



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102449172 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 09

(21) 申请号 201080024148. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 05. 28

C12Q 1/70 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/183, 020 2009. 06. 01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/036726 2010. 05. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02010/141386 EN 2010. 12. 09

(71) 申请人 伊维拉根公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 D·T·斯汀奇科姆 J·E·奥索瑞罗

C·D·帕提度斯 J·N·布瑞沃

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民 陆惠中

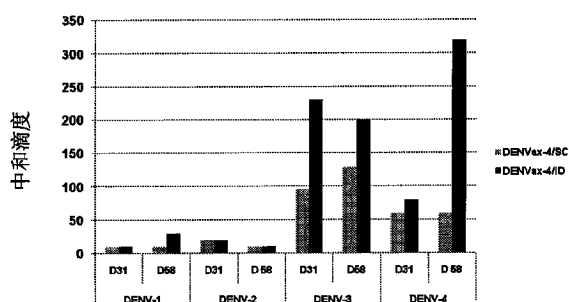
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称

施用针对登革病毒的疫苗的组合物和方法

(57) 摘要

本发明的实施方式报道了用于给对象接种针对登革病毒的疫苗的组合物和方法。在一些实施方式中,疫苗组合物可通过皮内引入施用。在某些实施方式中,在对象中皮内引入针对登革病毒的疫苗可包括初始接种后一次或多次皮内加强。其它实施方式包括皮内注射针对登革病毒的疫苗组合物,其中所述组合物提供针对 DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4 的两种或更多种的保护。



1. 在对象中诱导针对多种登革病毒血清型的保护的方法,其包括通过皮内引入向对象施用针对登革病毒的单剂量疫苗,在所述对象中诱导针对多种登革病毒血清型的保护。

2. 权利要求 1 的方法,其进一步包括施用至少一次另外皮内注射(一次或多次)所述针对登革病毒的疫苗。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述针对登革病毒的单剂量疫苗包括一种或多种登革病毒血清型。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种另外皮内注射(一次或多次)在所述对象上分开的部位处进行。

5. 权利要求 1 的方法,其中至少一种另外皮内注射(一次或多次)在第一次施用给所述对象后少于 30 天进行。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述疫苗包括预定比例的至少两种登革病毒血清型。

7. 权利要求 1 的方法,其中所述疫苗包括所有四种登革病毒血清型。

8. 权利要求 1 的方法,其进一步包括给所述对象施用至少一种免疫原性剂。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述免疫原性剂包括至少一种 Toll 受体 (TLR) 配体(一种或多种)。

10. 保护对象免于登革病毒血清型的组合物,其包括皮内(ID)施用预定比例的至少两种登革病毒血清型的单剂量组合物。

11. 权利要求 10 的组合物,其中,相比皮下施用 10^2 至 10^5 pfu 范围的一种或多种活的减毒登革疫苗的组合物,所述组合物浓度减少 10% 或更多。

12. 权利要求 10 的组合物,其中所述组合物包括所有四种登革病毒血清型。

13. 权利要求 12 的组合物,其中所述四种血清型为预定比例。

14. 权利要求 10 的组合物,其进一步包括至少一种免疫原性剂。

15. 权利要求 10 的组合物,其进一步包括至少一种 Toll 受体 (TLR) 配体(一种或多种)或其它佐剂。

16. 权利要求 15 的组合物,其中所述至少一种 Toll 受体配体(一种或多种)包括 CpG-ODN、Poly I:C、咪喹莫特(imiquimod)、菊粉衍生的佐剂、MPL Toll 受体 4 配体、聚 I:U Toll 受体 3 配体、热不稳定肠毒素、热不稳定肠毒素的非毒性突变体和其组合。

17. 将登革疫苗组合物施用给对象的系统,包括针对登革病毒的疫苗组合物和装置,其能够通过非注射方法将所述疫苗组合物皮内引入对象,将所述登革疫苗组合物施用给所述对象。

18. 权利要求 17 的系统,其中所述非注射方法没有针并且没有注射器。

19. 疫苗试剂盒,其包括:

至少一种针对登革病毒的疫苗组合物,其包括一种或多种登革病毒血清型;以及至少一种装置,其能够将所述组合物皮内施用给对象。

20. 权利要求 19 的试剂盒,其进一步包括至少一种免疫原性剂。

21. 权利要求 19 的试剂盒,其进一步包括至少一种 Toll 受体配体(一种或多种)。

施用针对登革病毒的疫苗的组合物和方法

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求在 2009 年 6 月 01 日提交的临时美国专利申请序列号 61/183,020 在 35USC § 119(e) 下的权益,其以其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本发明的实施方式报道了用于将针对登革病毒的疫苗施用给对象的组合物和方法。在一些实施方式中,疫苗组合物可通过皮内注射施用。在某些实施方式中,在对象中皮内注射针对登革病毒的疫苗可包括在最初接种之后一次或多次皮内加强 (boost)。其他实施方式包括皮内注射针对登革病毒的疫苗组合物,其中所述组合物提供针对一种以上血清型登革病毒诸如 DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4 的保护 (防护, protection)。

[0005] 背景

[0006] 针对病毒感染的防护疫苗已经被有效地用于降低人类疾病的发病率。病毒疫苗最成功的技术之一是用削弱的或减毒的病毒毒株 (“活的减毒病毒”) 免疫动物或人。由于免疫后有限的复制,减毒株没有引起疾病。然而,有限的病毒复制足以表达病毒抗原的全部组成成分,并且能产生对病毒有效且持久的免疫反应。因此,在随后暴露于病毒的致病毒株之后,免疫的个体受到保护免于生病。这些活的减毒病毒疫苗在用于公共健康的最成功的疫苗之列。

[0007] 概述

[0008] 本发明的实施方式一般涉及通过例如给对象施用针对登革病毒的疫苗在对象中引起对登革病毒的防护的方法和组合物。一些实施方式可包括经由皮内 (ID) 注射向对象中引入疫苗组合物。根据这些实施方式,疫苗组合物可被皮内引入到对象中,以例如防护一种或一种以上登革血清型 (例如,交叉保护)。在某些实施方式中,疫苗组合物可包括但不限于施用给对象的单剂量一种血清型登革病毒 (例如, DENVax 4)。在其它实施方式中,疫苗组合物可包括但不限于;初始剂量的一种血清型登革病毒 (例如, DENVax 4 或其它血清型) 以及随后相同的、组合型或不同血清型的一次或多次加强可被施用给对象。

