



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201402143 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：102120553

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 10 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/295 (2006.01)*

A61P37/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/10 美國

13/492,884

(71)申請人：英維拉根股份有限公司 (美國) INVIRAGEN, INC. (US)

美國

(72)發明人：史汀奇康柏 丹 T STINCHCOMB, DAN T. (US) ; 歐索利歐 喬治 E OSORIO,

JORGE E. (US) ; 帕提朵斯 查拉蘭波斯 D PARTIDOS, CHARALAMBOS D.

(DE) ; 布雷烏 約瑟夫 N BREWOO, JOSEPH N. (GH)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：12 共 81 頁

(54)名稱

抗登革熱病毒疫苗之組成物及投藥方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADMINISTRATION OF VACCINES AGAINST DENGUE VIRUS

(57)摘要

本發明的具體實例報導出用以接種一個體抗全部登革熱病毒血清型的組成物及方法。在某些具體實例中，可在不同解剖位置處將多重疫苗組成物投藥至一個體以對全部登革熱病毒血清型引發快速反應。在某些具體實例中，將二或更多種疫苗組成物投藥至一個體以抗全部登革熱病毒血清型可包括二或更多種投藥途徑。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201402143 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：102120553

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 10 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/295 (2006.01)*

A61P37/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/06/10 美國

13/492,884

(71)申請人：英維拉根股份有限公司 (美國) INVIRAGEN, INC. (US)

美國

(72)發明人：史汀奇康柏 丹 T STINCHCOMB, DAN T. (US) ; 歐索利歐 喬治 E OSORIO,

JORGE E. (US) ; 帕提朵斯 查拉蘭波斯 D PARTIDOS, CHARALAMBOS D.

(DE) ; 布雷烏 約瑟夫 N BREWOO, JOSEPH N. (GH)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：12 共 81 頁

(54)名稱

抗登革熱病毒疫苗之組成物及投藥方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADMINISTRATION OF VACCINES AGAINST DENGUE VIRUS

(57)摘要

本發明的具體實例報導出用以接種一個體抗全部登革熱病毒血清型的組成物及方法。在某些具體實例中，可在不同解剖位置處將多重疫苗組成物投藥至一個體以對全部登革熱病毒血清型引發快速反應。在某些具體實例中，將二或更多種疫苗組成物投藥至一個體以抗全部登革熱病毒血清型可包括二或更多種投藥途徑。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗登革熱病毒疫苗之組成物及投藥方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADMINISTRATION
OF VACCINES AGAINST DENGUE VIRUS

【技術領域】

優先權

[0001]本申請案主張2012年6月10日提出的美國專利申請案13/492,884之部分接續申請案的優先權，其中該部分接續申請案在35 USC §120下主張2010年5月28日提出的美國非臨時專利申請序號12/790,511之利益，其中該非臨時專利申請案在35 USC §119(E)下主張2009年6月01日提出之美國臨時專利申請序號61/183,020的優先權。先前的申請案其全文全部以參考之方式併入本文用於全部目的。

發明領域

[0002]本發明的具體實例報導出一種抗全部登革熱病毒株之疫苗組成物及將該疫苗投藥至一個體之方法。在某些具體實例中，該疫苗組成物可藉由皮下、皮內、肌肉內或其它注射或引進方法投藥。在某些具體實例中，在一個體中注射抗全部登革熱病毒型式疫苗包括在第0天時多個解剖位置。其它具體實例包括在初始注射後，於第一次處理的幾天至最高12個月內之後續注射。在其它具體實例中，除了第0天處理外，無需要額外注射。在某些具體實例中，在第0天時，使用皮下、皮內、肌肉內或其它模式將抗

登革熱病毒的疫苗組成物引進一個體，以在投藥後提供抗三或更多種登革熱血清型DEN-1、DEN-2、DEN-3及DEN-4之保護。

【先前技術】

發明背景

[0003]已經有效地使用疫苗來保護對抗病毒感染以減低人類疾病之發生率。最成功的病毒疫苗技術之一為使用經減弱或減毒的病毒株(“活的減毒病毒”)來免疫動物或人類。由於在免疫後之受限的複製，該減毒株不會造成疾病。但是，該受限的病毒複製足以表現出病毒抗原的完整全部功能及可產生對該病毒有效力及長持續性的免疫反應。因此，在隨後曝露至該病毒之病原株後，經免疫的個體係免受該疾病。這些活的減毒病毒疫苗係使用於公共健康當中最成功的疫苗。

【發明內容】

發明概要

[0004]本發明之具體實例普遍關於用以在一個體中引發保護對抗多種登革熱病毒的方法及組成物，其係藉由例如將一多價登革熱疫苗投藥至該個體。某些具體實例可包括經由皮內(ID)注射將一疫苗組成物引進一個體。根據這些具體實例，該疫苗組成物可皮內引進一個體，以例如引發抗三或更多種登革熱病毒血清型的中和抗體。在某些具體實例中，該疫苗組成物可包括但不限於單一劑量的多價登革熱血清型疫苗調配物，其投藥至一個體時具有預定比

率。在其它具體實例中，該疫苗組成物可包括但不限於初始劑量的登革熱疫苗調配物(例如四價調配物，諸如 DENVax™)，然後可對一個體投藥追加一或多次相同調配物或不同調配物。

[0005]於本文中，其它態樣可關於在一個體中引發一體液或細胞免疫反應，此係藉由例如經由皮內途徑將一疫苗組成物引進一個體，其中該疫苗組成物包括但不限於一登革熱病毒疫苗。根據這些具體實例，所揭示的組成物可皮內投藥至一個體以在該個體中調節抗三或更多種登革熱病毒血清型的中和抗體之製造。某些態樣關於在單一疫苗組成物中，預定組成物比率的多種登革熱病毒血清型或其斷片或其減毒組成物(例如，1 : 1 : 1、10 : 11 : 2 : 2、1 : 10 ; 10 : 1、3 : 4 : 3 : 3、1 : 4 : 1、5 : 5 : 4 : 5；或考慮到任何比率的三或更多種血清型)，以便當對一個體投藥該單一疫苗組成物時，在該個體中增加抗至少三種登革熱病毒血清型的中和抗體之交叉保護及程度。

[0006]在某些具體實例中，使用皮內引進抗登革熱病毒疫苗的某些優點可包括但不限於在一個體中多重保護(交叉保護)對抗某些或全部登革熱病毒血清型；藉由使用減少體積的疫苗劑量而減低成本，與皮下注射比較；在一個體中調節所產生之抗某些或全部登革熱病毒血清型的抗體；及減低在投藥一抗登革熱病毒疫苗之組成物時，一個體於投藥位置處的疼痛。

[0007]在某些具體實例中，該單一劑量抗登革熱病毒疫

苗可包括一或多種登革熱病毒血清型。此外，某些具體實例關於以至少一次額外注射包含多重登革熱病毒的疫苗來處理一個體，其中該額外注射係在與該第一注射分別的位置處投藥，例如，在該個體上之接近該初始注射中或在遠離的解剖位置中。此外，該至少一次額外的皮內注射可在第一次投藥至該個體後少於30天進行；同時其它係在該疫苗的第一次投藥後30天及最高12個月進行。

[0008]揭示於本文的其它具體實例係關於用以在一個體中引發保護對抗全部登革熱病毒血清型之方法及組成物，此係藉由例如連續地於一短時間間期內，在一個或多於一個解剖位置中，使用二或更多劑，將一抗全部登革熱病毒血清型的疫苗投藥至一個體。某些具體實例可包括在一個場所中，經由皮內(ID)、皮下(SC)或肌肉內(IM)注射；及連續地在另一個解剖位置中，藉由ID、SC、IM；或在第二不同解剖位置處，藉由其它引進方法，對一個體引進一疫苗組成物。其它具體實例包括使用任何投藥模式之組合將全部登革熱病毒血清型之登革熱病毒疫苗引進一個體，其中該疫苗之投藥發生在相同天於二或更多個解剖位置處，或藉由二或更多種不同途徑連續地投藥至該個體。

[0009]某些具體實例包括在二或更多個解剖位置處連續地處理需要登革熱病毒四價疫苗接種之個體。在某些具體實例中，該個體可需要在單一天中連續二次投藥，以引發適當程度使人免受登革熱感染的中和抗體。在其它具體實例中，一個體可在二或更多個解剖位置處連續地投藥登

革熱病毒多價疫苗接種，然後，可在30天內諸如約7、約14、約21或約28天後，對該個體投藥至少一具有一包含登革熱病毒血清型的組成物之第三疫苗，其中該組成物可或可不具有全部血清型。在其它具體實例中，一個體可在第0天時，於二或更多個解剖位置處連續地投藥登革熱病毒四價疫苗接種，然後，可在30天內諸如約7、約14、約21或約28天後，對該個體投藥至少一含有一包含登革熱病毒血清型的組成物之第三疫苗，其中該組成物可或可不具有全部血清型。揭示於本文的這些及其它具體實例之疫苗組成物可包含二或更多種呈預定比率的登革熱病毒血清型，用於除了該初始雙重接種外的隨後投藥。這些隨後的疫苗接種可依雙重注射後的抗體之個人化力價或其它準則諸如測試群體的結果而定。在某些具體實例中，隨後的接種可僅包含單一登革熱血清型(例如DEN-4)。

[0010]在某些具體實例中，該引進個體的組成物包含抗全部登革熱病毒血清型疫苗，例如四價DENVax™或另一種類似調配物。DENVax™包含預定比率的四價登革熱疫苗，其中該疫苗係由在減毒的DEN-2骨架上之構築體組成(參見例如，2001年2月16日提出的PCT申請案編號PCT/US01/05142，其全文以參考之方式併入本文用於全部目的)。在其它組成物中，全部登革熱疫苗病毒血清型在該組成物中係呈等比例。在更其它組成物中，每種登革熱疫苗病毒血清型可彼此呈特別的比率，如此該組成物之引進引發足夠的中和抗體程度，其將提供該個體具有足夠的抗

三或更多種登革熱病毒(例如DEN-1、DEN-2、DEN-3及/或DEN-4)感染保護。例如，若一個體於二或更多個解剖位置處連續接收二或更多種組成物且該個體對一或多種特別的登革熱病毒血清型具有較低的保護時，則對該個體的補強注射可包括多重(多於二種)疫苗組分或單一疫苗組分，以在個體中改良對全部四種登革熱病毒之免疫反應。根據這些具體實例，可使用在技藝中已知的標準方法分析來自個體的樣品其對登革熱感染之抗性。

[0011]在某些具體實例中，可藉由任何途徑在多重解剖位置中將該疫苗組成物引進一個體，以在連續投藥後例如保護對抗三或更多種登革熱血清型。在某些具體實例中，該疫苗組成物可包括但不限於單一劑量包含全部登革熱病毒的血清型之調配物(例如，DENVax™)，將其投藥至一個體能提供對抗至少三種登革熱病毒血清型之保護。在其它具體實例中，該疫苗組成物可包括減毒的登革熱病毒血清型與其它抗病原組成物(例如日本腦炎、黃熱病、西尼羅河熱、流行性感冒、曲弓熱(Chikungunya)或其它)之組合。於本文中考慮到的組成物可藉由在技藝中已知之任何方法投藥，包括但不限於皮內、皮下、肌肉內、鼻內、吸入、陰道、靜脈內、攝食及任何其它方法。在二或更多個解剖位置中引進可包括任何投藥組合，包括在二或更多個解剖位置藉由相同模式；或藉由二或更多種不同模式，其包括二或更多個分別的解剖位置。根據這些具體實例，該二或更多個解剖位置可包括不同腳。在其它具體實例中，該疫苗

接種可使用在技藝中已知的任何裝置輸送至個體，包括但
不限於針及注射器、噴氣注射、微針頭注射、貼片傳遞(例
如皮膚)、皮內傳遞裝置、吸入裝置、鼻內裝置、慢釋型微
粒子、及任何其它可接受的疫苗傳遞裝置。

