV (*Chimeric Yellow Fever-Dengue, Live-Attenuated, Tetravalent Dengue Vaccine*). This vaccine uses the structure of the effective and safe vaccine against the yellow fever virus (YFV) from which surface protein sequences are substituted for corresponding DENV sequences. While preclinical studies displayed promising results, complications have arised during clinical studies, thus creating limiting criteria for their use. For this reason the search for new vaccines that could ensure better safety from DENV for a wider range of people and replace CYD-TDV is ongoing. In the III. phase of the clinical studies there are two live-attenuated vaccines (TetraVax-DV and DENVax). The subunite vaccine (V180), DNA vaccine (TVDV) or inactivated vaccine (TDENV PIV) was forwarded into the I. phase. The combination of several vaccine schedules is also being used (tetravalent live-attenuated vaccine-tetravalent purified inactivated vaccine, TLAV-TPIV). The tetravalent vaccine composed of virus-like particles mimicking the authentic virion is the most intriguing vaccine in the experimental phase.

Key words

Dengue virus (DENV), Flavivirus, CYD-TDV, live-attenuated vaccine, antibody dependent enhancement (ADE)

Seznam použitých zkratek

| | | |
|---------------|---|--|
| ADE | antibody dependent enhancement | |
| C protein | Capsid protein | kapsidový protein |
| cDNA | complementary DNA | komplementární DNA |
| CYD-TDV | Chimeric Yellow Fever-Dengue, Live-Attenuated, Tetravalent Dengue Vaccine | |
| DENV | Dengue virus | virus dengue |
| DF | dengue fever | horečka dengue |
| DHF | dengue hemorrhagic fever | hemoragická horečka dengue |
| DSS | dengue shock syndrom | šokový syndrom dengue |
| E | Envelope protein | obalový protein |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay | |
| ELISPOT | enzyme-linked immuno spot assay | |
| FV/NV | French viscerotropic/neurotropic virus | francouzský viscerotropní/neurotropní virus |
| IFN | interferon | interferon |
| JEV | Japanese encephalitis virus | virus japonské encefalitidy |
| mRNA | messenger RNA | mediátorová RNA |
| NS protein | nonstructural protein | nestrukturální protein |
| nt | nucleotide | nukleotidy |
| PDK | primery dog cell | primární psí buňky |
| prM/M protein | Premembrane/membrane protein | premembránový/membránový protein |
| pVAX-D1ME | dengue1 premembrane/Envelope DNA vaccine | dengue-1 premembranová/Envelope DNA vakcína |
| RdRp | RNA-dependent RNA polymerase | RNA dependentní RNA polymeráza |
| TBEV | Tick-borne encephalitis virus | virus klíšťové encefalitidy |
| TDENV PIV | Purified inactivated vaccine | tetravalentní purifikovaná inaktivovaná dengue vakcína |
| TDV | Tetravalent dengue vaccine | tetravalentní dengue vakcína |
| TVDV | Tetravalent DNA vaccine | tetravalentní DNA vakcína |
| UTR | untranslated region | nepřekládaná oblast |
| VLP | virus like particle | viru podobná částice |
| WHO | World Health Organization | Světová zdravotnická organizace |
| wt | wild type | divoký kmen |
| YFV | Yellow fever virus | virus žluté zimnice |
| ZIKV | Zika virus | virus zika |

Obsah

| | |
|--|---------------------------------|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Virus dengue | 2 |
| 2.1. Zařazení | 2 |
| 2.2. Varianty a rozšíření | 2 |
| 2.3. Charakteristika virionu, genom | 3 |
| 2.4. Proteiny | 4 |
| 2.5. Životní cyklus..... | 5 |
| 2.6. Přenos | 7 |
| 2.7. Průběh infekce u člověka | 7 |
| 2.8. Imunitní odpověď při infekci | 8 |
| 3. Vakcíny proti viru dengue | 10 |
| 3.1. Obecné informace | 10 |
| 3.2. Komplikace při vývoji vakcíny | 10 |
| 4. CYD tetraivalentní dengue vakcína, CYD-TDV, živá atenuovaná vakcína | 11 |
| 4.1. Obecné informace | 11 |
| 4.2. Vakcína proti YFV, YF-VAX, živá atenuovaná vakcína | 12 |
| 4.3. Vývoj CYD-TDV | 13 |
| 4.4. Aplikace CYD-TDV | 13 |
| 4.5. Preklinické studie CYD-TDV | 14 |
| 4.6. Klinické studie CYD-TDV..... | 15 |
| 4.7. Komplikace vycházející z výsledků klinických studií | 16 |
| 5. Vakcíny ve fázi klinických studií | 18 |
| 5.1. TetraVax-DV, živá atenuovaná dengue vakcína | 18 |
| 5.1.1. Vývoj TetraVax-DV | 19 |
| 5.1.2. Klinické studie TetraVax-DV | 20 |
| 5.2. DENVax, živá atenuovaná dengue vakcína | 21 |
| 5.2.1. Vývoj DENVax | 21 |
| 5.2.2. Klinické studie DENVax..... | 22 |
| 5.3. Podjednotková vakcína, V180..... | 22 |
| 5.3.1. Vývoj vakcíny V180 | 22 |
| 5.3.2. Preklinické a klinické studie V180..... | 23 |
| 5.4. Tetraivalentní DNA vakcína (TVDV)..... | 23 |
| 5.4.1. Vývoj vakcíny TVDV | 24 |
| 5.4.2. Preklinické a klinické studie TVDV | 24 |
| 5.5. Tetraivalentní purifikovaná inaktivovaná vakcína (TDENV PIV) | 24 |
| 5.5.1. Vývoj TDENV PIV | 25 |
| 5.5.2. Klinické studie TDENV PIV..... | 25 |
| 5.6. Tetraivalentní živá atenuovaná vakcína – tetraivalentní purifikovaná inaktivovaná vakcína, TLAV-TPIV | 25 |
| 6. Vakcíny v preklinických studiích | 26 |
| 7. Závěr | Chyba! Záložka není definována. |
| 8. Seznam použité literatury | 29 |

1. Úvod

Virus dengue (DENV) z čeledi *Flaviviridae* způsobuje u člověka akutní systémové infekční onemocnění. Je přenášen komáry rodu *Aedes*, kteří se vyskytují v tropickém a subtropickém pásmu. Nákazou DENV jsou proto ohroženi především obyvatelé jihovýchodní Asie, Latinské Ameriky a podle nových výzkumů i Afriky. Výskyt DENV zasahuje téměř 130 zemí a potenciálně ohrožuje polovinu lidské populace. Představuje tak celosvětově jeden z hlavních zdravotních problémů. Přesné počty nakažených obyvatel se zjišťují obtížně v důsledku snížené dostupnosti dat z rozvojových zemí, záměnou za jiné onemocnění nebo asymptomatického průběhu infekce, který nevyžaduje návštěvu zdravotnického zařízení. Odhady z roku 2010 se pohybují kolem 390 miliónů nakažených ročně. Z tohoto počtu připadá 294 miliónů na asymptomatické infekce a 96 miliónů infikovaných vykazuje běžné symptomy. Ročně nákaze podlehnou 25 tisíc infikovaných jedinců, především dětí. V současnosti neexistují žádná antivirotika cílená proti DENV a zamezení transmise limitací vektoru, komára, nedosahuje signifikantního zmírnění šíření viru. Jedinou momentálně dostupnou pomocí při hospitalizaci infikovaného je podpůrná léčba a snaha zajistit základní životní funkce pacienta. Proto existuje poptávka po bezpečné, účinné a snadno aplikovatelné vakcíně využitelné celosvětově pro jedince všech věkových kategorií.¹

Ačkoliv proti YFV a viru japonské encefalitidy (JEV), patřících do stejné čeledi jako DENV, byly vyvinuty vysoce účinné, bezpečné a dlouhodobě dostupné živé atenuované vakcíny, infekci DENV doposavad nejsme schopni eliminovat a výskyt séropozitivních jedinců má stále rostoucí tendenci. Od prosince roku 2015 je k dispozici první vakcína proti DENV, Dengvaxia (CYD-TDV), která je však schválena k použití pouze v některých zemích s vysokým výskytem DENV. Očekává se, že právě v těchto oblastech může systematická vakcinace snížit počet hospitalizovaných jedinců s infekcí DENV až o 30 % během následujících 30 let.² Světová zdravotnická organizace (WHO) na základě výsledků klinických studií doporučuje očkování vakcínou CYD-TDV recipientům ve věku od 9 do 45 let pouze v zemích s endemickým výskytem, kde je séoprevalence minimálně 50%, ideálně pak více jak 70% a nejlépe pouze séropozitivním jedincům. V prostředí s nízkou prevalencí DENV by mohlo očkování zvýšit výskyt závažných projevů onemocnění.³ Z recipientů CYD-TDV jsou tudíž vyloučeni i lidé cestující do endemických oblastí výskytu DENV. Z tohoto důvodu pokračuje vývoj dalších vakcín, od kterých se očekává vyšší účinnost, bezpečnost a možnost využití napříč věkovými kategoriemi.

Kandidátní vakcíny se nacházejí v různých fázích klinických studií. Dvě živé atenuované vakcíny jsou ve III. fázi klinického testování, další jsou teprve v počátku klinických studií. Živé atenuované kandidátní vakcíny se po strukturální stránce od CYD-TDV liší tím, že vakcinační viry jsou kompletně zkonstruovány pouze na základě DENV. Atenuované viry vznikly pomocí delece, tvorby chimér a mnohonásobného pasážování. Při konstrukci dalších vakcín byl využit purifikovaný inaktivovaný virus, glykoprotein E nebo plasmidová DNA. V experimentální fázi vývoje dengue vakcíny se nachází konstrukty, které se v dosavadních testech osvědčily a v následujícím období by mohly být posunuty do klinických studií. Mezi významné vakcíny nacházející se na této úrovni výzkumu patří například VLP vakcína.

2. Virus dengue

2.1. Zařazení

DENV se řadí do čeledi *Flaviviridae*, zahrnující viry vyvolávající velmi závažná onemocnění u lidí. Do této čeledi je řazen rod *Flavivirus*, kam patří viry přenášené moskyty způsobující horečky nebo záněty mozku (DENV, YFV, JEV, WNV – virus západonilské horečky, ZIKV – zika virus), a také klíšťaty přenášený virus klíšťové encefalitidy (TBEV). Dále se sem řadí rod *Pestivirus*, rod *Pegivirus* a rod *Hepacivirus*, jehož zástupcem je virus hepatitidy C. Flaviviry mají genom tvořený pozitivní ssRNA uložený v komplexu s proteinem kapsidovým (C) v nukleokapsidě obalené lipidickou membránou. Translací jediného genu vzniká polyprotein, který je posléze rozštěpen na jednotlivé virové proteiny. Do buňky vstupují endocytózou, replikují se v cytoplasmě a nové virové partikule pučí do buněčného membránového kompartmentu. Sekretorickou dráhou jsou transportovány na povrch buňky a následně uvolněny.⁴

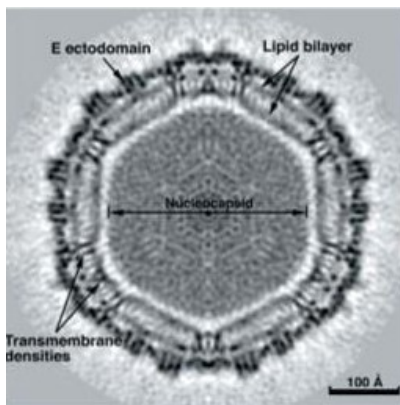
2.2. Varianty a rozšíření

V současnosti se čtyři sérotypy DENV1–4 vyskytují ve všech endemických oblastech, i když víme, že v minulosti byly některé sérotypy geograficky omezené. Přestože se jednotlivé sérotypy liší v aminokyselinové sekvenci obalových proteinů v 30–40 %, způsobují stejné onemocnění provázené shodnými příznaky. Výrazná variabilita vedla dříve k mylné domněnce, že se jedná o čtyři odlišné viry, které dohromady pojí podobná sérologie, epidemiologie a patogeneze. V rámci jednotlivých sérotypů je variabilita aminokyselinových sekvencí nižší, kolem 10 %. Platí, že větší genetická rozdílnost se týká proteinů strukturálních. Proteiny nestrukturální (NS) si pro svou funkčnost musí držet jistou uniformitu.⁴

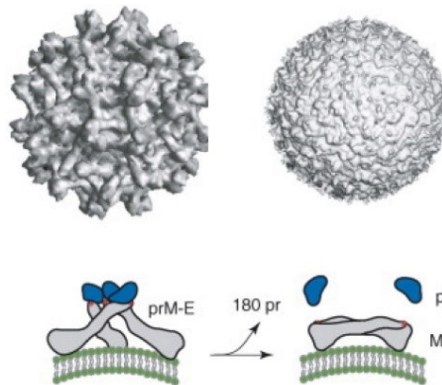
Některé studie, například Balmaseda et al. (2006), naznačují, že mezi sérotypy by mohly být rozdíly v patogenitě. Data získaná z Nikaragui mezi lety 1999 až 2003 ukazují, že k vážnějším průběhům nemoci dochází u jedinců infikovaných DENV2. Od roku 1999 do roku 2001 zde byl dominantním sérotypem DENV2, zatímco v roce 2003 jím byl DENV1. Ostatní sérotypy se vyskytovaly v malém množství.⁵ Tato studie není jediná, která poukazuje na možnou odlišnou klinickou manifestaci jednotlivých sérotypů.⁶