[0009] 本文的其它方面可涉及通过例如经由皮内引入将疫苗组合物引入对象而在对象中诱发细胞免疫反应,其中疫苗组合物包括但不限于登革病毒疫苗。根据这些实施方式,所公开的组合物可被皮内施用给对象,用于调节对象中针对登革病毒血清型的中和抗体产生。一些方面涉及在单一疫苗组合物中各种血清型登革病毒或其片段或其减毒组合物的预定组成比例 (例如, 1 : 1、1 : 2、1 : 4, 考虑两种或更多种血清型的任何比例), 以当对象被皮内施用单一疫苗组合物时在对象中增加针对一些或所有登革病毒血清型的交叉保护。

[0010] 在某些实施方式中,采用皮内引入针对登革病毒的疫苗的一些益处可包括但不限于,在对象中针对一些或所有登革病毒血清型的多重防护,通过采用小剂量与皮下注射相比成本降低,在对象中调节针对一些或所有登革病毒血清型产生的抗体,以及在施用了针对登革病毒的疫苗组合物的对象中的施用部位处的疼痛减少。

[0011] 在一些实施方式中,针对登革病毒的单剂量疫苗可包括一种或多种登革病毒血清型 (一种或多种)。根据这些实施方式,对象可用在与第一次注射分开的部位——例如对象

上邻近的部位或者分离的解剖学部位处施用的至少一次另外的皮内注射（一次或多次）进行治疗。此外，至少一次另外的皮内注射（一次或多次）可在给对象第一次施用后少于 30 天进行。本文公开的这些或其它实施方式的疫苗组合物可包括预定比例的两种或更多种登革病毒血清型。

[0012] 附图简述

[0013] 下列附图构成本说明书的部分并且被包括以进一步说明某些实施方式。一些实施方式可通过仅仅参考这些附图中的一幅或多幅或者与所提供的具体实施方式的详述组合而更好地理解。

[0014] 图 1 显示目前可用的皮内注射装置的实例。

[0015] 图 2 显示在皮内引入针对登革病毒的疫苗的对象中的注射部位的实例。

[0016] 图 3 显示针对登革病毒的疫苗的皮下和皮内注射以及在初次施用后针对不同登革病毒血清型产生的中和抗体滴度的柱状图比较。

[0017] 图 4 显示针对登革病毒的疫苗的皮下和皮内注射以及在第二次加强施用后针对不同登革病毒血清型产生的中和抗体滴度的柱状图比较。

[0018] 图 5 显示小鼠中用针对登革病毒血清型的疫苗的皮下和皮内免疫的直方图。

[0019] 图 6A 和 6B 显示攻击试验的图示，所述攻击试验利用两种不同登革病毒血清型对用另一登革病毒血清型接种小鼠后的登革病毒血清型免疫小鼠群体进行。

[0020] 定义

[0021] 如本文所用，“一 (a)”或“一 (an)”可意味着一个或一个以上的项目。

[0022] 如本文所用，容器 (vessel) 可包括但不限于试管、小型或微型离心管、通道 (channel)、小瓶、微量滴定板或容器 (container)。

[0023] 如本文说明书所用，“对象 (subject)”或“对象 (subjects)”可包括但不限于哺乳动物诸如人或哺乳动物，驯养的或野生的，例如狗、猫、其它家庭宠物（如，仓鼠、豚鼠、小鼠、大鼠）、雪貂、兔、猪、马、牛、土拨鼠或动物园动物。

[0024] 如本文所用，“大约”可意味着加或减百分之十。

[0025] 如本文所用，“减毒病毒”可意味着当施用给对象诸如哺乳动物（例如人或动物）时证实具有减轻的或没有疾病临床指征的病毒。

发明内容

[0026] 在下面的部分中，为了详述各种实施方式描述了各种示例性组合物和方法。对本领域技术人员来说明显的是，实施各种实施方式不需要应用本文所概述的所有具体细节甚或其中的一些，但是浓度、时间和其它具体细节可通过常规试验进行改进。在一些情况下，熟知的方法和成分没有被包括在说明中。

[0027] 本发明的某些方面包括但不限于施用针对登革病毒的疫苗组合物。

[0028] 本发明的实施方式一般涉及用于在对象中诱导针对登革病毒血清型的保护的方法和组合物。其它实施方式可包括经由皮内 (ID) 注射将疫苗组合物引入对象，其中皮内引入的疫苗组合物诱导针对一些或所有登革热血清型的交叉保护。在某些实施方式中，疫苗组合物包括施用给对象的单剂量的针对登革病毒血清型 4 (DENVax 4) 的疫苗。在其它实施方式中，疫苗组合物包括施用给对象的初始剂量的 DENVax 4，然后一次或多次加强的该疫

苗。

[0029] 本发明的其它方面包括与给对象皮下施用相比调节对皮内施用的针对登革病毒的疫苗的免疫反应。针对登革病毒的疫苗可包括这样的组合物,其包括一定比例的登革病毒血清型、活的减毒登革病毒、或其片段诸如从登革病毒血清型衍生或获得的蛋白质或核酸。各种血清型的比例可以是相等的,或者某种血清型可显示比其他的多,这取决于需要或对病毒的暴露或可能的暴露。根据这些实施方式,比例可以是 1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 10、1 : 20 ; 1 : 1 : 1、1 : 2 : 2、1 : 2 : 1、1 : 1 : 1 : 1、1 : 2 : 1 : 2 ; 1 : 3 : 1 : 3、2 : 3 : 3 : 3、5 : 4 : 5 : 5、1 : 2 : 2 或任何血清型 1、2、3 和 / 或 4 的任意比例,这取决于例如制剂中显示的血清型数、预定的反应和期望的效果。考虑任何登革病毒血清型制剂可被用于产生用于皮内施用给需要其的对象的疫苗(例如减毒病毒等)。考虑一些制剂当皮内引入时可比其他制剂更有效。