[0012]在某些具體實例中，用於登革熱病毒疫苗的雙重
投藥之疫苗組成物可包括在單一組成物中一包含多於一種
嵌合登革熱病毒的組成物。在某些組成物中，使用在此組
成物中之嵌合構築體系由登革熱-登革熱血清型組成，諸如
在登革熱-2骨架上的登革熱-1、登革熱-3及/或登革熱-4。根
據這些具體實例，該單一疫苗組成物可包括活的減毒登革
熱病毒，其中在接受此組成物的個體中對至少三種及最高
全部四種登革熱病毒血清型引發免疫反應。於本文中考慮
到的構築體包括活的減毒登革熱病毒，包括一或多種活的
減毒登革熱病毒及一或多種登革熱-登革熱嵌合病毒，更包
括在單一構築體中該經減毒的登革熱病毒之殼體及非結構
性蛋白與至少第二種登革熱病毒之原膜蛋白及包膜蛋白
(envelope proteins)。在某些具體實例中，該殼體及非結構性
蛋白係來自經減毒的登革熱-1、登革熱-2、登革熱-3或登革
熱-4病毒。在其它具體實例中，該至少第二種登革熱病毒之
原膜蛋白及包膜蛋白係登革熱-2、登革熱-3或登革熱-4，當
該減毒的登革熱病毒係登革熱-1時；或登革熱-1、登革熱-3
或登革熱-4，當該減毒的登革熱病毒係登革熱-2時；或登革
熱-1、登革熱-2或登革熱-4，當該減毒的登革熱病毒係登革
熱-3時；或登革熱-1、登革熱-2或登革熱-3，當該減毒的登

革熱病毒係登革熱-4時。再者，該登革熱-登革熱嵌合病毒可包括減毒的登革熱-2病毒之殼體及非結構性蛋白，而該原膜蛋白及包膜蛋白係登革熱-1、登革熱-3或登革熱-4。

[0013] 其它具體實例包括該活的減毒病毒之骨架係登革熱-2之活的減毒病毒。再者，該登革熱-2可包括任何登革熱-2株。在某些活的減毒登革熱-2病毒中，該登革熱-2包含PDK-53株。在另一個具體實例中，該嵌合體係一核酸嵌合體，其包括譯出來自減毒的登革熱-2病毒的非結構性蛋白之第一核苷酸序列，及譯出來自第二黃熱病病毒的結構性蛋白質之第二核苷酸序列。在另一個具體實例中，該結構性蛋白質可係黃熱病病毒的C、prM或E蛋白質。可從其選出結構性蛋白質的黃熱病病毒之實施例包括但不限於登革熱-1病毒、登革熱-2病毒、登革熱-3病毒、登革熱-4病毒、西尼羅河熱病毒、日本腦炎病毒、聖路易斯(St. Louis)腦炎病毒、黃熱病病毒及蜱媒腦炎病毒。在進一步具體實例中，該結構性蛋白質可選自於與黃熱病病毒緊密相關的非黃熱病病毒物種，諸如肝炎C病毒。

[0014] 在某些具體實例中，可存在有在該非結構性蛋白中的胺基酸取代突變及在該5'非編碼區中的核苷酸取代突變。此核苷酸取代突變發生在保存於全部四種登革熱血清型中之莖環結構的莖幹中。特別是，在NS1-53處的單一突變、在NS1-53處與在5'NC-57處的雙重突變、在NS1-53處與在NS3-250處的雙重突變、及在NS1-53處、在5'NC-57處與在NS3-250處的三重突變可提供揭示於本文之經減毒的

DEN-2病毒。

[0015]經考量可使用在這些基因座處包含非保守性胺基酸取代的任何登革熱-2病毒之基因組作為在描述於本文的無毒嵌合體中之骨架。再者，亦可使用在胺基酸序列或核苷酸序列排列及莖幹結構分析後，於相同基因座處包含類似的突變之其它黃熱病病毒基因組作為骨架結構，及其於本文中係定義為與該登革熱-2 PDK-53基因組的減毒突變相等。該骨架、該嵌合體之包含5'及3'非編碼區的區域及譯出非結構性蛋白的區域亦可包括進一步突變，以維持該無毒表現型的穩定性及減低該無毒病毒或嵌合體可回復回劇毒野生型病毒的可能性。例如，若必要時，在該5'非編碼區中之莖幹/環狀結構的莖幹中之第二突變可提供額外的穩定性。

[0016]在其它具體實例中，除了於本文中特別描述的那些外，該嵌合病毒可在其結構及非結構性蛋白中包括核苷酸及胺基酸取代、缺失或插入。揭示於本文的結構及非結構性蛋白經了解包括任何蛋白質，包括該完全蛋白質或譯出該完全蛋白質之序列的任何基因、蛋白質的抗原決定區、或包含例如其二或更多個胺基酸殘基之任何斷片。揭示於本文的具體實例提供一種用以製得描述於本文的具體實例之嵌合病毒的方法，其使用重組技術，將所需要的取代插入該適當骨架基因組中。

[0017]在其它具體實例中，該組成物可包括一醫藥可接受的載劑及減毒的嵌合病毒，其包括來自其它登革熱病毒

血清型、其它黃熱病病毒物種或其它緊密相關的物種諸如肝炎C病毒之胺基酸序列。包含來自其它登革熱病毒血清型、其它黃熱病病毒物種或其它緊密相關物種的胺基酸序列之蛋白質或多胜肽可作用為免疫原，因此，使用來引發抗其它登革熱病毒血清型、其它黃熱病病毒物種或其它緊密相關物種的免疫性反應。

[0018]在一個具體實例中，已考慮到使用包括來自減毒的登革熱-2病毒的核苷酸序列及來自第二種登革熱病毒(或其它黃熱病病毒)的核苷酸序列之核酸嵌合體，在第0天時雙重投藥，其中來自該第二種黃熱病病毒的核苷酸序列引導黃熱病病毒抗原之合成。在本發明的另一個態樣中，已考慮到包含三或更多種登革熱病毒血清型的疫苗之組成物。

[0019]在另一個態樣中，用以製得免疫性或疫苗組成物之方法係使用重組技術，其將所需要的取代插入適當的黃熱病病毒基因組中。本發明的另一個目標為提供一種授予抗三或更多種登革熱病毒血清型的免疫性之組成物及方法，其同時在不同解剖學區域中使用雙重投藥以引發接受此方案的個體之其它淋巴結。

[0020]本發明的另一個目標係提供使用於一些快速基因測試之任何的核酸探針及引子，其中該測試係用於本發明的每種疫苗病毒之診斷。本發明的此目標之具體化可係聚合酶連鎖反應試驗、雜交試驗或由技藝已知的其它核酸序列偵測技術。一個具體實例包括使用自動化PCR基底的核酸偵測系統。

[0021]在其它具體實例中，可將多種突變引進該嵌合登革熱病毒，以進一步減毒該嵌合病毒或改良致免疫性。在某些具體實例中，該組成物可包括能對全部四種登革熱病毒血清型引出免疫反應之嵌合登革熱病毒，其中係在一個體的二個解剖位置中引進一單一組成物。某些具體實例關於短期間遊覽登革熱流行國家的標的人群，諸如旅遊者。

【圖式簡單說明】

[0022]下列圖形形成本專利說明書的部分且係包括以進一步闡明某些具體實例。某些具體實例可藉由單獨參照這些圖形的一或多幅或與所顯現的特定具體實例之詳細說明組合而較好地了解。

[0023]圖1顯示出一現在可獲得的皮內注射裝置之實施例。

[0024]圖2顯示出在非人類靈長類動物個體中的注射位置之實施例，其中該個體已皮內引進一抗登革熱病毒疫苗。

[0025]圖3顯示出一長條圖，其比較在經由皮下(SC)對皮內(ID)途徑注射抗登革熱病毒疫苗之一次(主要)投藥後，抗不同比率的登革熱病毒血清型所產生之中和抗體力價。

[0026]圖4顯示出一長條圖，其比較在經由皮下(SC)對皮內(ID)注射抗登革熱病毒疫苗之第二次追加投藥後，抗不同登革熱病毒血清型所產生之中和抗體力價。

[0027]圖5顯示出一於老鼠中，在以抗登革熱病毒疫苗血清型-4皮下及皮內免疫後之中和抗體力價的長條圖。

[0028]圖6A及6B顯示出在接種登革熱疫苗接著以野生

型登革熱病毒激發免疫後，存活的老鼠之圖式說明。老鼠係藉由SC或ID途徑以登革熱疫苗(例如，DENVax-4)或緩衝液/安慰劑(例如，TFA)感染接種。

[0029] 圖7顯示出在第0天二次；或第0天1次及第42天1次注射(例如，DENVaxTM；4：3：4：5比率)後，於第28天及第56天時，對DEN-1、DEN-2、DEN-3及DEN-4之中和抗體力價。

[0030] 圖8顯示出在第0天二次；或第0天1次及第42天1次注射(例如DENVaxTM；3：3：3：3，使用大約相等量)後，於第28天及第56天時，對DEN-1、DEN-2、DEN-3及DEN-4之中和抗體力價。

[0031] 圖9A-9D顯示出一曲線圖，其比較在以四價登革熱病毒疫苗SC免疫後，於非人類靈長類動物中達成之中和抗體力價。二組以無針裝置經由皮下途徑接種疫苗，其係使用在相同天兩次(0,0)，或在第0天時一次及在第60天時再一次(0,60)。

[0032] 圖10A-10B顯示出從人類臨床試驗獲得的資料。對血清反應陰性的人類(在試驗開始時，人類闡明對登革熱病毒血清型有些微至無抗體)皮下或皮內提供二劑(第0天及第90天)的四價登革熱疫苗血清型調配物。在第0、30、60、90及120天時分析抗每種登革熱血清型的抗體程度。

[0033] 圖11A-11D顯示出一曲線圖，其比較在以四價血清型登革熱疫苗皮下免疫後，於非人類靈長類動物中所達成之中和抗體力價。二組係在相同天接種兩次(0,0)，或在

第0天時一次及在第60天時再一次(0,60)。在第0、28、58、73及90天時分析血清之抗體存在，及分析抗全部四種登革熱血清型的抗體之偵測(DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4)。

[0034]圖12顯示出單一對雙重投藥登革熱病毒疫苗之分析。此資料顯示出在使用揭示於本文的某些方案曝露至此組成物的個體中，於多種基因轉錄程度上的變化。

【實施方式】

定義

[0035]如於本文中所使用，“一”或“一種”可意謂著一項或多於一項。

[0036]如於本文中所使用，容器可包括但不限於測試管、迷你或微量離心(micro-fuge)管、管道、小玻瓶、微滴板或容納器。

[0037]如於此專利說明書中所使用，“個體”可包括但不限於哺乳動物諸如人類或馴養或野生的哺乳動物，例如狗、貓、其它家庭寵物(例如，倉鼠、天竺鼠、老鼠、大白鼠)、雪貂、兔、豬、馬、牛、草原土撥鼠或動物園動物。

[0038]如於本文中所使用，“約”或“大約”可意謂著加或減十個百分比。

[0039]如於本文中所使用，“經減毒的病毒”可意謂著一病毒，其闡明當投藥至個體諸如哺乳動物(例如，人類或動物)時，減低或無疾病的臨床跡象。

[0040]如於本文中所使用，“連續地”可意謂著呈短暫接近，通常係單一病人就診及在24小時內。

[0041]如於本文中所使用，“投藥”可意謂著藉由許多方法之任何一種將一疫苗或治療傳遞至各別動物或人類，諸如皮內、皮下、肌肉內、鼻內、吸入、陰道、靜脈內、口服、頰、藉由吸入、鼻內、或在技藝中已知的任何其它。較佳實施例之詳細說明

[0042]在下列節中，描述出多種典型組成物及方法以詳細說明多個具體實例。將由熟習該項技術者明瞭，實行該多個具體實例不需要使用於本文所概述的全部或甚至某些細節，而是濃度、時間及其它細節可透過例行的實驗修改。在某些情況中，在說明中尚未包含熟知的方法或組分。