2.3. Charakteristika virionu, genom

Virové partikule o velikosti 50 nm jsou sférického tvaru s relativně hladkým povrchem. Vnější obal virionu se skládá z lipidické dvojvrstvy, jak je patrné z obrázku 1, získané z hostitelské buněčné membrány během pučení a z virových glykoproteinů obalových (E) a membránových (M). Každá virová částice obsahuje 180 monomerů proteinu E, organizovaných u imaturovaného virionu do 60 trimerů s ikosahedrální strukturou a později po maturaci do 90 pevně sbalených dimerů, které pokrývají vnější membránu a vytváří hladký povrch virionu. Zobrazeno na obrázku 2. Proteiny E a M nejsou v kontaktu s nukleokapsidou, tvořenou proteinem C, která je uložena pod lipidickou membránou a obsahuje virový genom.⁴



Obrázek 1: Nukleokapsida virové partikule DENV je obalena lipidickou dvojvrstvou, do které jsou inkorporovány virové glykoproteiny E a M.⁷



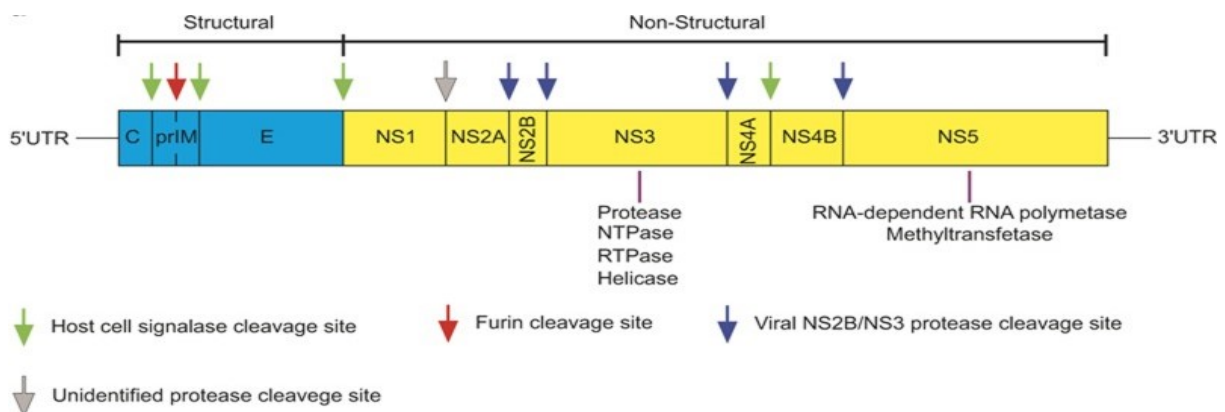
Obrázek 2: Imaturovaný virion s drsným povrchem tvořeným 60 trimery proteinu prM a E (vlevo). Maturovaný virion s hladkým povrchem tvořeným 90 dimery (vpravo)⁸

Genom DENV tvoří pozitivní ssRNA o délce cca 11 kb. Je na něm jediný gen pro polyprotein, ohraničený nekódujícími oblastmi. Na 5' konci genomu se nachází m7GpppG čepička, která se podílí na ochraně virové RNA proti imunitnímu systému infikovaného jedince, stabilizuje ji a slouží k iniciaci translace. Na 3' konci nukleové kyseliny leží nepřekládaná oblast tvořená 400–700 nt, které vytvářejí stabilní vlásenky.⁹ Ačkoliv primární struktura poslední vlásenky tvořené 100 nt na samotném 3' konci je u jednotlivých členů rodiny flavivirů

odlišná, sekundární struktura je vysoce konzervovaná. Brinton et al. (1986) prokázali důležitou úlohu terminální vlásenky v životním cyklu flavivirů, ve kterém slouží jako signál pro rozpoznání a navázání virové polymerázy, čímž ovlivňuje efektivitu replikace.¹⁰ Smyčka interaguje s mnohými virovými proteiny (NS3, NS5), ale i buněčnými proteiny, což bylo ukázáno při izolaci DENV RNA.¹¹

2.4. Proteiny

ssRNA kóduje jediný otevřený čtecí rámeček, jehož produkt je pomocí virových a buněčných proteáz rozštěpen na 3 proteiny strukturální (C, prM, E) a 7 proteinů nestrukturálních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Genomová organizace DENV je 5'-UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-UTR-3,' jak je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 1: Genom DENV nese jediný polyprotein, který je ohraničen nekódujícími oblastmi. Obsahuje proteiny strukturální (modře) a proteiny nestrukturální (žlutě). Polyprotein je štěpen virovými i hostitelskými proteázami.¹²

Proteiny zajišťují deregulaci procesů hostitelské buňky, replikaci virového genomu a produkci nových virových částic. Mnohé funkce a interakce virových proteinů s proteiny hostitelskými jsou málo prozkoumány. Jeden z přístupů umožňující určení funkce proteinů je realizován na základě mutací v konkrétních místech proteinů a jejich náchylnosti k inserci. Genom je velmi zhuštěný, proto není příliš tolerantní k tomuto typu mutace. Perry et al. (2018) získali data dokazující, že striktně potřebné proteiny pro životní cyklus viru mutace netolerují (NS3, NS5). Naopak a protein NS2A inserci toleroval.¹³

Maturovaný protein C složený ze 4 alfa helixů se sbaluje do kompaktního dimeru. Přesný způsob organizace dimerů do kapsidy zatím není znám. Nejspíše interakce s NK (nukleové kyseliny) vedou ke shromažďování a skládání C dimerů do výsledné struktury nukleokapsidy.⁴ Protein prM je prekurzorem proteinu M. Jeho hlavní funkcí je chránit protein

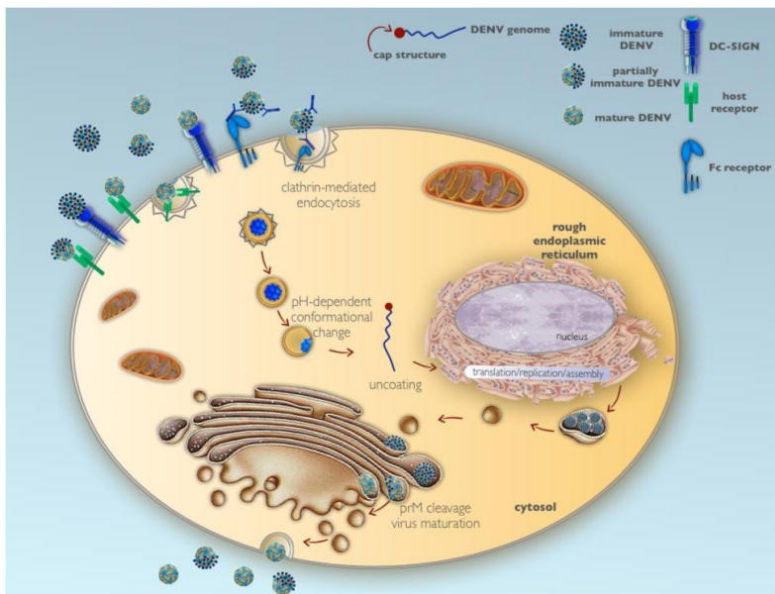
E procházející úpravami na základě změny pH a fúze během putování virionu sekretorickou dráhou. V trans-Golgi kyselém prostředí dochází ke změně konformace proteinu prM a odhalení místa štěpeného furinem. Pro uvolnění pr domény a vznik virionu schopného fúze je důležité neutrální pH extracelulárního prostoru. Sled událostí závislý na změně pH zabraňuje předčasnému odštěpení sekvencí, které by vedlo k fúzi membrány v Golgiho komplexu.⁴ Glykoprotein E zajišťuje vazbu na povrch buňky a fúzi během vstupu viru do buňky. Skládá se ze tří domén. Na doméně II se nachází fúzní peptid. Doména III zajišťuje asociaci proteinu E s receptory na povrchu hostitelské buňky. Mezi nimi se nachází doména I.¹⁴

Glykoprotein NS1 hraje významnou roli při virové replikaci. V buňce asociuje s intracelulárními membránami a buněčnými povrchy. Při infekci je sekretován do krevního řečiště. Beatty et al. (2015) se zabývali spojitostí mezi vysokou hladinou NS1 a závažným průběhem onemocnění. NS1 pravděpodobně vyvolává patogenní efekty během DENV infekce jako je krvácení a únik tělních tekutin.¹⁵ NS2A je hydrofobní protein, který nabourává stabilitu membrán a může sloužit jako viroporin. Protein NS2A je schopen inhibovat interferonovou signální dráhu.⁴ NS2B tvoří stabilní komplex s NS3, kde slouží jako kotva v membráně a esenciální kofaktor serinové proteázy.⁴ NS3 vykonává enzymatické aktivity potřebné pro zpracování polyproteinu a virovou replikaci. Na N konci je lokalizovaná virová serinová proteáza a na C konci se nachází ATPázová, RTPázová a helikázová aktivita. Funkce zastávané NS3 jsou esenciální pro replikaci viru a představují atraktivní cíl pro antivirovou intervenci.¹⁶ NS4A se podílí na replikaci virové RNA. Indukuje přestavbu hostitelských membrán a představuje důležitou komponentu membránově vázaného replikačního komplexu. NS4A se formuje v infikovaných buňkách do oligomerních struktur. Lee et al. (2015) prokázali biologický význam oligomerizace. Mutace aminokyselin E50A a G67A redukuje oligomerizaci a stabilitu NS4A. Dále se ukázalo, že NS4A může indukovat autofagii a stejně jako NS4B inhibovat interferonovou signální dráhu.⁴ Interaguje také s vimentinem a virovým proteinem NS4B.¹⁷ NS5 se skládá z methyltransferázové a RNA dependentní RNA polymerázové (RdRp) domény. Methyltransferázová doména lokalizovaná na N konci vykonává tři aktivity nezbytné pro syntézu čepičky. RdRp doména plní funkci při *de novo* syntéze RNA.^{18 19}

2.5. Životní cyklus

DENV se na povrchu buněk váže na receptor, kterým je u dendritických buněk patrně molekula DC-SIGN. Dalšími receptory mohou být glykosaminoglykany. Pokud jsou v hostiteli přítomné protilátky, viriony s nimi vytvářejí komplexy a mohou se vázat na povrch buňky

pomocí Fc γ receptorů. Vstup virionu do buňky probíhá klathrin závislou receptory řízenou endocytózou.²⁰ Během poklesu pH endozomálního veziklu virus prochází konformačními změnami umožňujícími fúzi s endozomální membránou a uvolnění genomu do cytoplasmy. Genom ve formě pozitivní ssRNA slouží přímo jako mRNA, ze které je translatován virový polyprotein. RNA dále představuje templát pro membránově vázanou replikaci virového genomu, při které vzniká genetický materiál pro nové virové partikule. Jednotlivé kroky jsou znázorněny na obrázku 4.⁴



Obrázek 2: Životní cyklus DENV. Virus vstupuje do buňky receptory řízenou endocytózou. V důsledku změny pH se genom uvolňuje do cytoplasmy, kde dochází k replikaci a translaci. Na membránách endoplazmatického retikula se viriony DENV složí a dostávají se do lumen endoplazmatického retikula. V sekretorické dráze dochází opět ke změně pH, která vyvolá maturaci virionu.²¹

Welsch et al. (2009) pozorovali, jak virus indukuje v buňce rozsáhlé změny, aby si vytvořil příznivé podmínky pro replikaci, tzv. replikační továrny. V buňce vznikají spletité membránové struktury, které jsou odvozeny od endoplazmatického retikula. Membránové struktury slouží k oddělení různých kroků životního cyklu viru, zvýšení množství komponentů nutných pro účinnou replikaci na jednom místě a v neposlední řadě jako ochrana virové RNA proti buněčným nukleázám a innate imunitě. V membránových měchýřcích infikované buňky byla detekována dsRNA, která představuje intermediát při replikaci virové RNA. Pozorování potvrzují, že tyto struktury jsou místem virové replikace.²²

Na membránách ER se DENV složí a pučí do lumen ER jako nezralé viriony, které mají drsný povrch tvořený trimery proteinů E a prM. Během putování viru sekretorickou dráhou dochází ke změně pH, která způsobí změnu konformace proteinů a uzrání virionu. Buněčné proteázy v Golgiho aparátu odštěpí krátkou pr oblast z proteinu prM, což odkryje fúzogenní

oblast proteinu M. Protein M pak vytváří dimer s proteinem E. Konečné úpravy proteinu M vedou k přeskupení 60 trimerů proteinu E na 90 dimerů a vzniku hladkého povrchu maturované virové částice.²³

2.6. Přenos

Přirozeným hostitelem DENV jsou lidé a komáři. Rozšíření DENV koreluje s výskytem vektoru viru (primárně *Aedes aegypti*, ale i *Aedes albopictus*). Od poloviny 20. století dochází k rychlému nárůstu počtu infikovaných lidí. Rostoucí trend je pravděpodobně způsoben nárůstem populace v endemických oblastech, rozvojem mezinárodní dopravy a obchodu, kdy jsou s přepravovaným zbožím transportováni i infikovaní komáři, dále vlivem klimatických změn, ale také přesnější diagnostikou nákazy a dokumentací případů nakažených jedinců. Předpokládáme, že DENV se vyvinul u nehumánních primátů, kde jako vektor působí jiné druhy rodu *Aedes*, např. *Aedes furcifer*. Tyto druhy mohly infikovat člověka. K udržení infekčního cyklu pouze mezi komárem a člověkem však mohlo dojít teprve před cca 4 000 lety, kdy lidská populace dosáhla dostatečné hustoty pro takový přenos. V některých oblastech deštných lesů Asie a Afriky je stále zachován sylvatický cyklus, probíhající mezi nehumánními primáty a komáry rodu *Aedes*. Případy infekce skrze tento cyklus byly několikrát zaznamenány.²⁴ Nicméně tento typ nákazy se vyskytuje spíše ojediněle.