[0030] 在其它实施方式中,登革病毒疫苗制剂的组合物可在对象暴露于登革病毒之前、期间或之后皮内引入到对象中。根据这些实施方式,对象可接受单次皮内注射,或者一次以上包括登革病毒制剂的注射,任选地接着一次或多次另外的注射。皮内应用本文所述的制剂可以与给对象的任何其它抗病毒治疗或疫苗的施用模式(例如皮下注射)组合。在一些实施方式中,考虑皮内引入本文考虑的制剂可被施用到对象身体的任何合适区域(例如臂、臀等)。此外,作为初始或加强施用的本文疫苗制剂的皮内施用可发生在同一天、连续的几天、每周、每月、两月或其它合适的治疗方案。

[0031] 方法

[0032] 核酸扩增

[0033] 核酸可被用于任何制剂或被用于产生本文考虑的任何制剂。根据标准方法,被用作扩增模板的核酸序列可以是分离的病毒(例如,登革病毒)。核酸序列可以是基因组 DNA 或者分级的或全细胞 RNA。在使用 RNA 的情况下,将 RNA 转化为互补的 cDNA 可能是期望的。在一些实施方式中, RNA 是全细胞 RNA,并且被直接用作扩增模板。考虑本领域已知的扩增核酸分子的任何方法(例如 PCR、LCR、Q β 复制酶等)。

[0034] 表达的蛋白或肽

[0035] 基因可在任何数目的不同重组 DNA 表达系统中表达以产生大量的多肽产物,其然后可被纯化并用在本文所报道的方法和组合物中。考虑本领域已知的产生和使用构建物的任何方法。在某些实施方式中,编码一种或多种多肽的基因或基因片段可通过本领域已知的标准克隆或亚克隆技术插入到表达载体。

[0036] 蛋白质、肽和 / 或抗体或其片段可通过本领域已知的任何方法进行检测或分析。在某些实施方式中,可以使用分离或分析分子的方法诸如凝胶电泳或柱层析方法。

[0037] 电泳

[0038] 电泳可被用于基于大小和电荷分离分子(例如大分子诸如蛋白质或核酸)。有许多本领域已知的电泳变形形式。分子移动穿过的溶液可以是自由的,通常在毛细管中,或者它可被嵌入基质或者本领域已知的其它材料中。常见的基质可包括但不限于,聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、质谱(mass spec)、印迹和滤纸。

[0039] 一些实施方式,其利用编码多肽的基因或基因片段,可通过标准亚克隆技术被插入到表达载体中。可以使用表达载体,其产生作为融合蛋白的重组多肽,允许多肽或蛋白质

的快速亲和纯化。这种融合蛋白表达系统的实例是谷胱甘肽 S- 转移酶系统 (Pharmacia, Piscataway, NJ)、麦芽糖结合蛋白系统 (NEB, Beverly, MA)、FLAG 系统 (IBI, New Haven, CT) 和 6×His 系统 (Qiagen, Chatsworth, CA)。

[0040] 药物制剂

[0041] 本文考虑了用于疫苗的本领域已知的任何药物制剂。在某些实施方式中,制剂可包含各种比例的一种或多种 DEN 血清型,这取决于登革病毒亚型的预定暴露或存在。考虑制剂可包含用于接种对象的其它试剂,其包括但不限于本领域技术人员已知的其它活性或非活性成分或组合物。

[0042] 试剂盒

[0043] 其它实施方式涉及与本文描述的方法(例如疫苗的应用或施用方法)和组合物一起使用的试剂盒。一些实施方式涉及具有疫苗组合物的试剂盒,其用于预防或治疗带有、暴露于或怀疑暴露于一种或多种登革病毒的对象。在某些实施方式中,试剂盒可包括预定比例的一种或一种以上的登革病毒血清型(一种或多种)的制剂(例如减毒疫苗)。试剂盒可以是可携带的,例如,能被运输并用于遥远区域诸如军事装置或偏僻村庄。其它试剂盒可用于健康设施中以治疗已经暴露于一种或多种登革病毒或怀疑处于暴露于登革病毒的风险的对象。

[0044] 试剂盒也可包括合适的容器,例如小瓶、小管、小型或微型离心管、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器。在提供另外的成分或剂的情况下,试剂盒可包含该剂或成分可被放入的一个或多个另外的容器。本文试剂盒也将一般包括将商业规模的剂、组合物和任何其它试剂容器包含在密闭空间中的工具。这样的容器可包括期望小瓶被保留到其中的注射或吹模塑料容器。任选地,一种或多种另外的剂诸如免疫原性剂或其它抗病毒剂、抗真菌或抗菌剂可以为所述组合物,例如用作针对一种或多种另外的微生物的疫苗的组合物所需。

[0045] 下列实例被包括以证实本文所示的某些实施方式。本领域技术人员应当了解,在下面实施例中公开的技术遵循发现在本文公开的实践中功能良好的代表技术。然而,鉴于本公开内容,本领域技术人员应当理解,在所公开的某些实施方式中可进行许多改变,并仍将获得类似或相似的结果,而没有背离本文的精神和范围。

实施例

[0046] 实施例 1

[0047] 前面的研究揭示使用各个 DEN(登革病毒)血清型的自然感染导致免于由同源血清型引起的登革热的长期保护。在某些实施方式中,有效的登革疫苗的施用紧密模仿自然感染并能作为施用针对登革病毒的疫苗的方式。本文报道的实施方式可涉及登革病毒(DEN)感染的自然感染途径,这类似于运输宿主的皮内递送,蚊子咬伤。在某些实施方式中,可以使用将疫苗病毒沉积到相同组织的皮内注射。皮肤是非常易达到的器官并且代表有效的免疫屏障,这主要归功于表皮中居留的朗格汉斯细胞(LCs)的存在。皮肤免疫引起宽范围的免疫反应,包括体液的、细胞的和粘膜的反应,并且具有绕过预先存在的免疫性对所施用疫苗的免疫原性的作用的可能。

[0048] 报道了在需要这种治疗的对象中皮内(ID)施用四价登革疫苗的一些实施方式。皮内施用的一个示例性方法对通过皮内施用在四个施用了 5 : 5 : 5 : 5 DENVax(登革病