[0043]本發明的某些態樣包括但不限於投藥抗登革熱病毒之疫苗組成物。

[0044]本發明的具體實例普遍關於用以在個體中引發抗三或更多種登革熱病毒血清型的保護性中和抗體之方法及組成物。其它具體實例可包括經由在技藝中已知的任何方法將一疫苗組成物引進一個體，包括但不限於皮內、皮下、肌肉內、鼻內、吸入、口服、鼻內、陰道、靜脈內、攝食及任何其它方法，其中如此引進的疫苗組成物引發抗三或更多種登革熱病毒血清型的中和抗體。在某些具體實例中，該疫苗組成物包含一劑量投藥至一個體之抗三或更多種登革熱病毒血清型的疫苗。在其它具體實例中，該疫苗組成物包含初始劑量的抗全部四種登革熱血清型，然後，將一或多種其它疫苗組成物投藥至一個體。

[0045]本發明的其它態樣包括調節對皮內投藥至一個

體的抗登革熱病毒疫苗之免疫反應，與皮下比較。抗登革熱病毒疫苗可包括一包含預定比率之全部四種的活減毒登革熱疫苗病毒、重組的登革熱疫苗病毒、嵌合病毒或其突變體之組成物。多種登革熱血清型的比率可在表現上相等或幾乎相等；或某些血清型的濃度可表現出比其它高，端視在該個體中引發平衡的中和抗體反應之需求或能力而定。根據這些具體實例，不同登革熱疫苗比率可在任何二種血清型間差異2至100,000倍(例如，斑點形成單位)。此可依例如在調配物中所表現出的血清型數目、預定反應及想要的效應而定。經考量可使用任何登革熱疫苗病毒血清型調配物來產生一疫苗(例如，減毒病毒等等)，將其使用來連續投藥至需要其之個體，其中該組成物包括但不限於三或更多種登革熱病毒血清型。

[0046]在其它具體實例中，該登革熱病毒疫苗調配物之組成物可在一個體曝露至登革熱病毒前、期間或後引進至該個體。根據這些具體實例，一個體可接受多於一次連續投藥，或多於一次投藥包含登革熱病毒調配物，選擇性，在晚後時間接著一或多次額外投藥。描述於本文的調配物之皮內、皮下、肌肉內、鼻內、吸入、陰道、靜脈內、口服及任何其它施加方法可與任何其它抗病毒處理結合。在某些具體實例中，經考量於本文中考慮到的調配物之皮內、皮下、肌肉內引進可投藥至個體身體的任何適當區域(例如臂、肩部、臀部、鼻內等等)。此外，該疫苗調配物的非經腸式投藥可與其它投藥模式結合而連續投藥，諸如鼻

內、肺、口服、頰或陰道。在某些具體實例中，經考量在如描述於本文之連續投藥後，主要或補強投藥可在相同天、連續天、每週、每月、雙月或其它適當處理方案連續地發生。

[0047]登革熱在亞洲；中南美，包括哥倫比亞(Colombia)、加勒比(Caribbean)；太平洋島；及部分的非洲及澳洲流行。已估計36億人(世界人口的55%)活在登革熱病毒傳染(DVI)風險的區域。受登革熱病毒感染可產生一定範圍的症狀，從徵狀不顯的疾病至衰弱但是短暫的登革熱至生命脅迫性出血性登革熱(DHF)或登革熱休克症候群(DSS)。現在，對登革熱尚無治療性處理或預防性疫苗。鑒於登革熱對在流行國家中的人們及對至那些區域的旅行者之衝擊，需要防止登革熱的疫苗。

[0048]登革熱係一種蚊媒性病毒疾病，主要藉由蚊子，埃及黑斑蚊(*Aedes aegypti*)人傳人。登革熱病毒(DEN)包括一大約11kb的單股、正義RNA基因組。該基因組由三種結構性蛋白質，殼體(C)、原膜蛋白(prM)及包膜(E)；及七種非結構性蛋白，NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B及NS5組成。有四種不同登革熱病毒血清型，DEN-1、DEN-2、DEN-3及DEN-4。所提供的血清型之主要感染引發終身血清型特定免疫性。但是，抗其它三種登革熱病毒血清型無長時間交叉保護性免疫性，及隨後以另一種血清型感染導致增加更嚴重的疾病諸如DHF或DSS之機率。

[0049]由於與二次DENV感染相關的疾病提高，需要激

發抗多於一種及最高全部四種血清型DENV之免疫性的多價(例如，四價)疫苗。已證明數種藉由在細胞培養中標準連續傳代(serial passage)來減毒的DENV候選疫苗不安全或具有差的免疫性。嵌合、活的、經減毒的重組DENV候選疫苗在技藝中已知，包括以黃熱病17D(YF-17D)疫苗病毒之減毒基因背景為基底的病毒、DENV-2 PDK-53疫苗病毒、或包含30-核苷酸3'非編碼區(NCR)缺失的DENV-4。

[0050]在有效的活減毒登革熱病毒(DENV)疫苗之發展上，要挑戰的問題為當以四價調配物投藥時，在四種登革熱疫苗病毒間之干擾。當多價混合物的一或多種組分將引發比由各別的單價疫苗每種所引出的那些低之免疫反應時，干擾係表露。已經對用於疾病而具有多重致病血清型的疫苗，諸如脊髓灰質炎、登革熱或其它觀察到干擾。在某種程度上，由於此干擾，先前已發現需要三劑口服脊髓灰質炎疫苗的方案來對三種關鍵血清型引發足夠的免疫反應。活的減毒四價登革熱疫苗之歷史研究已顯示出當在包含其它血清型的多價調配物之背景下投藥時，當單獨投藥時引出最強的和抗體反應之DENV血清型趨向於支配該免疫反應。至於實施例，四種不同的活減毒登革熱疫苗之四價混合物顯示出對DEN-3組分的支配反應及對DEN-1、-2及-4的減低免疫反應(參見例如，Sabchareon等人，2002；Kitchener等人，2006)。由於此支配，四價混合物的臨床發展暫緩。同樣地，已經看見重組、活的減毒病毒之干擾。在登革熱/黃熱病嵌合體的四價混合物中之干擾已文件化

(Guy等人，2009。在登革熱疫苗血清型間之猴子模型干擾評估(Evaluation of Interferences between Dengue Vaccine Serotypes in a Monkey Model)。Am. J. Trop Med. Hyg. 80 : 3012-311)。在這些研究中，已發現在ChimeriVax疫苗株的四價調配物中二種血清型支配該反應。該干擾可藉由在分別的解剖位置中或在時間上相繼地投藥二種二價疫苗調配物，或藉由在一年後第三次投藥四價調配物而克服。類似地，已闡明四價重組疫苗株之改良的多價反應(於此情況中，包含DENV或嵌合的DENV與在3'非編碼區中的缺失之調配物)僅可能在第一及第二次投藥間獲得延長四個月間期。(Blaney等人，2005。在恆河猴中引發抗四種血清型每種之平衡、寬廣及保護性中和抗體反應之重組、活的減毒四價登革熱病毒疫苗調配物(Recombinant, Live-Attenuated Tetravalent Dengue Virus Vaccine Formulations Induce a Balanced, Broad, and Protective Neutralizing Antibody Response against Each of the Four Serotypes in Rhesus Monkeys)。J. Virology 79 : 5516-5528)。

[0051]成功的接種經常需要疫苗傳遞緊密地模仿自然感染。至今，登革熱候選疫苗的全部臨床試驗已使用SC途徑，使用針及注射器。登革熱感染的自然途徑係經由蚊子在真皮中傳染。已認為皮膚係作用為感染免疫屏障的免疫活性器官。高稠密網狀特化抗原呈現細胞(APCs，諸如蘭格漢氏(Langerhan`s)細胞及樹狀細胞)係存在於表皮中，及透過有效率的吸收及將抗原呈現至局部淋巴結來提供保護宿

主對抗感染性病原體。這些APCs次小組與常駐巨噬細胞二者一起已經顯示出係登革熱病毒感染的自然目標。鑒於表皮係富含免疫活性細胞的事實，於本文中已考慮到對登革熱病毒疫苗傳遞使用皮內途徑將偏愛對全部四種登革熱病毒血清型引發更有效力及平衡的免疫反應。特別是，在皮膚中呈現出病毒複製的天然宿主細胞之數目增加可減低干擾，及准許在四價調配物中較少支配性的病毒複製。在某些具體實例中，可使用多價、活的減毒登革熱疫苗之皮內免疫作用在一個體中對登革熱病毒曝露引發更平衡的免疫反應。

[0052]揭示於本文的某些具體實例關於DENVaxTM。DENVaxTM係一種登革熱疫苗，其由經設計以對四種登革熱血清型(DEN-1、DEN-2、DEN-3及DEN-4)產生免疫反應之四種重組登革熱病毒株的混合物組成。不欲由任何限制限制至特別的四價調配物，DENVaxTM，登革熱血清型2疫苗組分(DENVax-2)與減毒DEN-2 PDK-53株相應。此構築體已經在許多臨床研究中調查。其它登革熱疫苗株(DENVax-1、DENVax-3及DENVax-4)係由選殖進DEN-2 PDK-53非結構性基因骨架中的DEN-1、DEN-3或DEN-4結構性原膜蛋白(prM)及包膜(E)蛋白質基因組成之嵌合體。這些重組病毒表現出DEN-1、DEN-3或DEN-4的表面抗原，及保留該是DEN-2 PDK-53株減毒的原由之基因改變。在某些具體實例中，DENVaxTM可使用作為多價活的減毒登革熱疫苗之實施例，其具有在一種疫苗組成物中以多種比率表現出全部四

種登革熱病毒血清型。其它具體實例係關於最佳化四價疫苗投藥。更其它具體實例係關於DENVax™免疫方法。

[0053]在多價登革熱疫苗之皮內傳遞的探索進程期間，已發現在至少二個分別的解剖位置中投藥多於一劑的多價疫苗引發中和抗體反應，其係大約相等或優於藉由時間分隔來投藥多重劑量。再者，已發現多重位置投藥的利益係免疫途徑無關。

[0054]此研究結果係出乎意料。先前已揭示出與多重皮下投藥以經刪除、減毒及/或重組病毒為主的四價疫苗有關之資訊。已報導在第一次投藥後30天之四價投藥的第二次投藥未能達成增加中和抗體力價。比較上，在第一次後120天之第二次投藥改良對全部四種登革熱血清型之中和抗體力價。類似的資訊係報導在黃熱病/登革熱重組疫苗之臨床試驗(Poo等人，2011 Ped. Inf. Dis J. 30：1-9)中。亦建議在投藥間之三個月間期係產生抗多重登革熱病毒的中和抗體反應之次佳化。(Capeding等人，2011 Vaccine 29：3863-3872)。考慮二個臨床研究的這些報導建議需要較長的間期諸如6-9個月來產生較好的多價免疫反應。最近，在較早的人類激發免疫研究中，已報導野生型登革熱病毒引出廣泛的交叉反應性抗體，其在初始感染後持續最高6個月。這些資料支持短免疫方案對活減毒疫苗來說係次佳的概念：先前觀察之短暫交叉反應性抗體將有效地中和在多價調配物中之任何活的減毒疫苗組分。直到本揭示前，在較短的間期，在多於一個解剖位置處使用多價的活減毒疫苗

之免疫方案尚未被視為係需要此處理的個體之可實行的處理選擇。於此考量，多重位置投藥係藉由存取較大量抗原呈現細胞及/或多於一個引流淋巴結而准許對多價的活減毒疫苗之較少支配的組分之免疫反應，及有效地減低疫苗干擾。

[0055]在某些具體實例中，引進該個體的組成物包含抗全部登革熱病毒血清型(DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4)的疫苗。在其它具體實例中，於本文中考慮到的組成物可包括DENVax™或其它類似的調配物。在某些組成物中，抗全部登革熱血清型的疫苗病毒在該組成物中係相等比例。在更其它組成物中，每種登革熱疫苗病毒血清型可彼此呈特別的比率，如此引進該組成物提供該個體具有足夠抗全部登革熱病毒(例如，DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4)的中和抗體程度。

[0056]在某些具體實例中，用於登革熱病毒疫苗之雙重投藥的疫苗組成物可包括在單一組成物中一包含多於一種嵌合登革熱病毒的組成物。在某些組成物中，在此組成物中所使用的嵌合構築體系由登革熱-登革熱血清型組成，諸如在登革熱-2骨架上的登革熱-1、登革熱-3及/或登革熱-4。根據這些具體實例，一單一疫苗組成物可包括活的減毒登革熱病毒，其在接受此組成物的個體中引發至少三種及最高全部四種登革熱病毒血清型的免疫反應。於本文中考慮到的構築體包括活的減毒登革熱病毒，包括一或多種活的減毒登革熱病毒及一或多種登革熱-登革熱嵌合病毒，更包