Přenos probíhá cyklicky z člověka na komára a zpět. Samička komára se infikuje DENV během nasátí krve viremické osoby. Krev obsahující virové partikule putuje trávicím traktem komára a v oblasti střeva se virus váže na receptory na povrchu epiteliálních buněk. V infikovaných epiteliálních buňkách se virus replikuje a nové virové partikule se dostávají do oblasti hemocoelu. Dochází k infekci dalších tkání, včetně slinných žláz.²⁵ Po pomnožení DENV ve slinných žlázách může komár infikovat člověka. Podle Nguyet et.al. (2013) k opětovnému přenosu z člověka na komára nejčastěji dochází do 5 dní od objevení prvních symptomů, tj. v období virémie.²⁶

2.7. Průběh infekce u člověka

Moskyti přenášející DENV infikují člověka skrze sliny obsahující virové partikule, které se dostávají do kůže, kde se nacházejí buňky prezentující antigen. K replikaci DENV primárně dochází v dendritických buňkách a makrofázích vyskytujících se v kůži. Infikované buňky imunitního systému putují do lymfatických uzlin, kde dochází k aktivaci T buněk, ale zároveň se tím usnadňuje systémové šíření DENV.²⁷

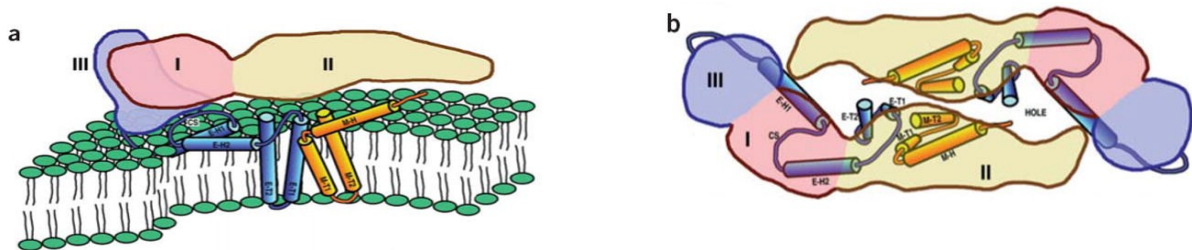
Infekční onemocnění způsobené DENV označujeme jako horečku dengue. Ve většině případů proběhne asymptomaticky, ale přibližně jedna čtvrtina nakažených vykazuje klinické příznaky. Inkubační doba horečky dengue je 3-8 dní, samotná nemoc trvá 1-8 dní, následná rekonvalescence pak může trvat i několik týdnů. Projevy onemocnění se mohou vyskytovat ve třech klinických formách, kterými jsou horečka dengue (DF), hemoragická horečka dengue (DHF) a dengue šokový syndrom (DSS). DF se projevuje horečnatými stavy, bolestí za očima, bolestí svalů, hlavy, nauzeou a gastrointestinálními problémy. Hemoragická forma horečky dengue, se vyznačuje krvácením do tkání a orgánů, trombocytopenií a leukopenií. Šokový syndrom dengue nastává v důsledku ztráty tělních tekutin a je doprovázený rychlým slabým pulzem, hypotenzí a zimnicí. Poslední dva život ohrožující projevy, se začaly hojně objevovat s kocirkulací více sérotypů DENV v rámci jedné oblasti. Více rizikovou skupinou pro vážnější formy dengue jsou děti infikované mezi 6. a 12. měsícem života. Primární infekce bývá obvykle asymptomatická nebo se vyvine v samolimitující až závažnou DF. Pokud dojde k sekundární infekci odlišným sérotypem DENV, existuje vyšší riziko závažnějšího průběhu nemoci. Případná terciální, kvarterní infekce má obvykle mírný průběh, který nevyžaduje hospitalizaci.²⁸

2.8. Imunitní odpověď při infekci

Porozumění přirozené imunitní odpovědi vyvolané DENV není stále kompletní, což v mnohých ohledech komplikuje vývoj vakcíny. Přítomnost DENV v organismu vyvolá reakci jak innátní, tak adaptivní složky imunitního systému. Po inokulaci DENV do kůže se jako první aktivují mastocyty, které internalizují virus. RNA viry představující pro tělo cizí objekt, jsou nejprve rozeznány odlišnými typy receptorů innátní složky imunitního systému. Brown et al. (2012) se zabývali mastocyty, které exprimují RNA senzory (PKR – protein kináza R, RIG-I – retinoic acid-inducible gene-I, MDA5 – melanoma differentiation-associated protein 5) a Toll-like3 receptory, které po rozpoznání virové RNA spouští signalizaci vedoucí k aktivaci interferon regulujících faktorů a jaderného faktoru κ B. IFN alfa/beta vysílají varovné signály okolním buňkám a významně se podílejí na minimalizaci virové replikace a odstranění infekce. Mastocyty produkují cytokiny a chemokiny (jako CCL4, CCL5, CXCL10), které přitahují další buňky imunitního systému.²⁹

Adaptivní imunita je zprostředkována tvorbou specifických protilátek a buňkami řízenou imunitou. Po infekci DENV tělo vytváří protilátky proti strukturálním proteinům E a prM ale i nestrukturálním proteinům, především NS1. Protein E společně s proteinem prM/M představují důležité antigenní struktury, které jsou exponovány na povrchu virionu, a jsou tudíž využívány

při konstrukci vakcín založených na různých technologiích (obrázek 5). Protein E je hlavním cílem pro protilátky. Je tvořen přibližně 500 AK (protein prM 166 AK) a na povrchu virionu zaujímá rozsáhlejší oblast.³⁰ Neutralizační protilátky rozpoznávají epitop na rozhraní dimeru E, který je vysoce konzervovaný. Sekvence AK tvořící protein E definuje každý ze čtyř sérotypů. Během sekundární infekce DENV jsou B lymfocyty produkovány jak sérotypově specifické neutralizační protilátky, tak zkříženě reaktivní nepřilíš neutralizující protilátky. Neutralizační protilátky blokují vazbu DENV na buňku a jeho vstup do buňky.³¹



Obrázek 3: Vlevo se nachází lipidická dvojvrstva s proteiny E a M. Protein E představující hlavní cíl protilátek se skládá z domény I (růžově), domény II (žlutě) a domény III (modře). Do membrány jsou kotveny pomocí vlásečkových a kotevnicových helixů proteinu E (modře) a proteinu M (oranžově). Vpravo je zobrazeno uspořádání do dimerů u maturovaného virionu.⁷

Role T lymfocytů během infekce DENV není zcela jasná, mohou mít jak protektivní úlohu, tak přispívat k patogenitě, a to především při sekundární infekci. Díky 65-70% homologii sekvencí čtyř sérotypů je vysoká pravděpodobnost zkřížené reaktivity během sekundární heterologní infekce.³² Yauch et al. (2009) došli k závěru, že aktivace CD8⁺ T buněčné odpovědi kontroluje DENV infekci. Úbytek CD8⁺ T lymfocytů vedl u myši k narušení schopnosti eliminace infekce a zmatně se zvýšilo množství viru v séru, slezině a mozku.³³ CD4⁺ buněčná odpověď hraje významnou roli při odstraňování DENV. CD4⁺ T lymfocyty rozpoznávají především proteiny E, C a NS1 obdobně jako B lymfocyty, zatímco CD8⁺ cílí na proteiny NS (NS3, NS5).³⁴

Během sekundární infekce může dojít k rozvoji závažného projevu nemoci v důsledku fenoménu antibody-dependent enhancement (ADE). Po první infekci se vytvoří časově omezená heterologní protekce, nicméně po určité době v organismu zůstává omezený počet slabě se vázajících neutralizačních protilátek. Při sekundární infekci vznikne komplex virus-protilátka, který se naváže na receptor Fc γ na povrchu antigen prezentujících buněk, což vede k internalizaci viru do buňky a zvýšení jeho replikace. Aktivace zkříženě reaktivních T lymfocytů vede k produkci nadměrného množství atypických cytokinů („cytokinová bouře“). Vysoká hladina pro-inflamatorních cytokinů vyústí ve zvýšení vaskulární permeability a únik plasmy.³⁵

U dětí narozených matkám se séropozitivním DENV dochází k částečné degradaci maternálně přenesených IgG. Přestože novorozenci vykazují hladinu protilátek, nejsou chráněni před nemocí. Průběh nemoci může být vážnější díky následnému ADE. Simmons et al. (2007) se zabývali dynamikou protilátek proti DENV u novorozenců od seropozitivních matek. Anti-DENV IgG byly detekovány u 98 % dětí ve věku 6 měsíců, u 84 % 9měsíčních a v 53 % u 12měsíčních. Všechny děti byly zároveň IgM negativní.³⁶

3. Vakcíny proti viru dengue

3.1. Obecné informace

Výzkumem vakcíny proti DENV se zabývá mnoho laboratoří po celém světě. Navzdory více než 70leté snaze se nepodařilo zkonstruovat vhodnou vakcínu. První kroky vedoucí k vyvinutí vakcíny proti DENV byly udělány již v 1. polovině minulého století. Prevence přenosu DENV měla být zajištěna pomocí vakcíny obsahující lidskou infekční plasmu, ve které byl DENV inaktivován přidáním kravské žluči nebo formalínem. Ve 40. letech Albert Sabin et al. (1945) vyvinuli první vakcínu proti DENV. Vznikla několikanásobným pasážováním divokého kmene (wt) DENV v myším mozku, během kterého došlo k atenuaci viru.³⁷ V 70. letech se začaly používat pro vývoj vakcíny proti DENV buněčné kultury. Nicméně cesta k vyvinutí vhodné vakcíny je velice dlouhá a doprovázena mnohými komplikacemi. Ačkoliv CYD-TDV je licencována od roku 2015 v několika zemích, její účinnost se pohybuje v průměru kolem 60% v závislosti na sérotypu, věku a sérostatusu vakcinovaného jedince. Nedostatečná účinnost, odlišná efektivita u dengue naivních jedinců a jedinců, kteří prodělali infekci DENV, a problematika s vakcinací malých dětí zvyšuje poptávku po nové vakcíně.

3.2. Komplikace při vývoji vakcíny

Ačkoliv na některá onemocnění způsobená flaviviry vakcíny již existují, skupiny výzkumníků pracující na vývoji bezpečné a účinné vakcíny proti DENV se potýkají s řadou problémů a komplikací. Stále nejsou známy některé procesy probíhající v rámci reakce imunitního systému na infekci DENV, což mnohdy způsobuje rozpory mezi preklinickými a klinickými testy. Velká pozornost byla věnována potencionálnímu rozvoji ADE po aplikaci vakcíny. V případě, že není vakcínou indukováno dostatečné množství protilátek, nedochází k ochraně jedince, ale naopak k procesům, které vedou k usnadnění vstupu viru do buněk a jeho následné replikaci. Další komplikací by mohl být úbytek protilátek po uplynutí určité doby od očkování. Jejich koncentrace klesne na hladinu, která při potenciálním styku s DENV vede k ADE. Detekce neutralizačních protilátek v preklinických studiích neodpovídá hodnotám, které

byly získány v následných klinických studiích, což vede k řadě zkresleným údajům ohledně optimální hladiny protilátek.³⁸

Zásadní obtíží spojenou s vývojem účinné vakcíny je fakt, že neexistuje zvířecí model, který by věrohodně mimikoval variabilní manifestaci DENV, shrnul děje probíhající v rámci přirozené infekce, patogenitu a imunitní odpověď. Například u myši (*Mus musculus*), jednoho z hlavních modelových organizmů, nedochází přirozeně k infekci DENV. Infikováni jsou pouze jedinci s výrazně oslabenou imunitou, kterými jsou například myši s absencí IFN receptorů typu I a II (AG129 myši) nebo IFN receptoru typu I (IFNAR^{-/-} myši). U nich dochází k masivní replikaci kmene DENV adaptovaného na myši. Absence receptorů pro IFN však způsobuje velmi atypický průběh imunitní odpovědi. Aby byly organizmy schopné adekvátní imunitní odpovědi, je třeba vytvořit minimálně upravený model, který bude náchylný k DENV, ale zároveň zajistí možnost studovat imunitní odpověď a bude ideální pro testování vakcín. Züst et al. (2014) zavedli u myši podmíněnou delecí IFNAR na určitých buněčných podtypech. Jedinci postrádající IFN receptor typu I na dendritických buňkách CD11c⁺ a makrofázích LysM⁺ podléhají DENV infekci kompletně. Myši s deficitem v receptoru na dendritických buňkách nebo makrofázích jsou také nakaženy, ale imunitní reakce je zachována a infekce eliminována.