毒疫苗)的食蟹猴(Cynomologous macaques)进行。为了达到相等剂量的病毒,利用无针喷射注射器,在三个空间上接近的部位 ID 沉积 0.15ml 疫苗(参见下面的图 1 和 2)。图 1 表示用于皮内接种的皮内注射(例如 PharmaJet®)装置。

[0049] 图 2 图解在用 PharmaJet 装置接种后食蟹猴上的接种部位。动物在 60 天后通过相同的途径用相同的制剂加强。血清样品在预定的时间间隔 15、30、58、74 和 91 天进行收集,并且测试针对四种登革血清型的中和抗体的存在。对血清类样品进行 PRNT(蚀斑减少中和试验,在本领域中已知用于量化抗 DEN 中和抗体的水平)。

[0050] 证实的是,与初次施用(参见图 3)或二次施用(参见图 4)后的 SC 施用相比, ID 施用后,中和抗体滴度显著地更高。因为部位在相同区域内间隔接近,并且每个接种由所有的四种病毒组成,所以这种疫苗递送模式非常类似于 DENVax 的单次施用。图 3 图解在第 58 天(初次施用后 58 天)的 50% PRNT 几何平均滴度。图 4 图解在第 74 天(在第 60 天的二次施用后 14 天)的 50% PRNT 几何平均滴度。如图中所示,针对所有四种登革病毒的中和抗体滴度在皮内施用后比皮下施用高。此外,显示中和抗体反应的动物数(“血清转化(seroconversion)”被定义为 PRNT > 10)在第一剂量疫苗后更大(参见表 1,显示在初次和二次免疫后血清转化成四种登革血清型中每一种的动物的百分数)。

[0051] 表 1:登革免疫后非人灵长类的血清转化

[0052]

DENVax 制剂	% 血清转化							
	DEN-1		DEN-2		DEN-3		DEN-4	
	初次	加强	初次	加强	初次	加强	初次	加强
5:5:5:5 SC	87.5%	100.0%	100.0%	100.0%	75.0%	100.0%	50.0%	100.0%
5:5:5:5 ID	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

[0053] 测试了免疫动物对于野生型登革病毒的攻击的保护。在食蟹猴中,野生型登革病毒感染导致病毒复制和病毒血症,但没有临床症状。在第 91 天,用 DENV-1(登革病毒血清型 1)攻击两只猴子,以及用 DEN-2(登革病毒血清型 2)攻击两只猴子。在攻击后每天收集血清样品持续 11 天。通过定量实时聚合酶链式反应技术(q-rtPCR)测量样品中登革病毒 RNA 的水平,并且通过病毒分离和 Vero 细胞上蚀斑形成测量活病毒的滴度。结果显示在表 2 和 3 中。在第 91 天,刚好在攻击前(“预攻击”)和在第 105 天,攻击后 14 天(“后”)针对 DEN-1 的中和抗体。病毒血症被给出为活的 DEN-1 病毒可从血液样品分离的天数(“持续时间”)和从各个动物分离的峰滴度的 log10。病毒 RNA 被给出为可在血清样品中检测出病毒 RNA 的天数(“持续时间”)和在各个猴子中峰病毒 RNA 水平,表示为所检测的病毒 RNA 基因组数目的 log10。

[0054] 表 2: DEN-1 攻击后的反应

[0055]

猴子	制剂	DEN-1 PRNT		病毒血症		病毒 RNA	
		攻击前	后	持续时间	峰	持续时间	峰
CY0174	5:5:5:5 SC	240	240	0	0	0	0
CY0181	5:5:5:5 SC	640	61440	0	0	5	5.6
CY0192	5:5:5:5 ID	1920	1280	0	0	0	0
CY0194	5:5:5:5 ID	7680	1920	0	0	0	0
CY0061	对照	1	2560	6	2.0	9	5.7
CY0193	对照	25	2560	3	2.7	7	6.4
CY0058	对照	1	640	5	2.9	7	5.5
CY0073	对照	1	1280	5	3.6	10	6.2

[0056] 表 3 :用 DEN-2 攻击后的反应

[0057]

猴子	制剂	DEN-2 PRNT		病毒血症		病毒 RNA	
		攻击前	后	持续时间	峰	持续时间	峰
CY0172	5:5:5:5 SC	3413	3413	0	0	1	3.9
CY0177	5:5:5:5 SC	853	533	0	0	0	0
CY0198	5:5:5:5 ID	240	320	0	0	0	0
CY0201	5:5:5:5 ID	1920	1600	0	0	0	0
CY0088	对照	6	10240	6	2.3	8	5.1
CY0199	对照	1	3840	5	1.8	9	4.7
CY0065	对照	1	10240	5	2.9	8	5.8
CY0104	对照	1	10240	4	2.4	8	5.7

[0058] 攻击后,SC 和 ID 免疫的动物被完全保护免于 DEN-1 或 DEN-2 引起的病毒血症(相比如对照动物,其显示持续时间长的严重的病毒血症)。在所有 ID 免疫的动物,而不是所有 SC 免疫的动物中,也存在攻击后没有病毒 RNA 复制以及抗体滴度不增加(比较 ID 动物和 SC 注射的 CY0181、CY0172 或者对照动物)。这些数据暗示保护是“消毒的(sterilizing)”并且防止攻击后任何病毒复制。