括在單一構築體中減毒的登革熱病毒之殼體及非結構性蛋白與至少第二種登革熱病毒的原膜蛋白及包膜蛋白。在某些具體實例中，該殼體及非結構性蛋白係來自減毒的登革熱-1、登革熱-2、登革熱-3或登革熱-4病毒。在其它具體實例中，當該經減毒的登革熱病毒係登革熱-1時，該至少第二種登革熱病毒的原膜蛋白及包膜蛋白係登革熱-2、登革熱-3或登革熱-4；或當該經減毒的登革熱病毒係登革熱-2時，其係登革熱-1、登革熱-3或登革熱-4；或當該經減毒的登革熱病毒係登革熱-3時，其係登革熱-1、登革熱-2或登革熱-4；或當該經減毒的登革熱病毒係登革熱-4時，其係登革熱-1、登革熱-2或登革熱-3。再者，該登革熱-登革熱嵌合病毒可包括減毒的登革熱-2病毒之殼體及非結構性蛋白，及該原膜蛋白及包膜蛋白係登革熱-1、登革熱-3或登革熱-4。

[0057] 其它具體實例包括活的減毒病毒，其中該活的減毒病毒之骨架係登革熱-2。再者，該登革熱-2可包括任何登革熱-2株。在某些活的減毒登革熱-2病毒中，該登革熱-2包含PDK-53株。在另一個具體實例中，該嵌合體係一種核酸嵌合體，其包括譯出來自減毒的登革熱-2病毒之非結構性蛋白的第一核苷酸序列，與譯出來自第二黃熱病病毒的結構性蛋白質之第二核苷酸序列。在另一個具體實例中，該結構性蛋白質可係黃熱病病毒的C、prM或E蛋白質。可從其選擇出結構性蛋白質的黃熱病病毒之實施例包括但不限於登革熱-1病毒、登革熱-2病毒、登革熱-3病毒、登革熱-4病毒、西尼羅河熱病毒、日本腦炎病毒、聖路易斯腦炎

病毒、黃熱病病毒及蜱媒腦炎病毒。在進一步具體實例中，該結構性蛋白質可選自於與黃熱病病毒緊密相關的非黃熱病病毒物種，諸如肝炎C病毒。

[0058]在某些具體實例中，可存在有在該非結構性蛋白中的胺基酸取代突變及在該5'非編碼區中的核苷酸取代突變。此核苷酸取代突變發生在保存於全部四種登革熱血清型中之莖環結構的莖幹中。特別是，在NS1-53處的單一突變、在NS1-53處及在5'NC-57處的雙重突變、在NS1-53處與在NS3-250處的雙重突變、及在NS1-53處、在5'NC-57處與在NS3-250處的三重突變可提供揭示於本文之減毒的DEN-2病毒。

[0059]經考量在這些基因座處包含非保守性胺基酸取代的任何登革熱-2病毒之基因組可使用在描述於本文的無毒嵌合體中作為骨架。再者，在胺基酸序列或核苷酸序列排列及莖幹結構分析後，在相同基因座處包含類似的突變之其它黃熱病病毒基因組亦可使用作為骨架結構，及於本文中係定義為與登革熱-2 PDK-53基因組之減毒的突變相等。該骨架、該嵌合體之區域包括5'及3'非編碼區與譯出非結構性蛋白的區域亦可包括進一步突變，以維持該無毒表現型的穩定性及減低該無毒病毒或嵌合體可回復回致命的野生型病毒之可能性。例如，若必要時，在該莖幹/環狀結構的莖幹中於5'非編碼區中的第二突變可提供額外的穩定性。

[0060]在其它具體實例中，除了特別描述於本文中的那

些外，該嵌合病毒可在其結構及非結構性蛋白中包括核苷酸及胺基酸取代、缺失或插入。揭示於本文的結構及非結構性蛋白經了解包括任何蛋白質，包括該完全蛋白質或譯出其序列的任何基因、該蛋白質的抗原決定區、或包含例如其二或更多個胺基酸殘基之任何斷片。揭示於本文的具體實例提供一種用以製得描述於本文的具體實例之嵌合病毒的方法，其係使用重組技術，將所需要的取代插入適當骨架基因組中。

[0061]在其它具體實例中，該組成物可包括一醫藥可接受的載體及減毒的嵌合病毒，其包括來自其它登革熱病毒血清型、其它黃熱病病毒物種或其它緊密相關物種，諸如肝炎C病毒之胺基酸序列。包含來自其它登革熱病毒血清型、其它黃熱病病毒物種或其它緊密相關物種的胺基酸序列之蛋白質或多胜肽可作用為免疫原，因此，使用來引發抗其它登革熱病毒血清型、其它黃熱病病毒物種或其它緊密相關物種的免疫性反應。

[0062]在一個具體實例中，考慮到使用包含來自減毒的登革熱-2病毒的核苷酸序列及來自第二種登革熱病毒(或其它黃熱病病毒)的核苷酸序列之核酸嵌合體，在第0日時雙重投藥，其中來自該第二黃熱病病毒的核苷酸序列引導黃熱病病毒抗原之合成。在本發明的另一個態樣中，考慮到包含三或更多種登革熱病毒血清型之疫苗組成物。

[0063]在另一個態樣中，一種使用重組技術來製造免疫性或疫苗組成物的方法，其係藉由將所需要的取代插入適

當的黃熱病病毒基因組中。本發明的另一個目標為提供一種用以授予抗三或更多種登革熱病毒血清型的免疫性之組成物及方法，其在不同解剖學區域中同時使用雙重投藥來引發接受此方案的個體之其它淋巴結。

[0064]本發明的另一個目標為提供使用於一些快速基因測試之任何的核酸探針及引子，其中該測試係用於本發明的疫苗病毒每種之診斷。本發明的此目標之具體化可係聚合酶連鎖反應試驗、雜交試驗或由技藝已知的其它核酸序列偵測技術。一個具體實例包括使用自動化PCR基底的核酸偵測系統。

[0065]在其它具體實例中，可將多種突變引進該嵌合登革熱病毒以進一步減毒該嵌合病毒或改良致免疫性。在某些具體實例中，該組成物可包括能引出對全部四種登革熱病毒血清型的免疫反應之嵌合的登革熱病毒，其中在一個體的二個解剖位置中引進單一組成物。某些具體實例關於短時間遊覽登革熱流行國家之標的人群，諸如旅遊者。

[0066]揭示於本文的某些具體實例係關於一種在個體中快速引發保護對抗全部登革熱病毒血清型之方法及組成物，其藉由例如在相同天時，在多於一個解剖位置中連續地將疫苗投藥至一個體抗全部登革熱病毒血清型。某些具體實例可包括經由皮內(ID)或皮下(SC)注射或其它投藥模式，在一個解剖位置處將一疫苗組成物引進一個體；然後，藉由ID、SC或其它投藥模式，在另一個解剖位置處引進至少第二疫苗組成物。某些具體實例包括使用任何投藥模式

之組合將全部登革熱病毒血清型的登革熱病毒疫苗引進一個體，其中該疫苗之投藥至該個體係在第0天時發生於二或更多個解剖位置處，或藉由二或更多種不同途徑。某些具體實例包括使用相同投藥模式但是在不同解剖位置處。

[0067]描述於本文的某些登革熱病毒疫苗組成物其在該組成物中的每種血清型之劑量範圍係 10^2 至 5×10^6 PFU。於本文中考慮到的其它組成物(例如，後續疫苗接種)包括在主要免疫後具有少於或多於此範圍的劑量之組成物，以在該個體中的免疫反應為基準。在某些具體實例中，多種登革熱疫苗病毒血清型之比率可依個體的需求及免疫反應而變化。

[0068]在某些具體實例中，在第一次接種時或在任何後續接種中引進之於本文考慮到的組成物可包括四價登革熱病毒組成物。根據這些具體實例，該組成物可包括DENVax™或等於或等效比率或在預定血清型比率下之其它類似的四價調配物。其它具體實例可包括在主要接種或任何後續疫苗接種(例如，少於30天後)時，所投藥的每種疫苗組成物係使用不同調配物(例如，血清型比率)。

[0069]於本文中的某些具體實例包括在第0天時，於二或更多個解剖位置處處理需要此疫苗的個體，然後在30天內諸如約7、約14、約21或約28天後，以可或可不具有全部血清型之包含登革熱病毒血清型的組成物投藥至少第二疫苗。在某些具體實例中，每次接種皆具有全部登革熱病毒血清型呈現在該疫苗調配物中。對該隨後投藥來說，揭示於本文的後續投藥之疫苗組成物可包括預定比率的二或更

多種登革熱病毒血清型。

[0070]在某些具體實例中，引進該個體的組成物包含全部登革熱病毒血清型。在某些具體實例中，該疫苗組成物包含DENVaxTM的多種調配物或其它類似調配物。在某些疫苗組成物中，DEN-1：DEN-2：DEN-3：DEN-4之比率可係3：3：3：3、4：3：4：5、5：4：5：5、5：4：5：5、5：5：5：5、5：5：5：5；10、10：1：10：100或其它比率，其中在單一組成物中，於2種血清型間之比率可有約2至約100,000倍差異(例如，DENVax_{4：3：4：5}TM等等)。在某些具體實例中，一登革熱血清型比率可係DEN-1在 2×10^4 處：DEN-2在 5×10^4 處：DEN-3在 1×10^5 處：DEN-4在 3×10^5 PFUs處；或DEN-1在 8×10^3 處：DEN-2在 5×10^3 處：DEN-3在 1×10^4 處：DEN-4在 2×10^5 PFUs處。在某些組成物中，全部登革熱疫苗病毒血清型在該組成物中係相等比例。在更其它組成物中，每種登革熱疫苗病毒血清型可與另一種血清型呈特別比率，如此引進該組成物提供該個體具有足夠或多於足夠的中和抗體程度，其授予保護對抗全部登革熱病毒(例如，登革熱1、2、3及4)。例如，若在第0天時，在二或更多個解剖位置處接受二或更多次連續疫苗接種後，該個體對一或多種特別的登革熱病毒血清型具有較低的保護時，則對該個體之補強注射可包括增加該一或多種登革熱疫苗病毒血清型(其闡明較低的中和抗體)之濃度，以提供較好保護對抗全部登革熱病毒型式。根據這些具體實例，可使用在技藝中已知的標準方法對來自一個體的樣品分析登革熱血清

型感染(例如，登革熱-1、-2、-3、-4)之免疫反應。

[0071]在某些具體實例中，該疫苗組成物可在多重解剖位置中同時或連續地皮內引進至一個體，以例如保護對抗全部登革熱血清型(例如，交叉保護)。在某些具體實例中，該疫苗組成物可包括但不限於全部登革熱疫苗病毒血清型之單一調配物(例如，DENVax™)，將其投藥至一個體能提供最大保護對抗全部登革熱病毒血清型之感染。在其它具體實例中，一疫苗組成物可包括減毒的登革熱病毒血清型與其它抗病原的組成物(例如，日本腦炎、西尼羅河熱、流行性感冒等等)之組合。於本文中考慮到的組成物可藉由在技藝中已知的任何方法投藥，包括但不限於皮內、皮下、肌肉內、鼻內、吸入、陰道、靜脈內、攝食及任何其它方法。在二或更多個解剖位置中引進可包括任何投藥組合，包括在二或更多個解剖位置中藉由相同模式；或藉由二種不同模式，其包括二個分別的解剖位置。根據這些具體實例，該二或更多個解剖位置可包括不同腳。

[0072]例如，若一個體在第0日時於二或更多個解剖位置處接受二或更多次連續疫苗接種後，及該個體對一或多種特別的登革熱病毒血清型不引發差的中和抗體程度時，則對該個體之補強接種可包括增加該一或多種登革熱疫苗病毒血清型(其闡明較低程度的中和抗體)的濃度，以提供完全保護對抗全部登革熱病毒型式之感染。根據這些具體實例，可使用在技藝中已知的標準方法分析來自一個體的樣品對登革熱感染之抗性。