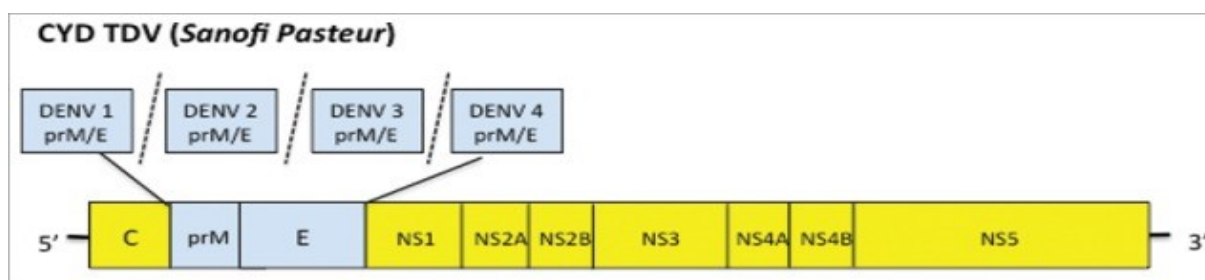
Pro testování *in vivo* se využívají myši s engraftovanými lidskými hematopoetickými progenitorovými buňkami. V tomto případě je ale obtížné udržet kontinuální produkci protilátek. Dalším obvyklým zvířecím modelem pro testování účinnosti kandidátních vakcín jsou nehumánní primáti, u kterých však po očkování nedochází k rozvoji klinických symptomů, navíc zde vyvstávají etické otázky, nároky na optimální podmínky pro zvířata a vysoká cena.³⁹ Dále se po II. a III. fázi klinických testů ukázalo, že vakcinace, která u primátů zajistí kompletní ochranu, vyvolá u lidí pouze slabou imunitní odpověď.⁴⁰

4. CYD tetraivalentní dengue vakcína, CYD-TDV, živá atenuovaná vakcína

4.1. Obecné informace

Jedinou licencovanou vakcínou sloužící k prevenci DENV je živá atenuovaná chimérická tetraivalentní vakcína (Dengvaxia, CYD-TDV, zkratka z angl. *Chimeric Yellow Fever-Dengue, Live-Attenuated, Tetraivalent Dengue Vaccine*). Počátek výzkumu této vakcíny je v 90. letech minulého století. Tvoří ji 4 rekombinantní živé chimérické viry, jejichž základem je vakcinační kmen viru žluté zimnice YF 17D, ve kterém jsou nahrazeny geny prM a E YFV příslušným genem DENV, jak je znázorněno na obrázku 6. Každý vakcinační virus tak exprimuje geny

prM a E jednoho ze čtyř sérotypů DENV. Vakcinační virus ChimeriVax-DEN1-4 je připravován v buňkách Vero, které byly elektroporovány RNA transkriptem získaným z virové cDNA. CYD-TDV byla schválena na základě dvou klinických studií fáze III prováděných v Asii a Latinské Americe, které prokázaly ochranu proti DENV. Celková účinnost vakcíny proti infekci DENV se symptomatickým projevem byla okolo 65,6 % (95 % CI 60,7-69,9). Výsledky studií dokazují odlišnou účinnost v závislosti na konkrétních podmínkách, což je podrobněji rozepsáno dále v textu.⁴¹



Obrázek 6: Schéma rekombinantní vakcíny CYD-TDV. Každý ze čtyř vakcinačních virů obsahuje základ z vakcinačního kmenu YF 17D (žlutě). Oblast pro proteiny prM a E pochází z příslušného sérotypu DENV1-4 (šedě).⁴²

4.2. Vakcína proti YFV, YF-VAX, živá atenuovaná vakcína

Chimérická vakcína CYD-TDV proti DENV, stejně jako licencovaná chimérická vakcína proti JEV, vycházejí z úspěšné a dlouhodobě používané vakcíny proti YFV, představující prototyp flavivirů. YF-VAX je jedna z nejstarších živých atenuovaných vakcín. Byla vyvinuta již ve 30. letech 20. století souběžně ve dvou formách založených na odlišných izolovaných kmenech. Threiler et al. (1930,1937) pracovali s vysoce nakažlivým virem kmene Asibi YFV (izolace roku 1927), který byl mnohokrát pasážován v myších embryích, kuřecí embryonální tkáňové kultuře a kuřecí embryonální tkáňové kultuře s odstraněnou nervovou tkání, čímž vznikl atenuovaný YFV 17D-204, který byl ale schopný navodit imunitní odpověď. Během vývoje vakcinačního viru bylo žádoucí dosáhnout snížení viscerotropismu a neurotropismu, čehož bylo u obou kmenů dosaženo prodloužením kultivace v buněčné kultuře.^{43 44} Druhým vakcinačním kmenem byl francouzský neurotropní virus (FNV) získaný mnohonásobným pasážováním francouzského viscerotropního viru (FVV). V roce 1982 se z důvodu výskytu vážných vedlejších účinků, encefalitidy u dětí, přestal používat. Později Beck et al. (2018) prokázali genetickou nestabilitu a tendenci FNV k neurotropismu.⁴⁵ V kontrastu k FNV se u 17D vakcíny substituční mutace ovlivňující atenuaci téměř vůbec nevyskytují.⁴⁶

4.3. Vývoj CYD-TDV

Prototypem CYD-TDV je chimérický virus YF/DENV2 (ChimeriVax-D2). Sekvence pro prM a E DENV 2 kmenu PUO-218, izolovaného z dítěte s primární infekcí DENV během epidemie v Bangkoku, byly vloženy do komplementární DNA (cDNA) YF 17D. Zkonstruováním chimérických vakcinačních virů se zabývali Guirakhoo et al. (2000, 2001). Postup skládání chimérického viru ChimeriVax-D2 probíhal v několika krocích. Požadované sekvence DENV prM a E byly amplifikovány RT-PCR a vloženy odděleně do dvou vektorů s genomem YF-17D. Poté byly sekvence obou vektorů štěpením restriktivními endonukleázami a ligací zkombinovány za vzniku konečného vektoru s chimérickým genomem YF/DENV2. Sekvenací byla ověřena správnost konstruktů. Po linearizaci vektoru byla DNA transkribována z promotoru SP6 do RNA, kterou byly transfekovány buňky Vero za použití Lipofectinu, a v kterých došlo k pomnožení vakcinačního chimérického viru.⁴⁷

Obdobně jako chiméra YF/DENV2 byly zkonstruovány chiméry YF/DENV1, YF/DENV3 a YF DENV/4. Sekvence DENV1 pochází z kmenu PUO359 izolovaného v roce 1980 z pacienta v Thajsku, sekvence DENV3 z kmenu PaH881/88 izolovaného v Thajsku z pacienta s DF roku 1988 a sekvence DENV4 z kmenu 1228 izolovaného z pacienta s DF v Indonésii roku 1978. Drobné odchylky od výše popsaného postupu klonování u dalších kmenů DENV si vynutila nestabilita vektoru způsobená 3' koncem sekvence E DENV1 nebo toxicita produktu DENV3 v *Escherichia coli*.⁴⁸

4.4. Aplikace CYD-TDV

U většiny živých atenuovaných vakcín dochází k ochraně jedince již po aplikaci jedné dávky vakcíny, jako je tomu například u YF-VAX. Ve výjimečných případech je nutné v pozdější době jedince přeočkovat. Hlavním důvodem použití vakcín o jedné dávce je princip fungování samotné vakcíny. Po aplikaci dávky se v těle očkovaného jedince začnou tvořit protilátky proti antigenům, které jsou schopné blokovat infekci a replikaci viru obsaženého ve druhé dávce. V případě, že druhá dávka výrazně zvýší titr protilátek, znamená to, že primární odpověď nebyla dostatečně silná a není schopna neutralizovat virus využívaný pro vakcinaci. Ten se po vstupu do organismu opět replikuje. CYD-TDV se aplikuje v objemu 0,5mL. Oproti původnímu předpokladu vakcinační schéma vyžaduje 3 dávky v časovém rozmezí 0-6-12 měsíců.⁴⁹

4.5. Preklinické studie CYD-TDV

V rámci preklinických studií se prokazovala stabilita vakcíny, tropismus a schopnost replikace viru. Zároveň se k CYD-TDV přistupovalo jako ke geneticky modifikovanému organismu, tudíž se musela vyloučit možnost rekombinace s cirkulujícím virem, infekce vektoru DENV a reverze k virulenci. Dlouhý proces testování nové vakcíny začal *in vitro* ověřováním genetické stability během mnohonásobného pasážování. Pugache et al. (2004) vycházeli z předpokladu, že YFV 17D vakcinační virus vykazuje vysokou stabilitu *in vitro* i *in vivo*. Genetická stabilita se prokázala i u CYD-TDV, nejspíše na základě poměrně nízké chybovosti RNA polymerázy YFV, která je zodpovědná i za replikaci ChimeriVax1-4 viru.⁵⁰

Jelikož je CYD-TDV tvořena z velké části YFV, jenž vykazuje neurotropismus a viscerotropismus, mnohé studie se věnovaly právě této problematice. Tropismus flavivirů je spjat především s proteinem E, z čehož se dá odvodit, že CYD-TDV by neměla vykazovat stejný tropismus jako YFV 17D. Brandler et al. (2005) testovali tropismus na jaterních buněčných liniích, potencionálních markerech viscerotropismu, HepG2 a THLE3, u kterých byl titr významně nižší než u YF 17D. U linie Huh7 se CYD-TDV replikoval se stejnou efektivností jako YF-VAX, což mohlo být zapříčiněno vysokou permisivitou těchto buněk vůči viru. Celkové výsledky nicméně ukazují, že CYD-TDV je u lidí méně hepatotropický než YF-VAX.⁵¹

Přenos CYD-TDV viru komářím vektorem se testoval na *Aedes aegypti* a *Aedes albopictus*, hlavních vektorech DENV. Komáři byli krmeni na krvi obsahující viry a následně byla hodnocena infekce a šíření. CYD-TDV virus nebyl schopný infikovat komáry orální cestou a po intratorakální inokulaci se replikovat ve středním střevě. Kandidátní vakcinační viry jevíly vysokou atenuaci. Vzhledem k nízké viremické hladině u vakcinovaných lidí, je riziko infekce a transmise moskyty v přírodě minimální.⁵² Mezi rozdílnými RNA viry, včetně flavivirů, dochází velmi vzácně k intermolekulární rekombinaci. Rekombinace vakcinačního CYD-TDV viru s wt DENV, flaviviry či jinými RNA viry, by potencionálně mohla vést ke vzniku viru s nepředvídatelnými vlastnostmi, pozměněnou patogenitou a antigenitou. Taucher et al. (2010) experimentálně ověřili velice nízkou pravděpodobnost rekombinace u flavivirů a prokázal, že chimérické viry jeví silné znaky atenuace ve srovnání s wt. Riziko samotné rekombinace je také velice nízké, a proto kumulativní riziko je extrémně minimální. Na základě prokázané genetické stability CYD-TDV je reverze na virulentní YFV prakticky nemožná.⁵³

In vivo preklinické studie se zaměřovaly na sledování virémie v porovnání s virémií vyvolanou wt, na schopnost daného viru navodit imunitní reakci v organismu, dávkování vakcín a vakcinační formulace. V rámci vlivu na organismus a jeho přirozené fungování se

testovala také fertilita, vývoj plodu a následně vývoj narozeného jedince.⁵⁴ Neurovirulenci a imunogenicitu testovali Guirakhoo et al., (2000) na 4 týdny starých myších, bezpečnost a účinnost na makacích (*Macaca mulatta*). Během testování dostaly různé skupiny primátů odlišné dávky ChimeriVax-D2, kontrolní skupina byla inokulována pouze fosfátovým pufrům. Všechny očkované opice měly detekovatelnou virémii, ale nevykazovaly žádné symptomy. Po 62 dnech od imunizace byla zvířata naočkována wt DENV2. Žádná virémie nebyla detekována u očkovaných jedinců, naopak v kontrolní skupině se virémie vyvinula u všech zvířat. Vakcinované opice vytvořily neutralizační protilátky. Během této fáze se hledala i minimální dávka prototypu chimérického viru ChimeriVax-D2, která již poskytne ochranu jedinci proti wt DENV2.⁴⁷

V některých multivalentních vakcínách dochází k interferenci mezi odlišnými antigeny v rámci jedné vakcinační formulace. Mezi ně spadá i CYD-TDV. U tetravalentní formulace je velice obtížné dosáhnout rovnocenné efektivity replikace jednotlivých virových sérotypů, čímž se některé sérotypy stávají dominantní a interferují s ostatními komponenty vakcíny. Guy et al. (2009) prováděli studie na opičích modelech s tetravalentní formulací, která obsahuje jednotlivé složky se stejným zastoupením. Jako parametry zmírňující interferenci antigenů formuloval následující: současné podání dvou komplementárních bivalentních vakcín na odlišných stranách těla, které jsou tak čištěny odlišnými lymfatickými uzlinami; vytvoření heterologní flavivirové preimunity před následnou tetravalentní imunizací; uzpůsobení formulací snížením dávky imunodominantních sérotypů; přeočkování.⁵⁵

4.6. Klinické studie CYD-TDV

V první klinické studii kandidátní CYD-TDV vakcíny s monovalentním ChimeriVax-D2 vakcinačním virem, vedené Guirakhoo et al. (2006), byla posuzována bezpečnost, tolerance a imunogenicita u dospělých, kteří v minulosti neprodělali žádnou infekci virem z rodu flavivirů. Komplikací při očkování monovalentní vakcínou je potencionální vystavení jedince heterolognímu sérotypu, což může mít za následek rozvoj ADE. Proto se studie odehrávaly v USA, případně jiných zemích, kde se DENV nevyskytuje. Rovněž byly vyloučeny osoby cestující do zemí s častým výskytem DENV. Aplikovaná dávka byla stejná jako u YFV-VAX, neboť se v důsledku formulace CYD-TDV očekávala totožná účinnost replikace jako v případě YF vakcinačního viru. Nižší dávka byla stanovena podle výsledků preklinických studií u primátů. Pro určení vlivu imunity proti YFV na ChimeriVax-D2 vakcínu byli někteří jedinci nejprve vakcinováni YF-VAX, poté dostali vysokou dávku vakcíny proti DENV. Výsledky

studie vedly k závěru, že dříve vytvořená imunita proti YFV neinterferuje s imunitní odpovědí na CYD-TDV.⁵⁶

Morrison et al. (2010) následně testovali toleranci a imunogenicitu u tetravalentní formulace CYD-TDV. První dávka CYD-TDV indukuje neutralizační protilátky především proti DENV2 a DENV4, méně proti DENV1 a DENV3. U recipientů byla detekována nízká hladina virémie (převážně DENV4). Po druhé dávce CYD-TDV byla pozorována virémie pouze v ojedinělých případech (DENV2). Absence DENV4 virémie po druhé dávce byla pravděpodobně způsobena silnou humorální odpovědí na YF/DENV4, kterou vyvolala aplikace první dávky. Třetí dávka vakcíny indukuje kompletní sérokonverzi u všech čtyř sérotypů.⁵⁷ Během druhé fáze klinických studií se testovala bezpečnost a imunogenita CYD-TDV při zrychleném vakcinačním schématu v populaci s rozdílnou historií infekce flaviviry a očkování jinými živými atenuovanými vakcínami.⁵⁸