[0059] 实施例 2

[0060] 在另一实例中,在非人灵长类中测试在不同位置不同时间选择递送的最优化 DENVax 制剂。八只食蟹猴的组用分别包含 1×10^5 蚀斑形成单位(pfu)、 1×10^4 pfu、 1×10^5 pfu 和 1×10^5 pfu 的 DENVax-1、DENVax-2、DENVax-3 和 DENVax-4(缩写为 5 : 4 : 5 : 5) 的 DENVax 制剂进行免疫。两种剂量将以 0.1ml ID 施用。组将通过在第 0 天每个臂任一剂量,在第 0 天一个臂中一个剂量和在第 7 天另一个臂中一个剂量,或者在第 0 天一个臂中一个剂量和在第 60 天另一个臂中一个剂量进行免疫。这些组将与在第 0 天相同臂上三个部位和第 60 天另一臂上三个部位接受相同剂量(5 : 4 : 5 : 5) 的组以及在第 0 天一个臂上和第 60 天另一臂上以单一的 0.5ml SC 免疫接受相同剂量的组进行比较。对照组仅用疫苗赋形剂进行免疫(无疫苗病毒)。免疫后,在第 0、7(对于峰值病毒血症(peak viremia))、15、30、60 和 90 天收集血液样品以通过 PRNT50 测试针对四种登革病毒血清型的中和抗体。在第 30、60、90 天收集的 PBMCs 也将通过 ELISPOT 试验监测 IFN- γ 分泌。在第 90 天,各个组的两只动物将用野生型的 DEN-1、DEN-2、DEN-3 或 DEN-4 病毒攻击。检测攻击动物的临床指征和温度(每天两次)、食物消耗(每天一次)和体重(每周)的变化。此外,所有的动物在攻击后都将每天出血持续 11 天以检测病毒血症和血液学参数。

另外,将评估 90 天攻击后对所有四种 DEN 病毒的 PRNT 反应和保护的速度和持续时间。据认为,在多个部位和相异解剖学位置的皮内施用可比作为单个弹丸 (bolus) 的皮下施用更有效。多个部位可提供疫苗对更多抗原呈递细胞的暴露。相异解剖学位置可允许疫苗进入多个淋巴结。此外,登革疫苗的加强免疫仅仅在小鼠、灵长类和人临床试验中抗体反应发展之后 30 天或更长时间施用。在此时,中和抗体抑制对活病毒疫苗的反应。先前显示,初始免疫后一个月加强灵长类不如初始免疫后四个月剂量给药有效。推测在初始免疫后循环的高水平同源和异源抗体能够在二次剂量后抑制病毒复制。虽然延长的(两个月或更长)免疫可防止该抑制,但是还没有测试在发展潜在的中和抗体反应之前以更短免疫间隔加速免疫的方案是否可能是有利的。这种缩短的方案在地方性国家或对于旅行者来说可以是个优势,其中在免疫之间暴露于登革病毒可将它们置于疾病的风险中。

[0061] 实施例 3

[0062] 在另一实例中,已经启动人类临床试验,其研究通过 ID 或 SC 注射以 0.1ml 施用的两种 DENVax 制剂的安全性和免疫原性。12 个个体的组将在第 0 和 90 天用例如低剂量 DENVax 制剂(分别 8×10^3 pfu、 5×10^3 pfu、 1×10^4 pfu 和 2×10^5 pfu 的 DENVax-1、-2、-3 和 -4) 或高剂量(分别 2×10^4 pfu、 5×10^4 pfu、 1×10^5 pfu 和 3×10^5 pfu 的 DENVax-1、-2、-3 和 -4) 的 DENVax ID 或 SC 进行免疫。两个对照组将用磷酸盐缓冲的盐水 SC 或 ID 注射。将监控患者的任何不利事件,以及血液学或血液化学参数的任何显著变化。将在定期间隔收集血清样品以测量疫苗病毒复制和中和抗体反应。

[0063] 实施例 4

[0064] AG129 小鼠中皮内施用的 DENVax 的免疫原性和效力。在另一实例中,进行两个研究以比较在 AG129 小鼠中施用途径对 DENVax 的免疫原性和效力的影响。在一个实例中,在 AG129 小鼠中通过测量利用针和注射器在背上皮肤下 SC 注射或向脚垫中 ID 注射之后的中和抗体反应比较单价 DENV^ax-4(例如针对一种登革病毒血清型的疫苗)的免疫原性。8 只 AG129 小鼠的组比分别以 $50 \mu\text{l}$ 和 $100 \mu\text{l}$ 的终体积 ID 或 SC 注射 10^5 PFU/剂量的嵌合 DENVax-4 疫苗。初次注射后六周,各治疗组的动物经由相应的 ID 或 SC 途径用 10^5 PFU 的 DENVax-4 或 TFA 进行加强。小鼠在第 31 和 58 天出血并且收集的血清被汇合以测量中和抗体反应。

[0065] 与经由 SC 途径引起的反应相比,经由 ID 途径的 DENVax-4 免疫引起高 5 倍的针对 DEN-4 的中和抗体反应(参见例如图 4)。通过任一免疫途径引起的抗 DEN-4 反应具有显著的针对 DEN-3 地交叉中和活性,但不是针对 DEN-1 或 DEN-2 血清型。图 4 显示在用嵌合 DENVax-4 初始和二次免疫 AG129 小鼠后中和抗体反应。小鼠在第 31 和 58 天出血并且收集的血清被汇合以利用空斑数降低测定 (PRNT50) 测量中和抗体反应。

[0066] 在加强后两周,每个组的动物被分成两组,并且用 10^6 PFU 的 DEN-1 (Mochizuki 病毒毒株) 或 DEN-2 (New Guinea C 毒株) 病毒进行攻击。监测攻击动物的疾病的临床指征,并且在 5 周的期间内记录存活率。经由 ID 途径免疫的小鼠在 DEN-1 攻击后显示没有疾病病征(图 5A)。在 SC 免疫的组中仅一只小鼠死于感染,而其余动物没有任何明显的感染病征(图 5B)。相反,所有对照动物在 DEN-1 攻击后 13 天死于感染(图 5A)。相比对照 (TFA) 小鼠在攻击后第 17 天 (MST = 12.5 天) 全部死亡, DEN-2 攻击后,经由 SC 途径仅用 DENVax-4 免疫的所有动物到第 25 天死于感染,其中平均存活时间 (MST) 为 19.5 天(图 5B)。相反,

直至 5 周监测期结束, ID DENVax-4 免疫的小鼠有百分之五十幸免于感染 (图 5B)。图 5A 和 5B 表示用 DEN-1(a) 或 DEN-2(b) 病毒攻击后 DENVax-4 免疫 AG129 小鼠的存活。监测攻击动物的疾病的临床体征并在 5 周的期间记录存活率。