[0073]在某些具體實例中，可在第0天時，將該疫苗組成物的劑量在多重解剖位置處連續引進至一個體，以例如保護對抗全部登革熱血清型(例如，交叉保護)。在某些具體實例中，該疫苗組成物可包括但不限於三或四種登革熱病毒血清型之單一組成物(例如，DENVax™)，將其投藥至一個體能引發中和抗體至將提供最大保護程度對抗全部登革熱病毒血清型之感染。因此，特別的個體可需要僅臨床就診一次而接受足夠保護以遊覽或留在具有登革熱病毒的區域中一預定時間(例如，30天)。在其它具體實例中，該疫苗組成物可包括減毒的登革熱病毒血清型與抗其它病原體(例如黃熱病病毒，諸如日本腦炎、西尼羅河熱；或其它病毒，諸如流行性感冒等等)之疫苗組成物的組合。於本文中考慮到的組成物可藉由在技藝中已知的任何方法投藥，包括但不限於皮內、皮下、肌肉內、鼻內、吸入、陰道、靜脈內、攝食及任何其它方法。在二或更多個解剖位置中引進可包括任何投藥組合，包括藉由相同模式在二或更多個解剖位置中；或藉由二或更多種不同模式，其包括二或更多個分別的解剖位置。根據這些具體實例，該二或更多個解剖位置可包括不同腳、不同組織、鼻內、如為滴劑(例如用於眼睛)、肌肉內在二或更多個場所中。

[0074]在某些具體實例中，揭示於本文的疫苗組成物可係一嵌合構築體，其可包括一在用以投藥至一個體的疫苗組成物中構成至少3種登革熱血清型之構築體的混合物。在其它具體實例中，該登革熱病毒疫苗可包括具有減毒的黃

熱病病毒骨架之構築體，其具有表現出四種血清型每種之多種登革熱血清型取代，其中該等構築體可混合在一組成物中用以作為疫苗投藥。

[0075]於本文中考慮到及描述的嵌合體可藉由使用已由熟知此技藝之人士所熟知的重組工程技術來移除相應的結構基因及以想要的結構基因置換其，將一或多種黃熱病病毒之結構性蛋白質基因剪接進一登革熱病毒基因組骨架(例如，PDK-53)或其如上所述的同等物中而製造，其中抗該黃熱病病毒之免疫性係想要的。再者，使用在序列表列中所提供的序列，可使用已知的核酸合成技術來合成譯出黃熱病病毒蛋白質的核酸分子及將其嵌入適當載體中。因此，使用由熟習該項技術者已知的重組工程技術來製造無毒的免疫性病毒。

[0076]如上述提及，欲嵌入該骨架中的基因譯出一黃熱病病毒(例如，其它登革熱病毒血清型)結構性蛋白質。較佳的是，欲嵌入的黃熱病病毒基因係一譯出C蛋白質、PrM蛋白質及/或E蛋白質的基因。嵌入該登革熱-2骨架中的序列可譯出PrM及E結構性蛋白質二者。嵌入該登革熱-2骨架中的序列可譯出C、prM及E結構性蛋白質。該登革熱病毒骨架係該PDK-53登革熱-2病毒基因組，及包括該譯出登革熱-1的C、prM及/或E結構性蛋白質之接合的基因(DEN-2/1)、該譯出登革熱-3的PrM及/或E結構性蛋白質之接合的基因(DEN-2/3)、或該譯出登革熱-4的PrM及/或E結構性蛋白質之接合的基因(DEN-2/4)。在一個具體實例中，該譯出登革

熱-3病毒的結構性蛋白質之接合的基因指導在胺基酸位置345處包含白胺酸的E蛋白質之合成。

[0077]在另一個具體實例中，一譯出該登革熱-2病毒的C結構性蛋白質之嵌合體指導在胺基酸位置100處包含絲胺酸的C蛋白質之合成，及其包含一譯出該登革熱-4的結構性蛋白質之接合的基因，其指導在胺基酸位置447處包含白胺酸的E蛋白質之合成。

[0078]在更其它具體實例中，一嵌合體可譯出該登革熱-2病毒的C結構性蛋白質及指導在胺基酸位置100處包含絲胺酸的C蛋白質之合成，及其包括一譯出該登革熱-4的結構性蛋白質之接合的基因，其指導在胺基酸位置447處包含白胺酸及在胺基酸位置364處包含纈胺酸的E蛋白質之合成。描述於本文的結構性蛋白質可呈現在本發明的病毒嵌合體中，如為僅有黃熱病病毒結構性蛋白質或黃熱病病毒結構性蛋白質的任何組合。

[0079]該嵌合體可藉由重組來自DEN-2 16681野生型式病毒與任一種PDK-53登革熱-2病毒變體二者之全基因組長度cDNA選殖物來操縱。未選殖的PDK-53疫苗包括二種基因型變體的混合物，於本文中標明為PDK53-E及PDK53-V。該PDK53-V變體包括全部九種PDK-53疫苗特定的核苷酸突變，包括在胺基酸位置NS3-250處之Glu至Val突變。該PDK53-E變體包括PDK-53疫苗的九種突變之八種及該親代16681病毒的NS3-250-Glu。感染性cDNA選殖物係對二者變體建構，及來自二者選殖物的病毒係在老鼠中減

毒。該DEN-2 PDK-53病毒的減毒之顯型標誌包括小斑點尺寸、溫度敏感度(特別在LLC-MK.sub.2細胞中)、有限的複製(特別在C6/36細胞中)、對新生老鼠減毒(特別是，失去對未斷奶的老鼠之神經毒性)及在猴中減少病毒血症發生率。有用作為候選疫苗的嵌合體係在二種DEN-2 PDK-53變體的基因背景中建構，其全部包括在該基因組的非結構性區域中之突變，包括在5'非編碼區中的5'NC-57 C至T(16681-至-PDK-53)；和在該非結構性蛋白的胺基酸序列中之突變，諸如例如，NS1-53 Gly-至-Asp及NS3-250 Glu至Val。

[0080]可藉由前述的減毒性顯型標誌之篩選而指示出無毒性及藉由致免疫性之篩選來評估，包括譯出其它黃熱病病毒或登革熱病毒血清型的結構性蛋白質之核苷酸序列之合適的嵌合病毒或核酸嵌合體其作為疫苗的實用性。可使用由熟習該項技術者已知的例行篩選程序，使用與黃熱病病毒抗體或免疫反應性血清的試管內或活體內反應性來評估抗原性及致免疫性。

黃熱病病毒疫苗

[0081]在某些具體實例中，嵌合病毒及核酸嵌合體提供有用作為免疫原或疫苗之活的減毒病毒。這些嵌合體具有高致免疫性同時產生無危險的病原或致死效應。

[0082]有效接種抗全部登革熱病毒株疫苗已經係困難。為了防止在僅接種抗一種登革熱病毒血清型疫苗之個體中可能發生DHF/DSS，需要使用三價或四價登革熱病毒

疫苗的快速免疫來對全部四種血清型病毒同時提供免疫性。四價疫苗係藉由在合適作為多價疫苗投藥的醫藥載劑中，結合登革熱-2 PDK-53與上述的登革熱-2/1、登革熱-2/3及登革熱-2/4嵌合體而製造。

[0083]該嵌合病毒或核酸嵌合體可在一致命或減毒的DEN-2病毒骨架中包括野生型或減毒型病毒的結構基因。例如，該嵌合體可在任一種DEN-2 PDK-53背景中表現出野生型DEN-1 16007病毒或其候選PDK-13疫苗衍生物的結構性蛋白質基因。

[0084]該四價調配物例如DENVax™可藉由混合預定量的每種單價疫苗組分來製備。根據每種疫苗組分的輸入力價，可加入所定義的單價疫苗體積至疫苗調配物的最後體積0.1毫升(例如用於皮內)或0.5毫升(例如用於皮下)。該四價DENVax™疫苗的剩餘體積可由在鹽液緩衝液中包含漏蘆糖(15%)、F127(1%)及人類血清白蛋白(0.1%)之稀釋劑組成，以安定該活的減毒疫苗調配物。在某些具體實例中，可在單一組成物中呈現預定比率之至少三種登革熱病毒血清型。例如，可在單一組成物中呈現出登革熱-1至登革熱-4構築體，其中一種活的減毒病毒血清型可呈現出更多，與其它構築體比較。例如，登革熱-4的PFU可高於其它登革熱病毒數倍，因為其可闡明一減低的反應。

方法

核酸放大

[0085]核酸可使用在任何調配物中或使用來產生於本

文中考慮到的任何調配物。該使用作為模板用於放大的核酸序列可係根據標準方法分離的病毒(例如，登革熱病毒)。該核酸序列可係基因組DNA或部分或全細胞RNA。若使用RNA時，可想要將RNA轉換成互補的cDNA。在某些具體實例中，該RNA係全細胞RNA及直接使用作為模板用於放大。已考慮到任何在技藝中已知用於放大核酸分子的方法(例如，PCR、LCR、Qbeta複製酶等等)。

表現蛋白質或胜肽

[0086]基因可在任何數目的不同重組DNA表現系統中表現，以產生大量多胜肽產物，其然後可經純化及使用在於本文中報導的方法及組成物中。已考慮到在技藝中已知用來產生及使用構築體的任何方法。在某些具體實例中，可藉由在技藝中已知的標準選殖或次選殖技術將譯出一或多種多胜肽的基因或基因斷片嵌入一表現載體中。

[0087]可藉由在技藝中已知的任何方法來偵測或分析蛋白質、胜肽及/或抗體或其斷片。在某些具體實例中，可使用諸如凝膠電泳或管柱層析法之方法來分離及分析分子。

電泳

[0088]可使用電泳，根據其尺寸及電荷來分離分子(例如，大分子，諸如蛋白質或核酸)。電泳的許多變化在技藝中已知。分子移動通過的溶液可係隨意，通常在毛細管中或其可埋入在技藝中已知的基質或其它材料中。常見的基質可包括但不限於聚丙烯醯胺凝膠、瓊脂糖凝膠、質譜、墨點及濾紙。

[0089]某些具體實例使用一譯出多胜肽的基因或基因斷片，其可藉由標準次選殖技術嵌入一表現載體中。可使用一表現載體，其產生該重組多胜肽如為融合蛋白質，允許快速親和性純化一胜肽或蛋白質。此融合蛋白質表現系統的實施例有麩胱甘肽 S-轉換酶系統(Pharmacia，Piscataway，NJ)、麥芽糖結合蛋白質系統(NEB，Beverley，MA)、FLAG系統(ABI，New Haven，CT)、及 6xHis系統(Qiagen，Chatsworth，CA)。

醫藥調配物

[0090]於本文中考慮到在技藝中已知用於疫苗的任何醫藥調配物。在某些具體實例中，該調配物可包括在單一疫苗中呈多種比率的一或多種登革熱病毒血清型。經考量該調配物可包括使用於一個體之接種的其它藥劑，包括但不限於由熟知技藝之人士已知的其它活性或非活性成份或組成物。

[0091]於本文中考慮到的全部疫苗病毒可以疫苗組成物形式投藥，其中該組成物可藉由熟知技藝之人士已知的任何方法製備。在某些具體實例中，該病毒組成物經冷凍乾燥及與一醫藥可接受的賦形劑(例如，水、磷酸鹽緩衝鹽液(PBS)、潤溼劑等等)混合。在其它具體實例中，該疫苗組成物可包括安定劑，其已知減低該調配物變質及延長該組成物的閑置壽命。

[0092]在其它具體實例中，可將佐藥加入至該組成物以對描述於本文的接種投藥引發、增加、刺激或補強一細胞或體液的免疫反應。已考慮到在技藝中已知與揭示於本文

的組成物相容之任何佐藥。

[0093]某些具體實例於此關於四價登革熱病毒組成物之投藥的量或劑量或體積，及該量或劑量可依投藥途徑及諸如取得該疫苗的個體之其它規格(例如，年齡、健康狀態、體重等等)而定。