CYD-TDV byla licencována na základě 3 klinických studií, zaměřujících se na účinnost vakcíny v Asijsko-pacifické oblasti a v Latinské Americe, které zahrnovaly více než 31 000 dobrovolníků ve věku 2 až 16 let. Fáze IIb odehrávající se v Thajsku⁵⁹ a fáze III v Latinské Americe⁶⁰ a Asii⁶¹ vedly k licencování CYD-TDV a jsou podrobněji rozebrány níže v textu. V rámci klinických studií CYD-TDV, které i přes částečný neúspěch této vakcíny stále pokračují, se také testuje bezpečnost a imunogenita u imunitně oslabených jedinců, jako jsou například dospělí pacienti s HIV. Vědci se zaměří především na bezpečnost a humorální imunitní odpověď, detekci virémie, změny v počtu CD4⁺ a nálož RNA HIV po vpravení CYD-TDV.⁶²

4.7. Komplikace vycházející z výsledků klinických studií

CYD-TDV nenaplnuje v některých ohledech původní představu. Mezi zásadní problémy se řadí její omezení pouze pro dengue séropozitivní osoby určité věkové kategorie a nevyrovnaný účinek proti jednotlivým sérotypům DENV. Během klinických studií CYD-TDV byla pozorována početnější hospitalizace u vakcinovaných dětí ve věku 2 až 5 let. Jedna z hypotéz byla, že CYD-TDV v dengue naivních recipientech mimikuje primární infekci a vystavuje tyto jedince riziku závažného průběhu následné infekce, tj. analogie s přirozenou primární a sekundární infekcí. Přesnou míru rizika v závislosti na dengue sérostatusu bylo velmi obtížné určit, neboť bylo k dispozici velmi limitované množství vzorků získaných před aplikací první dávky. Za tímto účelem byla vytvořena imunoenzymatická metoda (ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay), pomocí které se odlišily anti-NS1 IgG protilátky indukované DENV a vakcínou (CYD-TDV má oblast genu kódující protein NS1 viru žluté zimnice YF

17D). U dengue séropozitivních jedinců ve věku 2 až 16 let je snížení výskytu nemoci přibližně o 70 % ve srovnání s kontrolní skupinou. Po zúžení věkové kategorie na 9 až 16 let byla četnost závažného průběhu nemoci o 80 % nižší než v kontrolní skupině. Naopak u séronegativních recipientů je hospitalizace a závažný průběh infekce častější v imunizované skupině. U dětí ve věku 9 až 16 let se objevovaly komplikace nejčastěji během třetího roku od aplikace první vakcíny, zatímco u mladších jedinců k tomu docházelo dříve. Data potvrdila dlouhotrvající protekci u séropozitivních vakcinovaných jedinců. Souběžně ale prokázala zvýšené riziko hospitalizace a závažného průběhu infekce u séronegativních recipientů ve srovnání se séronegativními nevakcinovanými jedinci. To potvrzuje hypotézu, že CYD-TDV u séronegativních jedinců částečně mimikuje primární infekci a po potencionálním poklesu protilátek zvyšuje riziko závažného průběhu následující infekce. Proto by v zemích zvažujících zařazení CYD-TDV měly být zavedeny spolehlivé diagnostické metody a proveden prevakcinační screening, který vyloučí z programu všechny séronegativní jedince.⁶³

Fáze IIb probíhala od roku 2007 u dětí ve věku 4-11 let v Thajsku. Během studie, která zahrnovala 4 002 účastníků, bylo potvrzeno 134 případů nákazy DENV (dominoval DENV2). Účinnost vakcíny dosahovala v průměru 30,2 %, ale lišila se pro jednotlivé sérotypy. Pro DENV1 byla 61,2 %, DENV3 81,9 % a DENV4 90,0 %. Nicméně pro DENV2, která představovala 59 % ze 134 případů, dosáhla pouze 3,5% účinnosti. Tento výsledek byl překvapivý, protože během preklinických testů byla zjištěna imunogenicita proti DENV2 srovnatelná se zbylými sérotypy. To nás odkazuje zpět k faktu, že doposud není zcela zřejmá přesná reakce imunitního systému na infekci DENV a zapojení všech složek imunity.⁵⁹

Klíčová III. fáze klinických studií se odehrávala v Asii u 2-14letých dětí a ve Střední a Jižní Americe u 9-16letých dětí. Studie v Asii zahrnovala země s endemickým výskytem (3 centra v Indonésii, 2 centra v Malajsii, 2 centra na Filipínách, 3 centra v Thajsku, 2 centra ve Vietnamu). Celková účinnost vakcíny během této fáze dosahovala 56,5 %. Konkrétně účinnost proti DENV3 a DENV4 byla 75 %, proti DENV1 50 % a proti sérotypu DENV2 35 %. Odlišné protektivní účinky ve srovnání s předchozí studií jsou způsobeny rozdílnou distribucí sérotypů a odlišnou charakteristikou kmenů. Studie se účastnilo 10 275 dětí, které byly očkovány CYD-TDV nebo placebem. Opět se potvrdilo, že účinnost byla vyšší u jedinců, kteří již dříve DENV infekci prodělali než u těch, kteří byli séronegativní. Dále se během této studie ukázalo, že starší děti jsou chráněny s vyšší účinností než mladší.⁶¹ Studie ve Střední a Jižní Americe, (9 center v Kolumbii, 5 center v Brazílii, 5 center v Mexiku, 2 centra v Portoriku a 1 centrum v Hondurasu) se zúčastnilo 20 869 dětí, které obdržely CYD-TDV vakcínu (13 920) nebo placebo (6 949). Celková účinnost vakcíny byla v této studii 60,8 %. Pro jednotlivé sérotypy se

opět lišila. U DENV1 byla stanovena na 50,3 %, u DENV2 42,3 %, u DENV3 74,0 % a DENV4 77,7 %.⁶⁰

K diagnóze dengue, séroprevalenční analýze nebo sledování průběhu onemocnění se využívá sérologických testů detekujících specifický imunoglobulin M (IgM) nebo imunoglobulin G (IgG) proti DENV. Tyto testy ale mohou být ve spojitosti s vakcínou proti DENV zavádějící. Použití sérologických testů u recipientů CYD-TDV může vést ke znatelnému zvýšení falešné pozitivivity. V zemích s vysokým výskytem DENV, kde bylo schváleno užívání CYD-TDV, je potřeba nových diagnostických postupů. Vhodné jsou detekce specifického NS1 antigenu nebo pomocí PCR, což ale obnáší komplikovanější diagnostikování a vyšší náklady. Další výzvu ohledně problematiky DENV představuje vytvoření spolehlivého a jednoduchého testování na dengue sérostatus.⁶⁴

Výsledky klinických studií fáze II a fáze III ukazují na větší účinek CYD-TDV vakcíny proti sérotypu DENV4 než proti DENV2. Data jsou překvapivá, neboť preklinické studie na nehumánních primátech hovořily o srovnatelných hodnotách účinnosti u obou sérotypů. Touto problematikou se zabýval Barban et al., (2018), který testoval reakci imunitního systému nehumánních primátů na CYD-TDV a na následnou inokulaci DENV2 a DENV4. K přeceňování účinnosti vakcíny mohly přispět odlišné hodnoty maximální virové nálože vyvolané subkutánní inokulací makaka a přirozenou infekcí člověka, u kterého je virémie znatelně vyšší.⁴⁰

5. Vakcíny ve fázi klinických studií

5.1. TetraVax-DV, živá atenuovaná dengue vakcína

TetraVax-DV je živá atenuovaná vakcína nacházející se ve III. fázi klinických studií. Hlavním cílem výzkumníků podílejících se na vývoji TetraVax-DV bylo, mimo jiné záměry, vytvořit vakcínu, která bude indukovat ochranu proti čtyřem sérotypům po aplikaci jedné dávky, čímž by se významně odlišovala od výše zmíněné CYD-TDV. TetraVax-DV obsahuje na rozdíl od CYD-TDV DENV proteiny NS, které stimulují CD8⁺ T buňky, jež zajišťují významnou část imunitní odpovědi na DENV (viz. výše). K atenuaci se využily dvě strategie, delece v 3'UTR a chimerizace mezi jednotlivými sérotypy DENV. Prototyp monovalentní kandidátní vakcíny představuje virus rDEN4Δ30, který má deleci 30 nt. Podobně byla 30 nt sekvence odstraněna u zbylých sérotypů DENV. U sérotypů DENV2 a DENV3 byla navíc kvůli nedostatečné atenuaci provedena chimerizace s kandidátní vakcínou rDEN4Δ30, ze které se odstranily sekvence kódující proteiny prM a E a nahradily odpovídající sekvencí

jednotlivých sérotypů. Kandidáti s nevhodnější atenuací a imunogenicitou byli použiti pro následující klinické fáze.⁶⁵

5.1.1. Vývoj TetraVax-DV

rDEN4 Δ 30 je živý rekombinantní virus DEN4 odvozený z kmene 814669 a obsahující 30 nt delecii 172–143 ve 3'UTR. V 3'UTR se mohou vytvářet sekundární struktury zásadní pro replikaci viru, čímž se tato oblast stává vhodným cílem pro atenuaci. Men et al. (1996) zavedli za účelem vytvoření životaschopných mutantů do oblasti 3'UTR DENV4 cDNA mnoho delecií v rozmezí 30 až 262 nt. Z těchto mutantů vybírali ty, které se replikovaly hůře než wt, ale byly schopné vyvolat dostatečnou protilátkovou odpověď u makaků.⁶⁶ Následné testy u dobrovolníků naznačily, že atenuace nemusí být dostatečná, což se projevilo zvýšením hodnot alaninaminotransferázy v krvi u očkovaných osob. Blaney et al. (2001) proto dodatečně atenuovali virus rDEN4 Δ 30 chemickou mutagenezí a získali rDEN4 Δ 30-200,201 a rDEN4 Δ 30-4995.⁶⁷ Nicméně k dalším testům se stále používal i rDEN4 Δ 30 bez dodatečných mutací, podávaný v menší dávce.

Delece 30 nt v 3' UTR oblasti analogické rDEN4 Δ 30 byla provedena u wt DENV1 Western Pacific. Všechny opice inokulované rDENV1 Δ 30 byly kompletně chráněny před následnou inokulací wt DENV1.⁶⁸ Také u sérotypu DENV2 Blaney et al. (2004) nejprve odstranili 30 nt z 3'UTR. Z kmene izolovaného v roce 1974 vytvořili vakcinační virus rDEN2 Δ 30. Ten nebyl schopen infikovat střední střevo *Aedes aegypti*, avšak po inokulaci makaků způsobil virémii, při které titr a doba trvání byly pouze o něco nižší než u wt DENV2 Tonga/74.⁶⁹ rDEN2 Δ 30 tedy nebyl vhodným vakcinačním virem kvůli nedostatečné atenuaci. Při odlišném postupu konstruování DENV2 vakcíny bylo využito jak introdukce Δ 30 do 3'UTR, tak chimerizace mezi dvěma odlišnými sérotypy. Whitehead et al. (2003) použili vakcinační kmen rDEN4 Δ 30, ve kterém zaměnili oblast pro proteiny prM a E za stejnou oblast ze sérotypu DENV2.⁷⁰ Vznikla chiméra mezi dvěma sérotypy rDEN2/4 Δ 30, exprimující strukturní proteiny sérotypu DENV2, která indukuje nízkou virémii podobně jako rDEN4 Δ 30.⁷¹

Postup přípravy vakcinačního kmenu proti DENV3 nebyl přímočarý. Blaney et al. (2004) použili kmene DENV3 Sleman/78 izolovaného z pacienta v roce 1978 během epidemie v Indonésii k přípravě tří virů. Dva byly chimerické, kde v sérotypu DENV4 s 30 nt delecí v 3'UTR nebo bez ní nahradily oblasti pro proteiny prM a E za příslušný fragment DENV3, čímž se získaly chimerické viry rDEN3/4 Δ 30(ME) a rDEN3/4(ME). Třetí virus rDEN3 Δ 30 vznikl po delecii 30 nt v 3'UTR oblasti wt DENV3. Oba chimerické viry jeví vysoký stupeň atenuace a u inokulovaných opic vyvolaly protektivní imunitní odpověď proti následné infekci

DENV3. Naopak rDEN3Δ30 nebyl ve srovnání s wt DENV3 atenuován v žádném modelovém organismu.⁷² Následující klinické testy ukázaly, že vakcinační virus rDEN3/4Δ30(ME) je příliš atenuovaný.⁶⁵ Blaney et al. (2008) proto zkoušel atenuovat kmen DENV3 Sleman/78 pomocí různých delecí v 3'UTR oblasti. Z několika konstruktů měl všechny vhodné vlastnosti pro vakcinační virus rDEN3Δ30/31, u kterého byly deletovány dvě sekvence, první 30 nt dlouhá odstranila nt 173-143 obdobně jako v prototypovém viru rDEN4Δ30 a druhá 31 nt v pozici 258-228 v 3' UTR (nt jsou číslovány od 3'konce). Další přístup k přípravě vakcinačního DENV3 vedl přes chimérický vir rDEN3-3'D4Δ30, kde byl nahrazen celý 3' UTR rDENV3 za 3' UTR rDEN4Δ30. Oba viry, rDEN3Δ30/31 i rDEN3/4Δ30, indukovaly u makaků dostatečnou tvorbu neutralizačních protilátek a zajišťovaly ochranu proti wt DENV3.⁷³