[0067] 在第二个研究中, 检测了在小鼠 (例如 AG129) 中 SC 或 ID 施用的四价 DENVax 疫苗的免疫原性。AG129 小鼠的组, 每组六只被分别 SC 或 ID 注射 100 μ l 或 50 μ l (终体积) 的 DENVax。小鼠以 5 : 4 : 5 : 5 (10^5 PFU 的 DENVax-1、-3 和 -4 以及 10^4 PFU 的 DENVax-2) 剂量水平的组合嵌合疫苗用 DENVax 进行免疫。所有免疫的动物在初始接种后 42 天接受 5 : 4 : 5 : 5 DENVax 的加强注射。在第 42 天和 56 天收集血液样品以测量对每一种 DEN 病毒血清型的中和抗体反应。

[0068] 如表 4 中所示, 诱导对所有四种 DEN 血清型的初次和二次中和抗体反应。加强后, 相比 SC 免疫的动物, 在 ID 注射的小鼠组中中和抗 -DEN-1、DEN-3 和 DEN-4 抗体滴度分别增加 2、5 和 2 倍。对 DEN-2 病毒的中和反应在两组中是可比较的。经由 SC 途径的免疫导致针对 DEN-1 > DEN-2 > DEN-3 > DEN-4 的显著中和抗体反应分布 (特征, profile), 其中中和滴度分别为 5120、1280、640 和 80。ID 施用后中和抗体反应的等次已经如下变动: DEN-1 > DEN-3 > DEN-2 > DEN-4, 其中中和抗体滴度分别为 10240、3840、1280 和 160。

[0069] 表 4 是在小鼠 SC 或 ID 免疫化具有比例 5 : 4 : 5 : 5 PFU 的各组合嵌合病毒 (10^5 PFU 的 DENVax-1、-3 和 -4 以及 10^4 PFU 的 DENVax-2) 的四价 DENVax 的免疫原性比较。在第 42 天和 56 天收集血液样品以测量对各 DEN 病毒血清型的中和抗体反应。

[0070] 表 4

[0071]

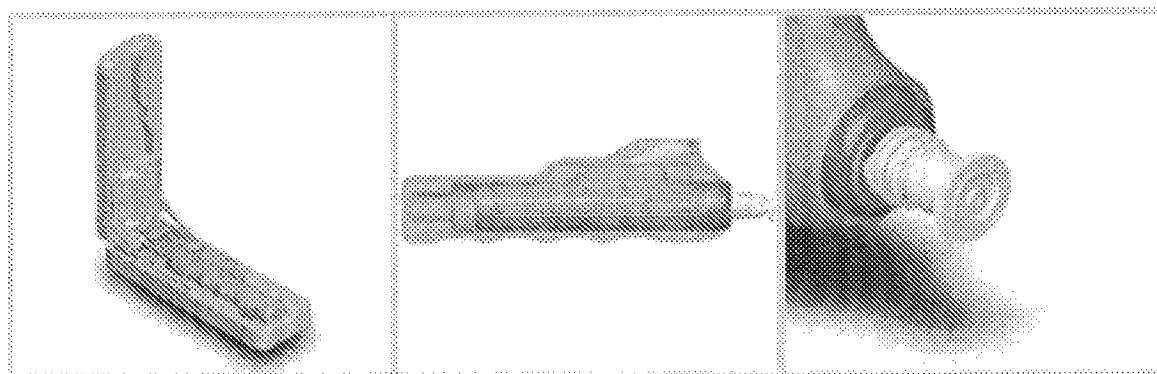
DENVax 制剂	中和抗体滴度(GMT)							
	DEN-1		DEN-2		DEN-3		DEN-4	
	初次	加强	初次	加强	初次	加强	初次	加强
5:4:5:5/SC	1920	5120	3200	1280	1280	640	80	80
5:4:5:5/ID	2560	10240	1280	1280	1600	3840	120	160

[0072] 材料和方法

[0073] 小鼠: AG129 小鼠具有“完整的”免疫系统; 缺乏干扰素 (IFN)- α / β 和 - α 受体。已经描述了登革感染。其他研究: 已经检查了发病机理、细胞向性和 ADE。该模型允许用 DEN-1 和 DEN-2 进行攻击。

[0074] 非人灵长类: 食蟹猴, 猕猴携带病毒 (病毒血症), 但没有显现疾病。

[0075] 鉴于本公开内容, 本文所公开和要求保护的所有组合物和方法可以进行和执行而无需过度试验。尽管组合物和方法已经按照优选实施方式进行描述, 但是对本领域技术人员来说显然的是, 对组合物和方法以及本文所述的方法的步骤或步骤顺序可以进行改变, 而没有背离本文的概念、精神和范围。更具体地, 可用某些化学和生理相关的试剂代替本文所述的试剂, 同时将实现相同或相似的结果。对本领域技术人员来说明显的是, 所有这种类似的替代物和改进被认为在所附权利要求所定义的精神、范围和概念内。