[0094]經考量可將於本文中描述的組成物投藥至活在具有登革熱病毒的區域中之個體、旅遊至具有登革熱病毒的區域之個體、或其它個體諸如會得到登革熱或其它登革熱病毒症狀的任何人類或動物。在某些具體實例中，可推薦旅遊至具有登革熱病毒的區域之個體在登革熱病毒曝露前之約1至約3個月投藥一或多種疫苗組成物(例如，在第0天時二或更多種)。於本文中的疫苗可作為預防性處理投藥，以防止成年人及小孩感染。關於曝露至揭示於本文的登革熱病毒及疫苗方案，該個體可係初試或非初試個體。

套組

[0095]其它具體實例關於使用描述於本文的方法(例如，疫苗的應用或投藥方法)及組成物之套組。某些具體實例關於使用具有疫苗組成物的套組來防止或處理已曝露或被懷疑曝露至一或多種登革熱病毒的個體。在某些具體實例中，該套組可包括一種或多於一種呈預定比率的登革熱病毒血清型調配物(例如，減毒的疫苗，三價或四價調配物，DENVax™)。該套組可係可攜帶，例如，能夠被運送及使用在登革熱流行區域的遙遠區域，諸如軍事設施或遙遠的村莊。其它套組可使用在健康設備中，以處理已曝露

至一或多種登革熱病毒或被懷疑係在曝露至登革熱病毒風險下的個體。

[0096]該套組亦可包括合適的容納器，例如，容器、小玻瓶、管筒、迷你或微量離心管、測試管、燒瓶、瓶子、注射器或其它容器。若提供額外的組分或藥劑時，該套組可包括一或多個額外的容納器，於其中可放置此藥劑或組分。於本文的套組典型亦將包括一呈緊密侷限用於商業出售之用以包含該藥劑(例如容器)、組成物及任何其它藥劑容納器的工具。此容納器可包括於其中保留想要的小玻瓶之注射或吹模成形的塑膠容納器。所描述的組成物可選擇性需要一或多種額外的藥劑，諸如免疫性藥劑或其它抗病毒劑、抗黴菌或抗菌劑，例如，該組成物使用作為抗一或多種額外微生物之疫苗。

[0097]在其它具體實例中，該套組可包括用以將一或多種疫苗投藥至一個體的裝置，諸如ID、SQ、IM、吸入器、鼻內塗抹器或用以投藥揭示於本文的疫苗組成物之其它裝置。

[0098]包括下列實施例以闡明顯現於本文的某些具體實例。應該要由熟習該項技術者察知，在下列實施例中所揭示的技術表示所發現的技術在揭示於本文的實行中良好地作用。但是，按照本揭示，熟習該項技術者應該察知可在所揭示的某些具體實例中製得許多改變及仍然獲得相似或類似的結果而沒有離開於本文的精神及範圍。

實施例

實施例1

[0099] 先前研究顯露出每種DENV(登革熱病毒)血清型的自然感染導致永續免受由同源的血清型造成之登革熱。在某些具體實例中，有效的登革熱疫苗投藥緊密地模仿自然感染及可提供作為抗登革熱病毒疫苗的投藥模式。於本文中所報導的具體實例可關於登革熱病毒(DENV)感染的自然感染途徑，類似於由運送宿主的皮內傳遞，蚊子咬。在某些具體實例中，可使用皮內注射以將疫苗病毒寄存進相同組織中。皮膚係一種高度易進入的器官及顯示出有效的免疫屏障，此主要歸因於駐在表皮中的蘭格漢氏細胞(LCs)之存在。皮膚免疫引出寬廣的免疫反應範圍，包括體液、細胞及黏膜；及在投藥的疫苗之致免疫性上，具有繞過預存在的免疫性之效應的潛力。

[0100] 已報導出在需要此處理的個體中皮內(ID)投藥四價登革熱疫苗之某些具體實例。皮內投藥的一個典型方法係在四隻食蟹獼猴(*Cynomolgus macaques*)上進行，其藉由皮內投藥來投藥一DENVax™((DENVax-1： 1×10^5 PFU、DENVax-2： 1×10^5 PFU、DENVax3： 1×10^5 PFU、DENVax4： 1×10^5 PFU)登革熱病毒疫苗)。為了達成相等的病毒劑量，使用無針噴射注射器，在三個緊密間隔開的位置中ID寄存0.15毫升疫苗(參見下列圖1及2)。圖1顯示出使用於皮內接種的皮內注射裝置(例如，PharmaJet®或其它皮內裝置)。

[0101] 圖2闡明在食蟹獼猴上，以PharmaJet裝置接種後之預防接種位置。60天後，該等動物以相同調配物藉由相

同途徑追加。在第15、30、58、74及91天的預定間期處收集血清樣品，及測試直接抗四種登革熱血清型的中和抗體之存在。在血清樣品上進行PRNT(斑點減少中和試驗，在技藝中已知用於定量抗DEN中和抗體的程度)。

[0102]已闡明在主要投藥後或在二次投藥後，該中和抗體力價在ID投藥後明顯較高，如與SC投藥比較(對DENV-1及DENV-2來說， $p<0.05$)(參見圖3)；(對全部DENV血清型來說， $p<0.05$)(參見圖4)。因為該位置係在相同區域中緊密地間隔開，且每次接種由全部四種病毒組成，此疫苗傳遞模式緊密地類似DENVax™的單一投藥。圖3闡明在第58天時之50%PRNT(斑點減少中和力價)幾何平均力價(在主要投藥後58天)。圖4闡明在第74天時(在第60天時之二次投藥後14天)的50%PRNT幾何平均力價。如可在圖形中看見，對全部四種登革熱病毒之中和抗體力價來說，在皮內投藥後係較高，比對皮下投藥。此外，闡明中和抗體反應的動物數目(“血清抗體轉換”定義為PRNT>10)在第一劑疫苗後係較大(參見表1，其顯示出在主要及二次免疫後，血清抗體轉換成四種登革熱血清型每種之動物百分比)。

[0103] 表1：非人類靈長類動物在登革熱免疫後之血清抗體轉換

DENVax調配物	血清抗體轉換%							
	DEN-1		DEN-2		DEN-3		DEN-4	
	主要	追加	主要	追加	主要	追加	主要	追加
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%

[0104]以野生型登革熱病毒激發免疫來測試該經免疫的動物之對抗保護性。在食蟹獼猴中，野生型登革熱病毒感染導致病毒複製及病毒血症，但是無臨床跡象。在第91天時，二隻猴子以DENV-1(登革熱病毒血清型1)激發免疫及二隻猴子以DEN-2(登革熱病毒血清型2)激發免疫。在激發免疫後，每日收集血清樣品11天。藉由定量型即時聚合酶連鎖反應技術(q-rPCR)測量在樣品中之登革熱病毒RNA的程度，及藉由病毒分離及在Vero細胞上之斑點形成來測量可存活的病毒力價。結果顯示在表2及3中。在第91天時，僅在激發免疫前(“預激發免疫”)及第105天時，在激發免疫後(“後”)14天的抗DEN-1中和抗體。病毒血症係以可從血液樣品分離出活DEN-1病毒的天數(“週期”)及從每隻動物分離出的波峰力價之log10提供。病毒RNA係以可在血清樣品中偵測到病毒RNA的天數(“週期”)及在每隻猴子中的波峰病毒RNA程度提供，以所偵測的病毒RNA基因組數目之log10表示。

表2：在以DEN-1激發免疫後之反應

猴子	調配物	DEN-1 PRNT		病毒血症		病毒RNA	
		預激發免疫	後	週期	波峰	週期	波峰
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	對照	1	2560	6	2.0	9	5.7
CY0193	對照	25	2560	3	2.7	7	6.4
CY0058	對照	1	640	5	2.9	7	5.5
CY0073	對照	1	1280	5	3.6	10	6.2

表3：在以DEN-2激發免疫後之反應

猴子	調配物	DEN-1 PRNT		病毒血症		病毒RNA	
		預激發免疫	後	週期	波峰	週期	波峰
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
CY0061	對照	6	10240	6	2.3	8	5.1
CY0193	對照	1	3840	5	1.8	9	4.7
CY0058	對照	1	10240	5	2.9	8	5.8
CY0073	對照	1	10240	4	2.4	8	5.7

[0105]在激發免疫後，該經SC及ID免疫的動物完全免受DEN-1或DEN-2所引發的病毒血症(與闡明出明顯長週期的病毒血症之對照動物比較)。在全部經ID免疫的動物，但非全部經SC免疫的動物中，在激發免疫後亦缺乏病毒RNA複製及缺乏抗體力價增加(比較ID動物與SC注射的CY0181、CY0172或對照動物)。這些資料建議該保護係“無菌”及防止在激發免疫後任何病毒複製。

實施例2

[0106]在另一個實施例中，將於非人類靈長動物中測試在不同場所與不同時間下輸送之最佳化的DENVaxTM調配物。八隻食蟹獼猴的群組將以各別包含 1×10^5 斑點形成單元(PFU)、 1×10^4 PFU、 1×10^5 PFU及 1×10^5 PFU之DENVaxTM-1、DENVaxTM-2、DENVaxTM-3及DENVaxTM-4(縮寫為5 : 4 : 5 : 5)的DENVaxTM調配物免疫。二劑將以0.1毫升ID投藥。該等組將以在第0天時於每臂中一劑；在第0天時於一臂中一

劑，及在第7天時於其它臂中一劑；或在第0天時於一臂中一劑，及在第60天時於其它臂中一劑之任一種來免疫。這些群組將與在第0天時於三個位置處接受相同劑量(5：4：5：5)及在第60天時以相同於其它臂的三個位置處之群組；和在第0天時於一臂中及在第60天時於其它臂中以單一0.5毫升SC免疫接受相同劑量之群組比較。對照組將僅以疫苗賦形劑(無疫苗病毒)免疫。在免疫後，將於第0、7(對波峰病毒血症)、15、30、60及90天時收集血液樣品，以藉由PRNT50測試抗四種登革熱病毒血清型的中和抗體。在第30、60、90天時所收集的PBMCs將亦藉由ELISPOT試驗來監視IFN- γ 分泌物。在第90天時，來自每組的二隻動物將以野生型DEN-1、DEN-2、DEN-3或DEN-4病毒激發免疫。將監視經激發免疫的動物之臨床跡象及溫度(每日兩次)、在食物消耗(每日一次)及體重(每週)上的改變。此外，激發免疫後11天，全部動物將每日抽血以監視病毒血症及血液學參數。再次，將評估在激發免疫90天後對全部四種DEN病毒之PRNT反應及保護的速度及週期。咸信在多重位置及在可區別的解剖位置中皮內投藥可比以單一大量推注(bolus)的皮下投藥更有效。多重位置可提供疫苗曝露至更多抗原呈現細胞。可區別的解剖位置可准許疫苗進入多重淋巴結。此外，僅有在老鼠、靈長類動物及人類臨床試驗中發展出抗體反應三十天或較長後，投藥登革熱疫苗的補強免疫。此時，中和抗體抑制對該活病毒疫苗的反應。先前已顯示出靈長類動物在主要免疫後一個月追加比在主要免疫後四

個月給藥較不有效。已推測在初始免疫後循環之高程度同源及異種抗體可在第二劑量中抑制病毒複製。雖然延長(二個月或較長)的免疫可規避此抑制，在有效力的中和抗體反應之發展可係優良前，尚未測試較短的免疫間期是否加速免疫方案。此縮短的方案在流行國家或對旅行者可係優點，其中在該等免疫中間曝露至登革熱病毒可讓其處於疾病風險。

實施例3

[0107]在另一個實施例中，已經開始人類臨床試驗，以0.1毫升藉由ID或SC注射投藥二種DENVax™調配物來研究安全性及致免疫性。12個個體的群組將在第0及90天時以例如低劑量DENVax™調配物(各別為 8×10^3 PFU、 5×10^3 PFU、 1×10^4 PFU及 2×10^5 PFU的DENVax™-1、-2、-3及-4)或高劑量(2×10^4 PFU、 5×10^4 PFU、 1×10^5 PFU及 3×10^5 PFU各別為DENVax™-1、-2、-3及-4)DENVax™ ID或SC免疫。二個對照組將SC或ID注射磷酸鹽緩衝鹽液。將監視患者的任何副作用及在血液學或血液化學參數中的任何明顯改變。將收集血清樣品，以測量在週期間期的疫苗病毒複製及中和抗體反應。