5.1.2. Klinické studie TetraVax-DV

Navzdory omezené replikaci v nehumánních primátech, indukuje rDEN4Δ30 neutralizační protilátky u všech imunizovaných opic. Troyer et al. (2001) ověřovali riziko potencionálního šíření atenuovaného viru v komárech. Dospěli k závěru, že na rozdíl od wt DENV4 má rDEN4Δ30 velice omezenou možnost infekce komářího středního střeva, a ještě menší pravděpodobnost šíření do slinných žláz. Vakcinační virus nebyl detekován v žádném komárovi sajícím na očkovaných subjektech.⁷⁴ 42 dní po vakcinaci byla zvířata inokulována wt DENV4 a v žádném modelovém organismu nebyla detekovaná virémie. Tím byla ověřena vhodnost rDEN4Δ30 vakcinačního viru pro klinické studie.⁷⁰

V klinických studiích Durbin et al. (2013) hodnotili nejprve několik kandidátních vakcinačních virů (rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30(ME), rDEN3-3'D4Δ30, rDEN3Δ30/31, rDEN4Δ30 a rDEN4Δ30-200,201). Nejvyváženější protilátková odpověď byla dosažena kombinací rDEN1Δ30, rDEN2/4Δ30(ME), rDEN3Δ30/31 a rDEN4Δ30, která byla označena TV003.⁷⁵ Během monovalentní aplikace dávky rDEN2/4Δ30 byly virem infikovány všechny subjekty, ale v rámci tetravalentní kombinace byl tento virus infekční nejméně. Proto se u TV005 vakcíny aplikuje o řád vyšší dávka rDEN2/4Δ30, jinak se neliší od kombinace TV003.⁷⁶

II. fáze klinické studie se zaměřila na vakcínovou formulaci TV005. Studie probíhající v Bangladéši (epidemie v roce 2000, od té doby nepřetržitý výskyt DENV) se zúčastnilo 192 lidí ve věku 1 až 50 let. Kompletní výsledky zatím nejsou známy, plánované ukončení studie je v únoru 2020.⁷⁷ III. fáze klinických studií zahrnuje 16 944 zdravých jedinců ve věku 2 až 59 let. Probíhá na několika místech v Brazílii, která jsou charakteristická vysokou DENV transmisí, a zaměřuje se na bezpečnost a účinnost vakcíny. Ukončení se plánuje v prosinci 2025.⁷⁸

5.2. DENVax, živá atenuovaná dengue vakcína

DENVax (Takeda), rekombinantní chimérická živá atenuovaná tetravalentní vakcína proti DENV, je jednou z kandidátních vakcín momentálně se nacházejících ve III. fázi klinických testů. Vychází z živého atenuovaného vakcinačního viru DENV2 PDK-53, který se liší od parentálního kmenu DENV2 16681 v 9 nt a 5 kódujících AK. Tento virus posloužil jako základ pro ostatní sérotypy DENV. Oblast pro protein prM a E u původního viru byla vždy vyměněna za stejnou oblast z příslušného sérotypu, čímž vznikly viry TDV1, TDV3 a TDV4. Vakcína na rozdíl od CYD-TDV obsahuje oblast pro NS proteiny DENV2, takže je schopná indukovat proti DENV buněčnou imunitní a anti-NS1 protilátkovou odpověď obdobně jako TetraVax-DV.^{79 80}

5.2.1. Vývoj DENVax

Živé atenuované viry DENV2 PDK-53 byly získány 53násobným pasážováním izolátu D2 16681 v primárních psích ledvinných buňkách (PDK – primery dog kidney cells). Kmen PDK-53 se vyskytuje ve dvou genetických variantách, protože mutace v oblasti genu kódujícího protein NS3 byla nalezena jenom u některých virů. Kinney et al. (1997) připravili cDNA z obou variant kmene PDK-53. Varianta PDK53-V obsahuje všech 9 mutací, kterými se odlišuje od parentálního kmene, včetně mutace Glu-Val v pozici 250 proteinu NS3. Druhá varianta PDK53-E nemá poslední mutaci v pozici 250 proteinu NS3 a odlišuje se tedy v osmi nt. Zmíněná mutace není hlavním determinantem atenuace, nicméně ovlivňuje replikaci viru *in vitro*.⁸¹ Atenuace viru PDK-53 jsou důsledkem mutací v oblasti 5'-UTR a proteinů NS1 a NS3. Mutace v oblasti proteinu prM vykazuje pouze malou nebo žádnou změnu fenotypu. Žádná mutace se nevyskytuje v oblasti kódující proteiny C, M a E, což umožňuje tvorbu chimérických virů výměnou strukturálních proteinů při zachování atenuace viru.⁸⁰

Virové sekvence použité ve vakcíně DENVax mají původ v kmenech D1 16007, D2 16681 izolovaných z pacientů s DHF/DSS z Thajska. D3 16562 byl izolován z pacienta s DHF/DSS na Filipínách a kmen DENV4 1036 byl izolován z dětského pacienta s DF v Indonésii.⁸² Pro výběr vhodných kandidátů byl vytvořen větší soubor kandidátních virů, kde oblasti obsahující geny prM a E wt D1, D3 a D4 byly aplikovány na genetické pozadí jak rodičovského viru D2 16681 viru, tak na jeho dvě atenuované vakcinační varianty D2 PDK-53, PDK53-E a PDK53-V. Jako nadějně se ukázaly oba soubory využívající atenuované vakcinační varianty D2 PDK-53. Obě tetravalentní virové formulace indukují tvorbu neutralizačních protilátek v myších proti všem sérotypům.⁸³

5.2.2. Klinické studie DENVax

I. fáze klinického testování probíhala u 140 zdravých dobrovolníků ve věku 18-45 let v USA, kteří byli séronegovní pro flaviviry. Cílem bylo sledovat, mimo bezpečnost a imunogenicitu, nežádoucí vedlejší účinky a sérokonverzi pro všechny čtyři sérotypy DENV. Míra sérokonverze se lišila v závislosti na sérotypu. Celkově vytvořilo detekovatelné protilátky alespoň proti třem sérotypům více jak 80 % účastníků.⁸⁴

Do II. fáze klinických testů byly zahrnuty i děti od 1,5 let. Studie probíhala v zemích s endemickým výskytem DENV (Kolumbia, Portoriko, Singapur, Thajsko) a účastnilo se jí 360 zdravých jedinců. Vakcína byla aplikována ve dvou dávkách v rozmezí 90 dnů. Hodnotila se především protilátková odpověď na všechny sérotypy. Jelikož studie probíhala do ledna 2019, výsledky zatím nejsou shrnuty.⁸⁵ Některé klinické studie fáze III byly dokončeny ke konci roku 2018 nebo v lednu 2019, nicméně souhrnné výsledky nejsou k dispozici. Výzkumníci ověřují stálost ochrany proti DENV, dlouhodobé vedlejší účinky či komplikace po aplikaci injekce a další aspekty spojené s bezpečným užíváním TDV.⁸⁶

5.3. Podjednotková vakcína, V180

Další z vakcín, která se nachází v procesu klinického testování je podjednotková vakcína V180. Tvoří ji proteiny 80E všech DENV sérotypů společně s adjuvans ISCOMATRIX®. Protein 80E představuje glykoprotein E DENV zkrácený na C konci, zachováno je 80 % N-terminální části. Zkrácení vede k odstranění membránové kotevní sekvence, čímž se usnadní purifikace a zvýší imunogenicita.⁸⁷ Pro expresi rekombinantního proteinu E bylo využito několik expresních systémů, zahrnujících *Escherichia coli*, bakulovirus, kvasinky, savčí buňky a expresní systémy na rostlinné bázi. Nakonec Clements et al. (2010) za využití expresního systému *Drosophila melanogaster* Schneider 2 limitace překonal a dokázal připravit dostatečné množství proteinu 80E v nativní konformaci.⁸⁸ Součástí vakcíny jsou farmaceuticky akceptované nosiče a variabilní adjuvans, zahrnující například již zmíněný ISCOMATRIX™. Výběr vhodných adjuvans je zásadní pro indukci neutralizačních protilátek cílených proti E antigenu.⁸⁹

5.3.1. Vývoj vakcíny V180

Vývoj vakcíny začal na konci 20. století, kdy skupina vědců sledovala vlastnosti variant proteinu E DENV4, které byly různě zkráceny na C-konci, za využití rekombinantního virového vektoru vaccinie, se kterým infikovali savčí buňky CV1. Men et al. (1991) zjistili, že za správnou antigenní strukturu je zodpovědných 79 % N-koncové části proteinu E. Pro

extracelulární sekreci nesmí N-koncová část přesáhnout 81% původní sekvence. Protein E je během přípravy vakcíny exprimován kotranslačně s proteinem prM, ale tento polyprotein se během sekretorické dráhy štěpí. Protein 80E se uvolňuje do kultivačního média, kde se přečistí. Zdroj virové RNA u DENV1 byl kmen 258848. Během exprese v buňkách *Drosophila melanogaster* S2 je produkt účinně procesován za vzniku sekretovaného proteinu DEN1-80E s nativním N a terminovaným C koncem. DENV2 sekvence jsou odvozeny od kmene PR159/S1. Pro vytvoření vektoru pro produkci proteinu prM80E klonu DENV2 se ve vektoru odstraní sekvence kódující C konec a nahradí se odpovídajícím fragmentem z plasmidu, který kóduje zkrácenou verzi proteinu E pro sérotyp DENV1. Příprava vektorů pro produkci proteinů DEN3-80E a DEN4-80E probíhala obdobně jako u DEN1-80E.⁸⁸

5.3.2. Preklinické a klinické studie V180

Pro testování potencionálních protekčních účinků proteinu 80E se využily myši a opičí modely. U obou modelů bylo dosaženo ochrany jedince proti virové infekci už při nízkých dávkách antigenu.⁸⁸ I. fáze klinických studií v Austrálii testovala bezpečnost vakcíny a schopnost vyvolat imunitní odpověď. Účastnilo se jí 98 dengue naivních dobrovolníků ve věku 18 až 49 let. Jedincům byly aplikovány tři dávky vakcíny V180 v kombinaci s různými adjuvans, včetně adjuvans ISCOMATRIX. Byla zaznamenána indukce jak specifických protilátek tak virus neutralizačních protilátek.⁹⁰

5.4. Tetravalentní DNA vakcína (TVDV)

Jednou z dalších kandidátních vakcín proti DENV figurující v I. fázi klinických studií je DNA vakcína TVDV. Již od počátku 90. let minulého století se vědci zabývají ochranou proti infekci DENV založenou na DNA imunizaci. TVDV obsahuje stejná množství monovalentní plasmidové DNA vakcíny (pVAX1, vektor pro vývoj DNA vakcín schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv), která kóduje geny prM a E DENV1-4. DENV1 DNA vakcína obsahuje geny prM a E z kmene West Pac 74 DENV1. DENV2, DENV3 a DENV4 DNA vakcíny exprimují geny pro proteiny prM a E pasážovaných filipínských kmenů. U proteinu E je C koncová transmembránová a cytoplasmatická doména nahrazena lysozom-asociovaným membránovým proteinem 1 (LAMP1). Substituce LAMP1 zajišťuje transport do lysozomů a posiluje imunitní odpověď. Dostatečná exprese proteinů DENV je zajištěna silným promotorem CMV. V nepřítomnosti adjuvans byly detekovatelné protilátky o podprůměrném titru, a to pouze při vysokých dávkách DNA vakcíny. Adjuvans založená na lipidické bázi (Vaxfectin®) posilují imunogenicitu tetravalentní DNA vakcíny.⁹¹

5.4.1. Vývoj vakcíny TVDV

DNA vakcína DENV1 představuje prototyp. Raviprakash et al. (2000) zkonstruoval několik typů rekombinantních plasmidů s různým procentuálním zastoupením genu E a za přítomnosti či absence genu prM, u kterých se následně porovnávaly vlastnosti a specifika. Na základě preklinických testování byl vybrán konstrukt exprimující proteiny prM a E.⁹²

5.4.2. Preklinické a klinické studie TVDV

Během preklinických studií se hodnotila imunogenicita a bezpečnost pVAX1-D1ME (dengue-1 premembrane/Envelope DNA vakcína) u BALB/c myši. Vakcína se aplikovala intramuskulární injekcí či elektroporací. Právě vpravení elektroporací indukovalo humorální a buněčnou imunitní odpověď a zajistilo ochranu myši před následnou letální dávkou DENV1. Imunizace bivalentní vakcínou (pVAX1-D1ME a pVAX1-D2ME) elektroporací generovala balancovanou odpověď protilátek IgG a neutralizujících protilátek, což poskytlo ochranu myším proti oběma sérotypům. Tato studie podpořila další vývoj a testování tetravalentní vakcíny proti DENV.⁹³

V I. fázi klinických studií se testovala pVAX-D1ME. Záměrem Beckett et al. (2011) bylo ověřit bezpečnost a její schopnost stimulovat imunitní odpověď. Počet registrovaných dobrovolníků byl stanoven na 22. Vyšší či nižší dávky byly injikovány intramuskulárně v časovém schématu 0-1-5 měsíců. U 41,6 % subjektů ve skupině s vyšší dávkou se vyvinuly detekovatelné neutralizační protilátky proti DENV. T buněčná odpověď, testována metodou enzyme-linked immuno spot assay (ELISPOT), byla prokázána u 50,0 % osob ve skupině s nižší dávkou a u 83,3 % ve skupině s vyšší dávkou. Studie prokázala slibnou reaktogenicitu a bezpečnostní profil DENV1 DNA vakcíny.⁹⁴ Další I. fáze klinických testů odehrávající se v USA se zaměřovala na již tetravalentní formulaci DNA vakcíny s Vaxfectin[®] adjuvans, kdy se ověřovala bezpečnost, tolerance a schopnost vyvolání imunitní odpovědi. Zahrnovala 40 dobrovolníků. T buněčná odpověď byla zaznamenána téměř u všech subjektů. Nicméně neutralizačních protilátek bylo malé množství. Využitím alternativních aplikačních metod by se mohlo docílit větší a déle trvající humorální buněčné odpovědi.⁹⁵