Pharmajet®

图 1

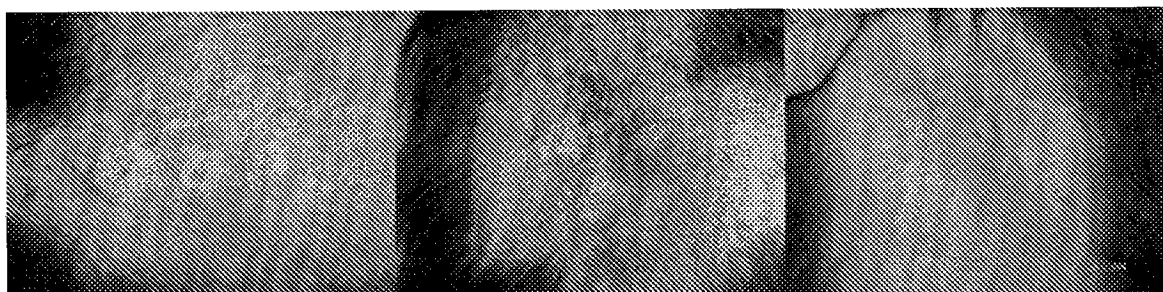


图 2

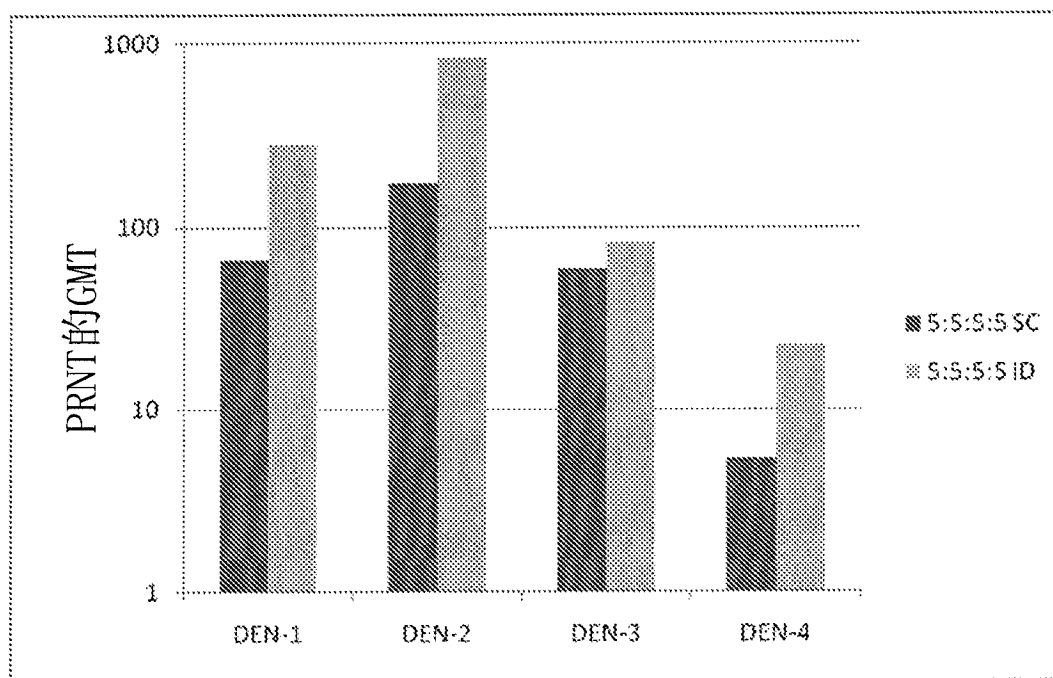


图 3 初次免疫后的免疫反应

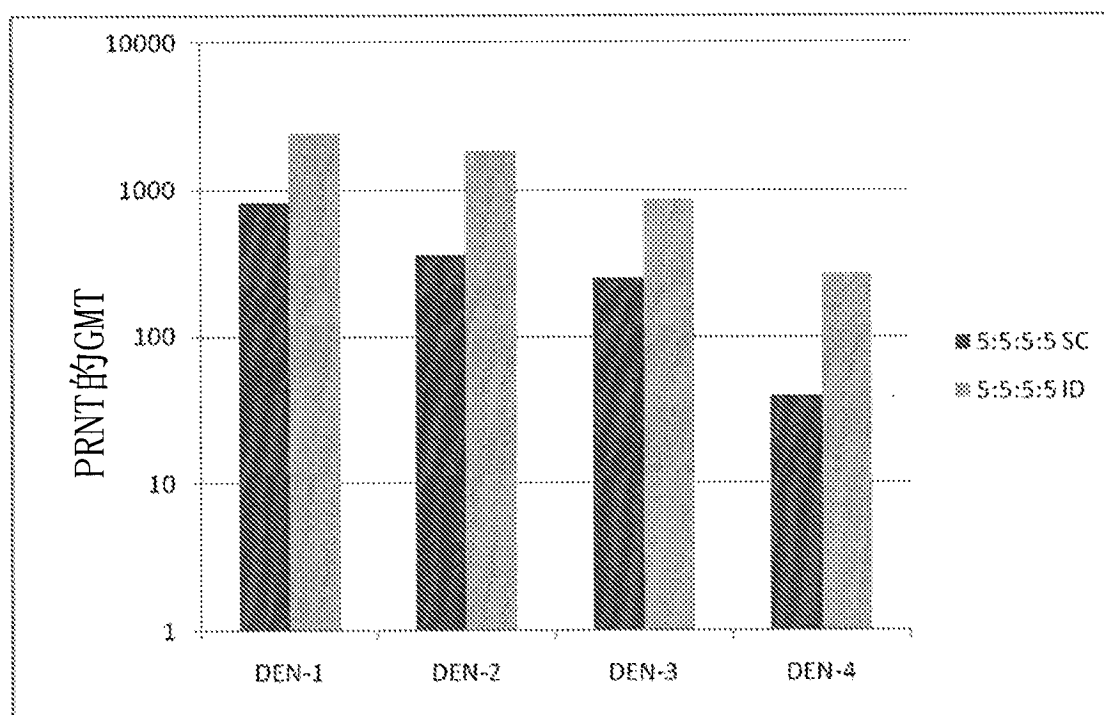