實施例4

[0108]在AG129老鼠中，DENVax™皮內投藥的致免疫性及功效。在另一個實施例中，進行二種研究以比較投藥途徑在DENVax™於AG129老鼠中之致免疫性及功效上的效應。在一個實施例中，藉由在使用針及注射器於背部之

皮膚下SC注射或ID注射進腳墊中之後，測量中和抗體反應來比較單價DENVaxTM-4(例如，抗一種登革熱病毒血清型的疫苗)在AG129老鼠中之致免疫性。8隻AG129老鼠的群組各別以50微升及100微升的最後體積ID或SC注射 10^5 PFU/劑量之嵌合DENVaxTM-4疫苗。在初打後六週，來自每個處理群組的動物經由相應的ID或SC途徑追加 10^5 PFU DENVaxTM-4或TFA。老鼠在第31及58天時抽血及儲備所收集的血清以測量中和抗體反應。

[0109]DENVaxTM-4經由ID途徑之免疫在追加後引出5倍高對DEN-4的中和抗體反應，與經由該SC途徑引發的反應比較(參見例如，圖4)。由任一種免疫途徑所引起的抗DEN-4反應具有顯著的抗DEN-3交叉中和活性，但不抗DEN-1或DEN-2血清型。圖4顯示出AG129老鼠在以嵌合的DENVaxTM-4主要及二次免疫後之中和抗體反應。在第31及58天時對老鼠抽血，及儲備所收集的血清以使用斑點減少試驗(PRNT50)測量中和抗體反應。

[0110]在追加後二週，將來自每組的動物分成二組及以 10^6 PFU的DEN-1(Mochizuki病毒株)或DEN-2(New Guinea C株)病毒激發免疫。監視經激發免疫的動物之臨床疾病跡象，及記錄在5週內的存活率。經由ID途徑免疫的老鼠顯示出在DEN-1激發免疫後無疾病跡象(圖5A)。在SC免疫群組中，僅有一隻老鼠死於感染，同時剩餘動物無具有任何明顯的感染跡象(圖5B)。比較上，在DEN-1激發免疫後第13天，對照動物全部死於感染(圖5A)。在DEN-2激發免疫後，

第25天時，全部經由SC途徑僅以DENVaxTM-4免疫的動物皆死於感染，平均存活時間(MST)19.5天，如與對照(FTA)老鼠比較，其激發免疫後第17天全部死亡(MST=12.5天)(圖5B)。比較上，五十百分比經ID DENVaxTM-4免疫的老鼠從感染中存活，直到5星期監視時期結束(圖5B)。圖5A及5B顯示出DENVaxTM-4免疫AG129老鼠在以DEN-1(a)或DEN-2(b)病毒激發免疫後之存活。監視經激發免疫的動物之臨床疾病跡象及記錄在5週內的存活率。

[0111]在第二研究中，測試四價DENVaxTM疫苗經SC或ID投藥在老鼠(例如，AG129)中的致免疫性。每組六隻的AG129老鼠群組各別以100微升或50微升(最後體積)的DENVaxTM SC或ID注射。老鼠係以呈5：4：5：5(10^5 PFU DENVaxTM-1、-3及-4及 10^4 PFU DENVaxTM-2)的複合嵌合疫苗之劑量程度的DENVaxTM免疫。主要預防接種後42天，全部經免疫的動物接受5：4：5：5 DENVaxTM(10^5 PFU DENVaxTM-1、-3及-4及 10^4 PFU DENVaxTM-2)的補強注射。在42及56天時收集血液樣品，以測量對每種DEN病毒血清型的中和抗體反應。

[0112]如表示在表4中，已對全部四種DEN血清型引發主要及二次中和抗體反應二者。在追加後，在ID注射的老鼠群組中，該中和抗DEN-1、DEN-3及DEN-4抗體力價各別增加2、5及2倍，如與SC免疫動物比較。在二群組中，對DEN-2病毒的中和反應係可比較。經由SC途徑的免疫產生抗DEN-1>DEN-2>DEN-3>DEN-4之支配性中和抗體反應曲

線，其中中和力價各別為5120、1280、640及80。在ID投藥後之中和抗體反應的階層已經如下偏移：DEN-1>DEN-3>DEN-2>DEN-4，其中中和抗體力價各別為10240、3840、1280及160。

[0113]表4：比較每種複合嵌合病毒之承載比率係5：4：5：5 PFU(10^5 PFU DENVax™-1、-3及-4及 10^4 PFU DENVax™-2)的四價DENVax™在老鼠之SC或ID免疫後的致免疫性。在42及56天時收集血液樣品，以測量對每種DEN病毒血清型之中和抗體反應。

DENVax™ 調配物	中和抗體力價(GMT)							
	DEN-1		DEN-2		DEN-3		DEN-4	
	初打	追加	初打	追加	初打	追加	初打	追加
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

材料及方法

[0114]老鼠：AG129老鼠具有“完整的”免疫系統；缺乏干擾素(IFN)- α/β 及- γ 受體。已經用此模型來描述登革熱感染。其它研究：亦已檢驗發病原理、細胞向性及ADE。此模型准許以DEN-1及DEN-2激發免疫。

[0115]非人類靈長類動物：獼猴屬(Cynomolgus)，恆河猴攜帶病毒(病毒血症)，但是無疾病表露。

快速給藥研究

實施例5

[0116]在一個典型的研究中，比較藉由習知的針注射與



無針投藥之疫苗傳遞來評估不同投藥途徑及給藥方案在非人類靈長類動物模型中對四價登革熱疫苗的免疫反應。該非人類靈長類動物研究之可計量的終點有：i)在非人類靈長類動物中抗四種登革熱血清型每種的最大幾何平均中和抗體力價之途徑；及ii)免受二種登革熱血清型的激發免疫。

[0117]在此研究中，評估二種給藥計劃表：在第0天時連續二劑(在不同解剖位置處)，與分開60天提供二劑投藥(0.60)比較。在此研究中，使用四價調配物(例如DENVax™)的高劑量調配物來免疫。此疫苗批號係與使用於欲進行之二個時期1研究相同的材料。該高劑量四價調配物疫苗由 2×10^4 PFU DEN-1、 5×10^4 PFU DEN-2、 1×10^5 PFU DEN-3及 3×10^5 PFU DEN-4組成。該用於非人類靈長類動物研究的研究設計係顯示在表5中。

[0118] 表5. 非人類靈長類動物研究

群組 ¹	處理	免疫	給藥位置數目	在第90天時激發免疫，SC途徑	投藥的途徑/方法
1	高劑量DENVax	第0天	二 (二臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	ID PharmaJet 注射器
2	高劑量DENVax	第0天， 第60天	一 (另一臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	ID PharmaJet 注射器
3	高劑量DENVax	第0天， 第60天	一 (另一臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	ID針/注射器
4	高劑量DENVax	第0天	二 (二臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	SC PharmaJet 注射器
5	高劑量DENVax	第0天， 第60天	一 (另一臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	SC PharmaJet 注射器
6	高劑量DENVax	第0天， 第60天	一 (另一臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	SC針/注射器
7	PBS	第0天， 第60天	一 (另一臂)	3隻動物以wt DENV-2， 3隻動物以wt DENV-4	ID PharmaJet 注射器

[0119]在第0、3、5、7、10、12、14、53、64、67、88、91、93、95、97、99、101、102及104天時，在每次接種及野生型式登革熱病毒激發免疫後收集血清樣品，以分析樣品之登革熱病毒血症。亦在第0、30、53、75、88及104天時收集血清樣品，以測量藉由針/注射器或ID注射器投藥，由四價調配物引發的中和抗體程度。

[0120]在研究程序期間，在具體指定的間期收集血清樣品。已經化驗在第0天、第30天及第88天時所收集的血清(預追加)對登革熱-1、登革熱-2、登革熱-3及登革熱-4之中和抗體。該GMT抗體力價顯示在下列表6中。

[0121] 表6.在以DENVax一或二次免疫後之第30、53、75及88天時，對全部四種登革熱血清型的中和抗體力價。

群組	給藥計劃表/途徑 /投藥方法/處理	給藥後1第30天，GMTs倒數				給藥後1第53天，GMTs倒數			
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	2劑(第0天)，PJ ID，DENVax	80	1280	127	36	63	1280	40	13
2	2劑(第0,60天)，PJ ID，DENVax	18	14	101	11	32	14	22	10
3	2劑(第0,60天)， N/S ID，DENVax	160	36	64	9	45	40	10	5
4	2劑(第0天)，PJ SC，DENVax	1016	1016	403	80	640	1280	127	45
5	2劑(第0,60天)，PJ SC，DENVax	154	1816	226	64	285	1280	57	22
6	2劑(第0,60天)， N/S SC，DENVax	80	1140	113	11	80	806	20	28
7	2劑(第0,60天)，PJ ID，PBS	10	5	6	5	7	5	5	5

中和抗體力價<10係報導為“5”。血清稀釋在1：10下開始。

血清抗體轉換(在圓括號中的值)係定義為在第0天內的基線力價<10時，力價>10時；或若在第0天時的基線力價係>10時，力價提高>4倍時。

群組	給藥計劃表/途徑/ 投藥方法/處理	給藥後1第75天，GMTs倒數				給藥後1第88天，GMTs倒數			
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	2劑(第0天)，PJ ID，DENVax	40	806	25	25	57	1016	25	25
2	2劑(第0,60天)，PJ ID，DENVax	113	28	63	71	160	90	80	45
3	2劑(第0,60天)， N/S ID，DENVax	160	40	57	36	90	101	57	36
4	2劑(第0天)，PJ SC，DENVax	403	718	90	57	254	640	90	64
5	2劑(第0,60天)，PJ SC，DENVax	508	1810	226	113	403	1280	127	80
6	2劑(第0,60天)， N/S SC，DENVax	143	806	71	57	113	4064	32	40
7	2劑(第0,60天)，PJ ID，PBS	5	5	5	5	5	5	5	5

中和抗體力價<10係報導為“5”的值。

用於分析的血清稀釋在1：10下開始。

結果係產生自一式二份或一式三份。

PJ=典型的PharmaJet無針注射器，N/S=針/注射器；

GMT=幾何平均力價；ID=皮內；SC=皮下；

資料係以幾何平均力價(GMT)±標準誤差(SE)顯現。

[0122]在該研究中，全部42隻動物在研究開始時呈血清反應陰性，及在第0天時對四種登革熱血清型之任何無顯示出中和抗體力價。在該動物以DENVax™初打後，於第30天時之結果顯示出在第0天時，藉由ID或SC途徑投藥而接受二劑DENVax™的動物(在每臂中一劑)對登革熱-1、登革熱-2及登革熱-4(群組1及4)顯示出高中和抗體力價。第30天的血清抗體轉換比率對二者群組係100%，如與群組2及3比較。僅在病毒激發免疫前，二者群組維持高中和抗體反應程度至最高第88天。

[0123]對活的減毒疫苗來說，在免疫後之疫苗病毒複製係一疫苗吸收及疫苗安全性的重要度量。在以活的減毒四

價調配物疫苗(DENVax™)第一及第二免疫後，評估在非人類的靈長類動物中之疫苗病毒複製。在該第一次免疫後，使用qRT-PCR試驗來測試於第0、3、5、7、10、12、14天時所收集的血清樣品其來自疫苗株的病毒RNA之存在(參見表7)。

[0124] 表7. 在以DENVax主要免疫後，偵測於血清中的DENVax-2 RNA。

群組	給藥計劃表	病毒RNA，DENVax-2病毒RNA，log ₁₀ GE/毫升的正動物數目				
		第5天	第7天	第10天	第12天	第14天
1	2給藥(第0天)，PJ ID	-	3/6 (3.9-4.8)	4/6 (4.5-5.3)	5/6 (3.9-5.2)	3/6 (3.8-5.1)
2	2給藥(第0,60天)，PJ ID	-	-	-	-	-
3	2給藥(第0,60天)，N/S ID	-	-	1/6 (3.8)	1/6 (3.8)	1/6 (3.8)
4	2給藥(第0天)，PJ SC	1/6 (3.8)	5/6 (3.8-5.0)	5/6 (3.7-5.3)	1/6 (4.0)	-
5	2給藥(第0,60天)，PJ SC	1/6 (3.8)	5/6 (4.5-5.4)	5/6 (3.8-5.4)	5/6 (3.2-4.8)	3/6 (3.7-5.0)
6	2給藥(第0,60天)，N/S SC	-	3/6 (3.9-5.6)	4/6 (3.8-5.4)	3/6 (4.3-5.0)	2/6 (3.7-4.2)
7	2給藥PBS(第0,60天)，PJ ID	-	-	-	-	-