5.5. Tetravalentní purifikovaná inaktivovaná vakcína (TDENV PIV)

V I. fázi klinických studií se nachází purifikovaná vakcína proti DENV, produkovaná v buňkách Vero a inaktivovaná formalínem. Na této vakcíně pracují výzkumníci amerického armádního ústavu (Walter Reed Army Institute of Research, USA) již od konce minulého století. Prototyp této vakcíny představuje DENV2. V tetravalentní formulaci jsou zastoupeny

všechny sérotypy (DENV1 West Pac 74, DENV 2 S16803, DENV 3 CH53489, DENV 4 41750). Obdobná vakcína inaktivovaná formalínem byla v 60. letech 20. století vyvinuta proti flaviviru JEV. Její vysoká protektivní účinnost a bezpečnost představovala odrazový můstek pro vývoj vakcíny proti flaviviru TBEV a následně podpořila myšlenku vývoje inaktivované vakcíny i proti DENV.⁹⁶

5.5.1. Vývoj TDENV PIV

Putnak et al. (1996) použili klinický izolát DENV2 S16803, který nejprve nechal adaptovat na buňky Vero. Z buněčné kultury byl vakcinační virus izolován, koncentrován ultrafiltrací, purifikován na sacharózovém gradientu a inaktivován 0,05 % formalínem při 22°C. Po inaktivaci si virus zachoval schopnost indukovat tvorbu neutralizačních protilátek, což bylo ověřeno na dospělých myších. Na mladých myších se testovala účinnost vakcíny po následné dávce wt DENV2. Imunogenicitu se ověřovala u nehumánních primátů, ti vykazovali po druhé dávce 100% sérokonverzi.⁹⁶ Pro nalezení optimální formulace se přidávala adjuvans ve formě hydroxidu hlinitého či různé systémy adjuvans (AS01_E nebo AS03_B), které posilují imunogenicitu a celkovou odpověď imunitního systému na virový antigen.⁹⁷

5.5.2. Klinické studie TDENV PIV

I. fáze klinických studií hodnotící především bezpečnost, reaktogenicitu a imunogenicitu tetravalentní purifikované inaktivované vakcíny probíhala u zdravých dobrovolníků ve věku 18-39 let v USA. Vakcína s adjuvans indukovala vysokou a vyváženou odpověď proti všem sérotypům DENV 1 měsíc po aplikaci 2. dávky.⁹⁸

5.6. Tetravalentní živá atenuovaná vakcína – tetravalentní purifikovaná inaktivovaná vakcína, TLAV-TPIV

Nová vakcinační strategie se snaží propojit výhody jak replikativní, tak i nereplikativní vakcíny. Barnett et al. (1997) například kombinoval DNA vakcínu následovanou dávkou podjednotkové vakcíny při experimentálním testování imunizace proti HIV v 90. letech minulého století.⁹⁹ Vakcinační schéma proti DENV kombinuje imunizaci tetravalentním purifikovaným inaktivovaným virem s následovaným přeočkováním tetravalentní atenuovanou vakcínou. U CYD-TDV je pro dosažení požadované úrovně imunitní odpovědi potřeba opakované imunizace po nejméně 6 měsících. Ačkoliv druhá dávka obvykle vede k tetravalentní sérokonverzi a tvorbě uspokojivého množství protilátek, vakcinační schéma je příliš dlouhé. Nereplikativní vakcíny disponují minimem vedlejších účinků a velmi limitovanou interferencí či dominancí určitého sérotypu, nicméně nedosahují efektivity živé atenuované

vakcíny. Tetravalentní živá atenuovaná vakcína (TLAV) Formulace 17 byla připravena pasážováním v primárních ledvinných psích buňkách a následně ve fetálních plicních buňkách makaka.¹⁰⁰ TPIV byla inaktivována formalínem a aplikována s adjuvans hliníku.⁹⁶ Během preklinického testování se ukázalo, že zvířata očkováná nereplikující se vakcínou TPIV si vytvořila nízkou hladinu protilátek. Po přeočkování tetravalentní živou atenuovanou vakcínou bylo dosaženo kvalitní imunitní odpovědi. Klinické studie fáze I v USA se zúčastnilo 80 dobrovolníků ve věku 18 až 49 let. Zaměřila se na prokázání bezpečnosti, imunogenicity a synergistický efekt vakcín na imunitní odpověď.¹⁰¹

6. Vakcíny v preklinických studiích

V experimentální fázi se nachází početné zastoupení vakcín proti DENV. O tetravalentní vakcíně složené z viru podobných partikulí (VLPs – Virus-Like Particles) se hovoří jako o vakcíně nové generace, která představuje možnou alternativu živých atenuovaných vakcín proti DENV, a dala by se aplikovat i na jiné flaviviry. VLPs jsou samostatně se skládající partikule, obsahující virové strukturální proteiny, čímž věrohodně mimikují morfologii autentického viru. To zajišťuje vysokou imunogenicitu a zároveň bezpečnost, protože neobsahují virovou RNA, která by se mohla nekontrolovaně replikovat. Urakami et al. (2017) připravili DENV1-4 VLPs tak, že koexprimovali proteiny prM a E. Pro všechny sérotypy použil protein E s mutací F108A (fenylalaninu 108 na alanin) ve fúzující smyčce, čímž se zvýšila produkce VLPs v savčích buňkách. Právě nízká produkce VLPs zmařila prvotní kroky mnoha vědeckých skupin, zaměřujících se na tuto technologii.

Při vývoji VLP vakcíny byl nejprve vytvořen plasmid exprimující oblast prME DENV1 fúzovanou s hydrofobní signální sekvencí. Po transfekci plasmidu do savčích buněk 293F bylo do supernatantu kultury sekretováno pouze omezené množství VLPs. Ve fúzní smyčce proteinu E bylo vybráno 27 AK, které mohly potencionálně ovlivňovat konformaci tohoto proteinu. Systematickou mutagenezí jednotlivých AK a testováním mutant zjistili, že mutace F108A signifikantně zvyšuje produkci VLPs. Protože jsou sekvence flavivirů poměrně konzervativní, k produkci VLPs DENV2 byl sestrojen protein E se stejnou mutací F108A. Avšak u DENV2 tato změna nevedla k detekovatelné sekreci VLPs. Další oblastí proteinu E, která může ovlivnit sekreci, je C koncová oblast, zodpovědná za interakci s membránami. Proto se přistoupilo k záměně C terminální oblasti proteinu E DENV2 za odpovídající oblast DENV1. Bylo připraveno několik verzí tvořených různě dlouhými C koncovými oblastmi a testována produkce VLP v buňkách 293F. Nejlepší produkce VLPs DENV2 bylo dosaženo při záměně C koncové oblasti spolu se zavedením mutace F108A. Tato strategie pak byla použita i pro

produkcí VLPs DENV3 a DENV4. ZIKV je strukturně velmi podobný DENV. Stejná mutace F108A v proteinu E umožnila produkci VLPs. Při testování imunogenicity u BALB/c myši byla nejprve aplikována monovalentní formulace VLPs, v následných testech formulace tetraivalentní. Tetraivalentní formulace vyvolala vysokou protilátkovou odpověď.¹⁰²

7. Závěr

Ve vývoji vakcíny poskytující ochranu proti DENV se udělal nezanedbatelný krok kupředu. Nicméně zde zůstává mnoho otazníků spojených s virem i konstrukcí vakcín. V práci jsem se zaměřila nejen na vývoj vakcín, ale také na problémy, které ho doprovází. Pro konstrukci účinné vakcíny je potřeba detailního porozumění průběhu přirozené infekce a participace jednotlivých složek imunitního systému. Dalším aspektem, který komplikuje výzkum, je absence vhodného modelového organismu. V této bakalářské práci je prezentována doposud jediná licencovaná vakcína, která je registrovaná v několika zemích s endemickým výskytem DENV. Při vývoji CYD-TDV vědci vycházeli z úspěšné a dlouho využívané vakcíny proti YFV, kterou použili jako kostru nesoucí geny prM a E DENV. V určitých aspektech si je CYD-TDV a YF-VAX podobná, v mnohých se ale zásadně rozchází. CYD-TDV má na rozdíl od YF-VAX velmi omezenou škálu recipientů a zásadně se liší v účinnosti. Dále YF-VAX indukuje sérokonverzi již po aplikaci jedné dávky, zatímco u CYD-TDV jsou vyžadovány tři. Prvotní velmi slibné výsledky CYD-TDV byly po II. a III. fázi klinických studií nahrazeny kritérii (DENV sérostatus a věk recipienta), vydanými farmaceutickou společností Sanofi Pasteur, které vymezují pouze určitou skupinu recipientů. V té době již probíhalo na Filipínách první plošné očkování proti DENV, naočkováno bylo více než 800 000 dětí. Po vydání prohlášení filipínská vláda program zastavila. Velký rozruch způsobila úmrtí některých recipientů, která mohla být důsledkem aplikace vakcíny a následné sekundární infekce u DENV séronegativních jedinců.¹⁰³

CYD-TDV také není vhodná pro podchycení epidemie v určité oblasti, pokud v ní nejsou splněna daná kritéria. Nicméně i přes částečný neúspěch CYD-TDV probíhají další studie zaměřující se na specifika CYD-TDV a její aplikaci atypickým recipientům.

Ve III. fázi klinických studií se nachází stejné typy vakcín jako je CYD-TDV. Živé atenuované vakcíny se relativně pomalu a kontrolovaně replikují v recipientovi, čímž zajišťují prezentování všech virových antigenů a vyvolávají protilátkovou i T buňkami řízenou imunitní odpověď. V rámci tetraivalentní formulace oslabeného viru ale může dojít k dominanci určité složky a interferenci ve znatelně vyšší míře, než je tomu u nereplikujících se vakcín. Dále je zde, i když relativně velice nízké, riziko návratu plné virulence a přenosu viru z recipientů vakcíny na vektor. TetraVax-DV a DENVax obsahují i nestrukturální proteiny DENV, což by

mohlo zajistit vyšší účinnost vakcín u recipientů. Obě vakcíny prokázaly imunogenicitu a bezpečnost v klinických studiích.

Mnoho typů vakcín se posunulo do I. fáze klinických studií. Jsou zde zastoupeny nereplikující se vakcíny. Ty mohou navodit imunitní odpověď rychleji než replikující se vakcíny a vykazují menší pravděpodobnost interference než živé oslabené vakcíny. Nicméně většina z nich nemusí být dostatečně efektivní v indukování imunitní odpovědi. Postupy vývoje vakcín proti DENV vycházejí z úspěšných konstrukcí vakcín proti jiným flavivirům, jako je například vakcinace purifikovaným inaktivovaným virem, nebo byly zvoleny nové metody, mezi které patří DNA vakcína, podjednotková vakcína a kombinace inaktivované a živé vakcíny.

Výhodou podjednotkové vakcíny je bezpečnost. Nedochází zde k replikaci virionu ani k interferenci mezi jednotlivými sérotypy. Eliminací virových antigenů pouze na protein E dochází k snížení nežádoucích účinků. Zrychlený plán očkování limituje pravděpodobnost rozvoje komplikací spojených s částečně navozenou imunitou. Přínosem DNA vakcín je, že po DNA imunizaci dochází k expresi virového proteinu *in situ*, což vede k přesnému sbalení a posttranslačním modifikacím, ke kterým dochází při přirozené infekci DENV.

Nezanedbatelný počet vakcín se nachází i v experimentální fázi. Velká pozornost se upíná k zmíněné VLP vakcíně, která by mohla zajistit ochranu nejen proti DENV, ale například i proti ZIKV či jiným virům z této rodiny. Schopnost jednotlivých vakcín omezit šíření DENV, jejich bezpečnost a celkový dopad se ukáže až časem. Přesto je posun k cíli nesporný a již teď CYD-TDV poskytuje ochranu proti DENV alespoň určité skupině obyvatel žijící v nejméně zasažených oblastech světa.

8. Seznam použité literatury

1. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504–507 (2013).
2. Flasche, S. *et al.* The Long-Term Safety, Public Health Impact, and Cost-Effectiveness of Routine Vaccination with a Recombinant, Live-Attenuated Dengue Vaccine (Dengvaxia): A Model Comparison Study. *PLoS Med* **13**, (2016).
3. Aguiar, M., Stollenwerk, N. & Halstead, S. B. The Impact of the Newly Licensed Dengue Vaccine in Endemic Countries. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, (2016).
4. *Liu, L. Fields Virology, 6th Edition. *Clin Infect Dis* **59**, 613–613 (2014).
5. Balmaseda, A. *et al.* Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 449–456 (2006).
6. Nisalak, A. *et al.* Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**, 191–202 (2003).
7. Zhang, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* **10**, 907–912 (2003).
8. *Wahala, W. M. P. B. & de Silva, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* **3**, 2374–2395 (2011).
9. Grange, T., Bouloy, M. & Girard, M. Stable secondary structures at the 3'-end of the genome of yellow fever virus (17 D vaccine strain). *FEBS Letters* **188**, 159–163 (1985).
10. Brinton, M. A., Fernandez, A. V. & Dispoto, J. H. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **153**, 113–121 (1986).
11. Gomila, R. C., Martin, G. W. & Gehrke, L. NF90 Binds the Dengue Virus RNA 3' Terminus and Is a Positive Regulator of Dengue Virus Replication. *PLoS One* **6**, (2011).
12. *Liang, H., Lee, M. & Jin, X. Guiding dengue vaccine development using knowledge gained from the success of the yellow fever vaccine. *Cell Mol Immunol* **13**, 36–46 (2016).
13. Perry, J. W., Chen, Y., Speliotes, E. & Tai, A. W. Functional Analysis of the Dengue Virus Genome Using an Insertional Mutagenesis Screen. *Journal of Virology* **92**, e02085-17 (2018).
14. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**, 313–319 (2004).
15. Beatty, P. R. *et al.* Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* **7**, 304ra141 (2015).
16. Gebhard, L. G., Kaufman, S. B. & Gamarnik, A. V. Novel ATP-Independent RNA Annealing Activity of the Dengue Virus NS3 Helicase. *PLoS One* **7**, (2012).
17. Lee, C. M. *et al.* Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization. *Journal of Virology* **89**, 6171–6183 (2015).
18. Egloff, M.-P. *et al.* Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J. Mol. Biol.* **372**, 723–736 (2007).
19. Klema, V. J. *et al.* Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLoS Pathog* **12**, (2016).