图 4 攻击之后的免疫反应

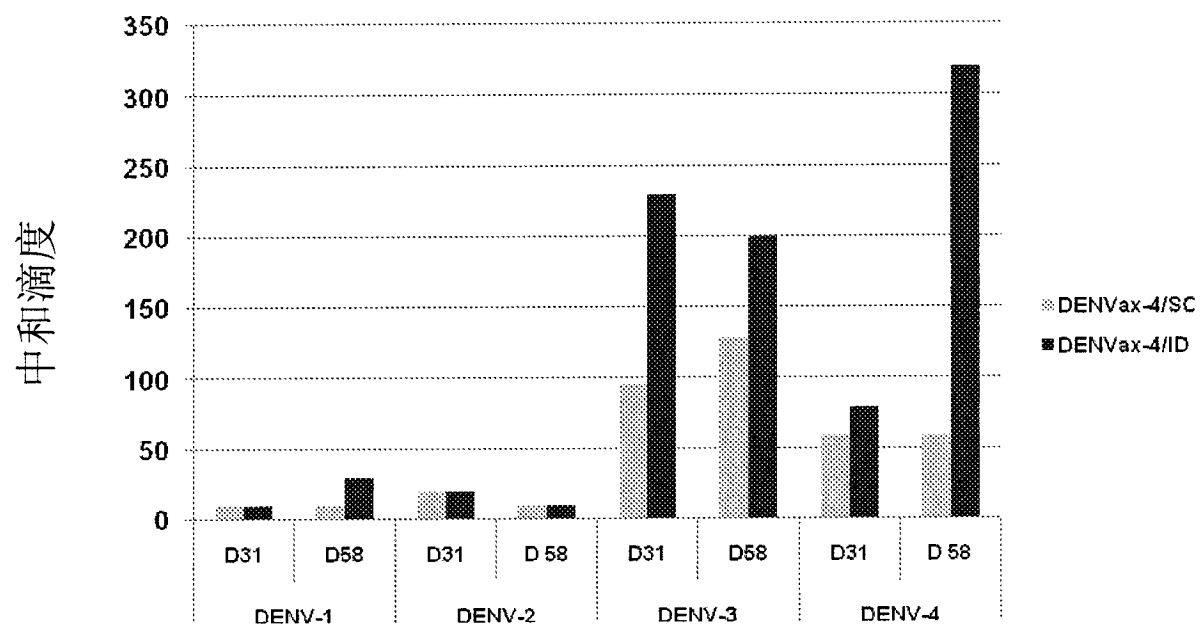


图 5

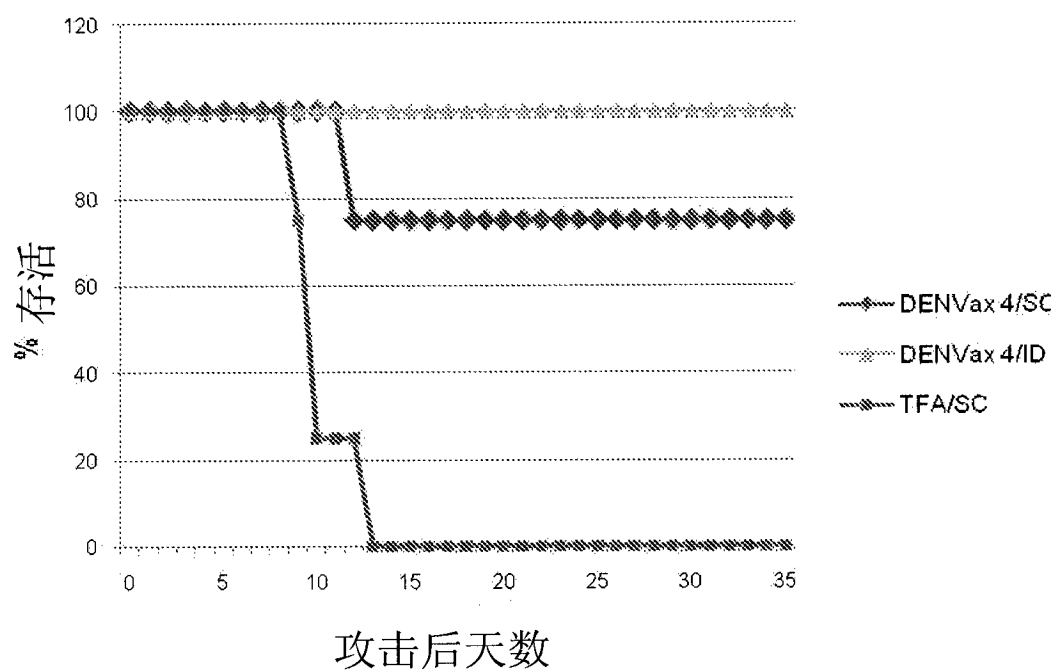


图 6A

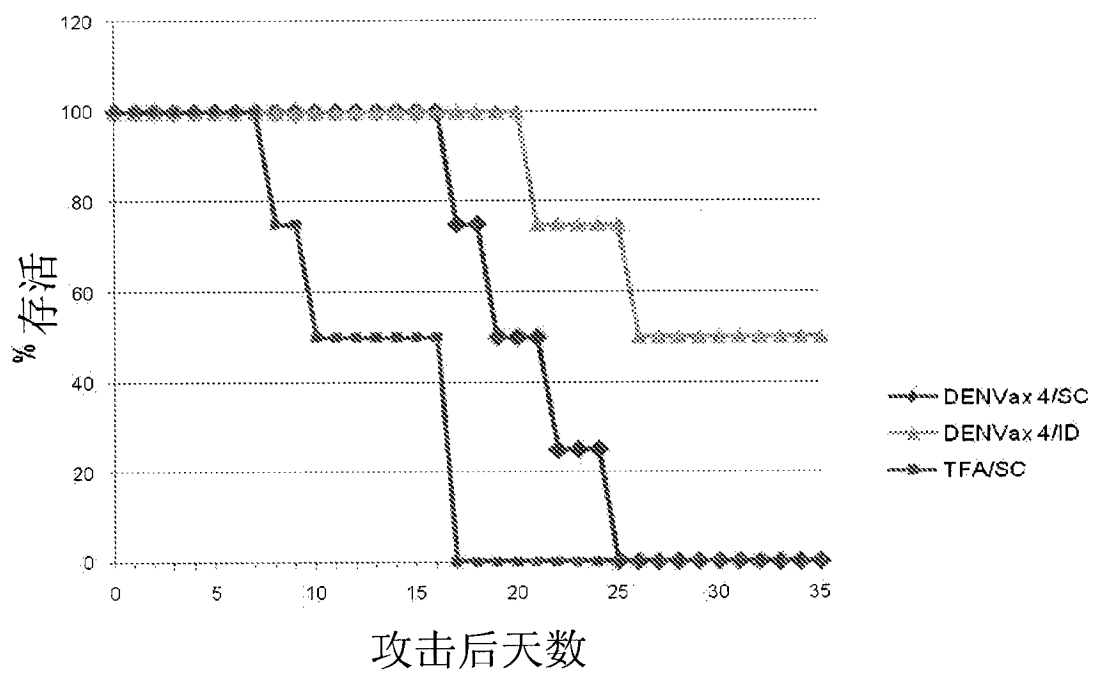


图 6B