20. Wu, S. J. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat. Med.* **6**, 816–820 (2000).
21. *Green, A. M., Beatty, P. R., Hadjilaou, A. & Harris, E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol* **426**, 1148–1160 (2014).
22. Welsch, S. *et al.* Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe* **5**, 365–375 (2009).
23. Bressanelli, S. *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* **23**, 728–738 (2004).
24. Vasilakis, N., Tesh, R. B. & Weaver, S. C. Sylvatic Dengue Virus Type 2 Activity in Humans, Nigeria, 1966. *Emerg Infect Dis* **14**, 502–504 (2008).
25. *Carrington, L. B. & Simmons, C. P. Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. *Front Immunol* **5**, (2014).
26. Nguyen, N. M. *et al.* Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9072–9077 (2013).
27. Cerny, D. *et al.* Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* **10**, (2014).
28. Mongkolsapaya, J. *et al.* T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J. Immunol.* **176**, 3821–3829 (2006).
29. Brown, M. G. *et al.* RNA Sensors Enable Human Mast Cell Anti-Viral Chemokine Production and IFN-Mediated Protection in Response to Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection. *PLoS One* **7**, (2012).
30. Dejnirattisai, W. *et al.* A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol* **16**, 170–177 (2015).
31. Priyamvada, L. *et al.* B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. *J Virol* **90**, 5574–5585 (2016).
32. Bashyam, H. S., Green, S. & Rothman, A. L. Dengue Virus-Reactive CD8⁺ T Cells Display Quantitative and Qualitative Differences in Their Response to Variant Epitopes of Heterologous Viral Serotypes. *The Journal of Immunology* **176**, 2817–2824 (2006).
33. Yauch, L. E. *et al.* A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8⁺ T Cells. *J Immunol* **182**, 4865–4873 (2009).
34. Rivino, L. *et al.* Differential Targeting of Viral Components by CD4⁺ versus CD8⁺ T Lymphocytes in Dengue Virus Infection. *J Virol* **87**, 2693–2706 (2013).
35. Halstead, S. & O'Rourke, E. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* **146**, 201–217 (1977).
36. Simmons, C. P. *et al.* Maternal Antibody and Viral Factors in the Pathogenesis of Dengue Virus in Infants. *J Infect Dis* **196**, 416–424 (2007).
37. Sabin, A. B. & Schlesinger, R. W. PRODUCTION OF IMMUNITY TO DENGUE WITH VIRUS MODIFIED BY PROPAGATION IN MICE. *Science* **101**, 640–642 (1945).
38. Zellweger, R. M. *et al.* Role of Humoral versus Cellular Responses Induced by a Protective Dengue Vaccine Candidate. *PLoS Pathog* **9**, (2013).

39. Züst, R. *et al.* Type I Interferon Signals in Macrophages and Dendritic Cells Control Dengue Virus Infection: Implications for a New Mouse Model To Test Dengue Vaccines. *J Virol* **88**, 7276–7285 (2014).
40. Barban, V. *et al.* Improvement of the Dengue Virus (DENV) Nonhuman Primate Model via a Reverse Translational Approach Based on Dengue Vaccine Clinical Efficacy Data against DENV-2 and -4. *Journal of Virology* **92**, e00440-18 (2018).
41. Hadinegoro, S. R. *et al.* Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1195–1206 (2015).
42. Torresi, J., Ebert, G. & Pellegrini, M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Hum Vaccin Immunother* **13**, 1059–1072 (2017).
43. Theiler, M. & Smith, H. H. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *J Exp Med* **65**, 787–800 (1937).
44. Theiler, M. SUSCEPTIBILITY OF WHITE MICE TO THE VIRUS OF YELLOW FEVER. *Science* **71**, 367 (1930).
45. Beck, A. S., Wood, T. G., Widen, S. G., Thompson, J. K. & Barrett, A. D. T. Analysis By Deep Sequencing of Discontinued Neurotropic Yellow Fever Vaccine Strains. *Sci Rep* **8**, (2018).
46. Beck, A. *et al.* Comparison of the Live Attenuated Yellow Fever Vaccine 17D-204 Strain to Its Virulent Parental Strain Asibi by Deep Sequencing. *J Infect Dis* **209**, 334–344 (2014).
47. Guirakhoo, F. *et al.* Recombinant Chimeric Yellow Fever-Dengue Type 2 Virus Is Immunogenic and Protective in Nonhuman Primates. *J Virol* **74**, 5477–5485 (2000).
48. Guirakhoo, F. *et al.* Construction, Safety, and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine. *J Virol* **75**, 7290–7304 (2001).
49. Dayan, G. H., Thakur, M., Boaz, M. & Johnson, C. Safety and immunogenicity of three tetravalent dengue vaccine formulations in healthy adults in the USA. *Vaccine* **31**, 5047–5054 (2013).
50. Pugachev, K. V. *et al.* High Fidelity of Yellow Fever Virus RNA Polymerase. *J Virol* **78**, 1032–1038 (2004).
51. Brandler, S. *et al.* REPLICATION OF CHIMERIC YELLOW FEVER VIRUS-DENGUE SEROTYPE 1–4 VIRUS VACCINE STRAINS IN DENDRITIC AND HEPATIC CELLS. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 74–81 (2005).
52. Higgs, S. *et al.* Growth characteristics of ChimeriVax-Den vaccine viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 986–993 (2006).
53. Taucher, C., Berger, A. & Mandl, C. W. A trans-Complementing Recombination Trap Demonstrates a Low Propensity of Flaviviruses for Intermolecular Recombination. *J Virol* **84**, 599–611 (2010).
54. Guirakhoo, F. *et al.* Safety and Efficacy of Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine Formulations in Nonhuman Primates. *Journal of Virology* **78**, 4761–4775 (2004).
55. Guy, B. *et al.* Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**, 302–311 (2009).
56. Guirakhoo, F. *et al.* Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin* **2**, 60–67 (2006).

57. Morrison, D. *et al.* A novel tetravalent dengue vaccine is well tolerated and immunogenic against all 4 serotypes in flavivirus-naïve adults. *J. Infect. Dis.* **201**, 370–377 (2010).
58. Kirstein, J. *et al.* Immunogenicity of the CYD tetravalent dengue vaccine using an accelerated schedule: randomised phase II study in US adults. *BMC Infect Dis* **18**, (2018).
59. Sabchareon, A. *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* **380**, 1559–1567 (2012).
60. Villar, L. *et al.* Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N. Engl. J. Med.* **372**, 113–123 (2015).
61. Capeding, M. R. *et al.* Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* **384**, 1358–1365 (2014).
62. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue Vaccine in HIV-Positive Adults Aged 18 to 50 Years in Brazil - ICH GCP - Clinical Trials Registry. (Accessed: 11th March 2019)
63. Sridhar, S. *et al.* Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine* **379**, 327–340 (2018).
64. Plennevaux, E. *et al.* Impact of Dengue Vaccination on Serological Diagnosis: Insights From Phase III Dengue Vaccine Efficacy Trials. *Clin Infect Dis* **66**, 1164–1172 (2018).
65. *Whitehead, S. S. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine? *Expert Rev Vaccines* **15**, 509–517 (2016).
66. Men, R., Bray, M., Clark, D., Chanock, R. M. & Lai, C. J. Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol* **70**, 3930–3937 (1996).
67. Blaney, J. E. *et al.* Chemical Mutagenesis of Dengue Virus Type 4 Yields Mutant Viruses Which Are Temperature Sensitive in Vero Cells or Human Liver Cells and Attenuated in Mice. *J Virol* **75**, 9731–9740 (2001).
68. Whitehead, S. S. *et al.* A Live, Attenuated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate with a 30-Nucleotide Deletion in the 3' Untranslated Region Is Highly Attenuated and Immunogenic in Monkeys. *J Virol* **77**, 1653–1657 (2003).
69. Blaney, J. E., Hanson, C. T., Hanley, K. A., Murphy, B. R. & Whitehead, S. S. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. *BMC Infect Dis* **4**, 39 (2004).
70. Reynolds, M. J. *et al.* Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 405–413 (2001).
71. Whitehead, S. S. *et al.* Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. *Vaccine* **21**, 4307–4316 (2003).
72. Blaney, J. E. *et al.* Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**, 811–821 (2004).

73. Blaney, J. E. *et al.* Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4. *Vaccine* **26**, 817–828 (2008).
74. Troyer, J. M. *et al.* A live attenuated recombinant dengue-4 virus vaccine candidate with restricted capacity for dissemination in mosquitoes and lack of transmission from vaccinees to mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 414–419 (2001).
75. Durbin, A. P. *et al.* A Single Dose of Any of Four Different Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccines Is Safe and Immunogenic in Flavivirus-naïve Adults: A Randomized, Double-blind Clinical Trial. *J Infect Dis* **207**, 957–965 (2013).
76. Kirkpatrick, B. D. *et al.* Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naïve Adults. *J. Infect. Dis.* **212**, 702–710 (2015).
77. Safety and Immunogenicity of the Dengue Virus Vaccine TV005 (TetraVax-DV TV005) in Healthy Adults, Adolescents, and Children in Dhaka, Bangladesh, ClinicalTrials.gov. (Accessed: 1st March 2019)
78. Phase III Trial to Evaluate Efficacy and Safety of a Tetravalent Dengue Vaccine, ClinicalTrials.gov. (Accessed: 11th March 2019)
79. Huang, C. Y.-H. *et al.* Genetic and Phenotypic Characterization of Manufacturing Seeds for a Tetravalent Dengue Vaccine (DENVax). *PLoS Negl Trop Dis* **7**, (2013).
80. Butrapet, S. *et al.* Attenuation Markers of a Candidate Dengue Type 2 Vaccine Virus, Strain 16681 (PDK-53), Are Defined by Mutations in the 5' Noncoding Region and Nonstructural Proteins 1 and 3. *J Virol* **74**, 3011–3019 (2000).
81. Kinney, R. M. *et al.* Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology* **230**, 300–308 (1997).
82. Halstead, S. B. & Simasthien, P. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med* **42**, 276–292 (1970).
83. Huang, C. Y.-H. *et al.* Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J. Virol.* **77**, 11436–11447 (2003).
84. Rupp, R. *et al.* Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: A Phase 1b randomized study. *Vaccine* **33**, 6351–6359 (2015).
85. Study to Investigate the Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Chimeric Dengue Vaccine in Healthy Volunteers Between the Ages of 1.5 - 45 Years, ClinicalTrials.gov. (Accessed: 1st March 2019)
86. Lot-to-lot Consistency of 3 Lots of Tetravalent Dengue Vaccine (TDV) in Non-endemic Country(ies) for Dengue (Accessed: 1st March 2019)
87. Ivy, J., Nakano, E. & Clements, D. Methods of preparing carboxy-terminally truncated recombinant flavivirus envelope glycoproteins employing drosophila melanogaster expression systems. (2000).
88. Clements, D. E. *et al.* Development of a Recombinant Tetravalent Dengue Virus Vaccine: Immunogenicity and Efficacy Studies in Mice and Monkeys. *Vaccine* **28**, 2705–2715 (2010).

89. Manoff, S. B. *et al.* Immunogenicity and safety of an investigational tetravalent recombinant subunit vaccine for dengue: results of a Phase I randomized clinical trial in flavivirus-Naïve adults. *Hum Vaccin Immunother* (2018)
90. Study of a Dengue Vaccine (V180) in Healthy Adults (V180-001) ClinicalTrials.gov. (Accessed: 23rd February 2019)
91. Porter, K. R. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a vaxfectin-adjuvanted tetravalent dengue DNA vaccine. *Vaccine* **30**, 336–341 (2012).
92. Raviprakash, K. *et al.* Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein. *Vaccine* **18**, 2426–2434 (2000).
93. Zheng, X. *et al.* Effective Protection Induced by a Monovalent DNA Vaccine against Dengue Virus (DV) Serotype 1 and a Bivalent DNA Vaccine against DV1 and DV2 in Mice. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, (2017).
94. Beckett, C. G. *et al.* Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine* **29**, 960–968 (2011).
95. Danko, J. R. *et al.* Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial. *Am J Trop Med Hyg* **98**, 849–856 (2018).
96. Putnak, R. *et al.* Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J. Infect. Dis.* **174**, 1176–1184 (1996).
97. Fernandez, S. *et al.* An Adjuvanted, Tetravalent Dengue Virus Purified Inactivated Vaccine Candidate Induces Long-Lasting and Protective Antibody Responses Against Dengue Challenge in Rhesus Macaques. *Am J Trop Med Hyg* **92**, 698–708 (2015).
98. Schmidt, A. C. *et al.* Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States. *Am J Trop Med Hyg* **96**, 1325–1337 (2017).
99. Barnett, S. W. *et al.* Vaccination with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit. *Vaccine* **15**, 869–873 (1997).
100. Eckels, K. H. *et al.* MODIFICATION OF DENGUE VIRUS STRAINS BY PASSAGE IN PRIMARY DOG KIDNEY CELLS: PREPARATION OF CANDIDATE VACCINES AND IMMUNIZATION OF MONKEYS. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **69**, 12–16 (2003).
101. TDENV PIV and LAV Dengue Prime-boost Strategy, ClinicalTrials.gov. (Accessed: 9th March 2019)
102. Urakami, A. *et al.* An Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design. *J Virol* **91**, (2017).
103. *WHO | Safety of dengue vaccine in the Philippines. (Accessed: 8th May 2019)