結果係來自一式二份或一式三份資料的平均。

具有力價<log₁₀3.6的樣品係視為負。

GE/毫升=基因組同等物/毫升

N/S=針/注射器；PJ=PharmaJet無針注射器

[0125] 在第0天(預接種)及第3天(免疫後)時未偵測病毒RNA。對全部群組來說，在第一免疫後，從接種後第5天至第14天，僅對登革熱-2血清型偵測病毒RNA。對群組1、3、5及6來說，免疫後14天未觀察到終點力價。在第10天時對群組1及4，及在第7及10天時對群組5及6觀察波峰力價(表

7)。未對在第二免疫後，於第64及67天(給藥後2的4及7天)時評估之任何群組偵測病毒RNA。

[0126] 在第90天時，以野生型登革熱-2或登革熱-4對來自每個群組的三隻動物激發免疫，以闡明在以該四價調配物免疫後之功效。受保護的動物應該顯示出缺乏野生型登革熱病毒感染及複製。在以10⁶ PFU野生型登革熱2(New Guinea C株)及登革熱4(814669株)病毒激發免疫後，在第91、93、95、97、99、101、102及104天時，對全部群組分析野生型激發免疫病毒(登革熱-2及登革熱-4)複製(表8)登革熱疫苗(例如DENVax™)：激發免疫後病毒血症。

[0127] 表 8. 來自 wt DENV 激發免疫之經 DENVax 免疫的 NHPs 之保護。

接種及激發免疫方案		預激發免疫抗體力價(GMT)， 第88天				激發免疫後的病毒血症(log ₁₀ GE/毫升)		
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	天3	天5	天7
2劑在第0天， PJ ID，DENVax	DENV-2	57	1016	25	25	-	-	-
	DENV-4					-	-	-
2劑在第0,60天， PJ ID，DENVax	DENV-2	160	90	80	45	-	-	-
	DENV-4					-	-	-
2劑在第0,60天， N/S ID，DENVax	DENV-2	90	101	57	36	-	-	-
	DENV-4					-	-	-
2劑在第0天，PJ SC，DENVax	DENV-2	254	640	90	64	-	-	-
	DENV-4					-	-	-
2劑在第0,60天， PJ SC，DENVax	DENV-2	403	1280	127	80	-	-	-
	DENV-4					-	-	-
2劑在第0,60天， N/S SC，DENVax	DENV-2	113	4064	32	40	-	-	-
	DENV-4					-	-	-

[0128]僅有在已經接受PBS的群組7中偵測野生型激發免疫病毒的病毒RNA。對登革熱-2來說，在第93至97天時偵測在3隻動物的3隻中之病毒RNA。對登革熱-4來說，在第95天時偵測在3隻動物的僅有1隻中之病毒RNA。以四價調配物免疫的群組之一個重要的觀察為無觀察到登革熱-2或登革熱-4激發免疫病毒之病毒RNA。這些結果建議藉由所測試的任何給藥計劃表之四價調配物免疫來授予免疫保護抗登革熱-2及登革熱-4野生型病毒二者之激發免疫。

[0129]整體來說，此非人類靈長類動物研究明確顯示出在第0天時，於二個可區別的位置(例如，不同臂)處投藥二劑的四價調配物之新穎的給藥計劃表所引發之中和抗體程度，其係相等或高於對更傳統之初打及追加免疫分開2至3個月輸送的給藥計劃表所觀察到的那些。對在第0天時接受二劑的群組來說，該免疫反應之開始係更快速及長持續性。施加無針ID或SC注射器提高免疫反應，如此觀察到較高的力價。

實施例6

AG129老鼠的快速免疫研究

[0130]在另一個典型的研究中，設計出新穎的給藥計劃表，其探索在單一場合上於二個可區別的位置處投藥二劑疫苗或在二劑疫苗間較短的給藥間期將提高接種疫苗的個體對返回做第二次免疫之容量彈性。先前發展的標準登革熱疫苗典型在一年的進程內需要三劑以達成健全的多價登革熱免疫反應。關於顯現於本文的接種計劃表，評估對發

生在至少二個解剖學二個位置中，及在某些具體實例中，於每個位置處皮內投藥最大劑量之免疫反應(參見表9)。進行此方法，在某種程度上於第0天時活化在二個不同淋巴結中之免疫細胞及抗原呈現細胞，以引發較高程度及更健全之登革熱特定的免疫反應，與分開7、14或42天皮內投藥二劑比較。在一個研究中，使用習知在接種間42天間期來比較二種投藥途徑，SC及ID途徑。以四價調配物(DENVax™；每種血清型3：3：3：3比率)的低劑量調配物來免疫老鼠，其中該調配物由在0.05毫升體積中每種登革熱-1、-2、-3及-4(例如，DENVax™-1、-2、-3及-4)10³ PFU組成，其係經由皮內途徑(在腳墊中)提供。此研究的現場部分係在此感染起始前進行。研究設計係顯示在下列表9中。

[0131]表9。研究設計用來AG129老鼠研究DEN-012。

群組	劑量	免疫數目/途徑	動物數目
A	DENVax™(3：3：3：3)	1(第0天)/ID	6
B	DENVax™(3：3：3：3)	2(第0天)/ID，將最大劑量提供至二個腳墊每個中	6
C	DENVax™(3：3：3：3)	2(分開7天)/ID	6
D	DENVax™(3：3：3：3)	2(分開14天)/ID	6
E	DENVax™(3：3：3：3)	2(分開42天)/ID	6
F	FTA(負對照組)	2(分開14天)/ID	6
G	DENVax™(3：3：3：3)	2(分開42天)/SC	6

[0132]顯現在所收集的老鼠血清中，對登革熱1-4之中和抗體力價係藉由微量中和(microneutralization)試驗來測量。遍及該研究，在具體指定的時間點處收集血清，及藉

由維持該研究群組直到第160天(比在研究開始後5個月還久)來研究該免疫反應的壽命。從在免疫後第28及56天時所收集的血清獲得之結果係闡明在表10中。

表10. 對DEN-1、-2、-3及-4之中和抗體力價(GMTs)

群組	處理群組	GMT，第28天			
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
A	1(第0天)/ID	400	100	200	40
B	2(第0天)/ID，將最大劑量提供至二個腳墊每個中	800	200	800	160
C	2(分開42天)/ID	400	100	200	40
D	2(分開14天)/ID(負對照)	<20	<20	<20	<20

群組	GMT，第56天			
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
A	800	200	400	40
B	3200	400	1600	160
C	1600	200	800	40
D	<20	<20	<20	<20

[0133]在先前研究中，於第0天時使用習知的初打動物給藥計劃表，然後在第42天時投藥補強接種，以評估對四價登革熱疫苗的免疫反應。初打及追加接種二者係藉由皮下(SC)途徑投藥。此給藥計劃表係包含在該研究中，用以與新穎的給藥計劃表比較。初始時，一個研究(顯示在表10中)使用分開42天提供二劑的習知給藥間期來比較SC及ID投藥途徑。結果指示出在此老鼠模型中，在SC與ID途徑間關於引發的中和抗體無顯著差異。此研究進一步探索在第0天時於二個解剖位置處二劑投藥(二個腳墊每個中一劑)是

否可能引發類似於上述的標準給藥計劃表(2劑分開42天)之中和抗體程度。結果顯示出在第0天時，於二個位置每個處，經由ID途徑以最大劑量的四價調配物DENVax™免疫，對全部四種登革熱血清型引發的中和抗體程度等於習知給藥計劃表的大小。亦研究藉由ID途徑投藥單一疫苗劑量的效應(群組A)。在第0天時，投藥單一劑量的DENVax™產生趨向稍微較低之抗體反應，與在第0天時的二劑比較(比較群組A及B)。增加在二劑間之間期從7至42天確實增加抗體反應，超過所觀察的程度。登革熱免疫反應的壽命之評估顯露出對全部四種登革熱血清型的中和抗體力價在免疫後第160天保持在高程度，而與投藥途徑及給藥計劃表無關(資料無顯示)。

[0134] 整體來說，結果建議皮內投藥途徑引發的中和抗體程度相等於對皮下途徑所觀察到的那些。再者，在第0天時，藉由ID途徑於二個不同位置處投藥二劑引發相等於習知給藥計劃表之健全的中和抗體反應。所引發的抗體反應具長持續性及僅有稍微減少。動物未顯示出罹病率及死亡率增加。此研究闡明在二個可區別的位置處投藥二劑疫苗對免疫來說係可實行的選擇，因為該免疫反應所產生的抗體力價及週期在大小上相等於分開42天提供二劑所產生的那些。這些給藥方案將對至登革熱流行區域的旅行者及其它因登革熱病毒曝露而需要快速保護者係有益。

實施例7

AG129老鼠的另一個快速免疫研究

[0135]此研究的目標為測量在第0天時於二個位置ID處投藥二劑是否將引發較高程度及更健全的登革熱特定免疫反應，與分開42天ID投藥二劑比較。欲測試的假設為對二個位置每個皮內投藥最大疫苗劑量是否將活化運輸至二個不同淋巴結的免疫細胞及抗原呈現細胞，因此減低在四種DENVax™疫苗組分間之干擾。對此AG129老鼠研究的設計係顯示在下列表11中。

表11. 實施例7 AG129老鼠研究之設計

群組	劑量	免疫數目/途徑	動物數目
1	DENVax™ 3 : 3 : 3 : 3	2劑(第0天)/ID使用二腳墊	8
2	DENVax™ 3 : 3 : 3 : 3	2劑(第0天，第42天)/ID使用二腳墊	8
3	DENVax™ 4 : 3 : 4 : 5	2劑(第0天)/ID使用二腳墊	8
4	DENVax™ 4 : 3 : 4 : 5	2劑(第0天，第42天)/ID使用二腳墊	8
5	FTA(負對照組)	2劑(第0天)/ID使用二腳墊	8

[0136]在此典型的方法中，使用二種不同疫苗劑量程度(低及中劑量)來免疫，其使用新穎的給藥計劃表在第0天時投藥二劑，與分開42天的二劑比較。老鼠係以低劑量的DENVax™調配物(3 : 3 : 3 : 3)，以0.05毫升體積，經由皮內途徑提供(在腳墊中)給藥，其中該調配物由DENVax™-1、-2、-3及4每種 10^3 PFU組成；或中劑量的DENVax™調配物(4 : 3 : 4 : 5)以0.05毫升體積給藥，其中該調配物包括 10^4 PFU DENVax™-1、 10^3 PFU DENVax™-2、 10^4 PFU DENVax™-3及 10^5 PFU DENVax™-4。在第0天時，全部老鼠皆經免疫，且群組2及4在第42天時追加。在主要接種後第14、41及56天時收集用

於抗體分析的血清，及使用斑點減低微量中和試驗來分析以測量對全部四種登革熱血清型的中和抗體程度。從儲備的老鼠血清樣品獲得之致免疫性結果係顯示在表12中。

表12. AG129老鼠研究DEN-013之中和抗體力價

群組	中和抗體力價倒數(PRNT50)											
	14天p.i. ¹				41天p.i. ¹				56天p.i. ¹			
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	320	160	80	20	640	640	640	80	800	1600	800	40
2	320	320	40	20	640	640	320	80	800	800	400	40
3	640	80	80	40	2560	640	1280	160	3200	800	800	40
4	320	80	40	20	320	160	640	80	1600	800	800	80
5	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

¹ p.i.-感染後

[0137]在此實施例中，以低或中劑量四價疫苗(例如 DENVaxTM)調配物免疫在接種後第14天之早期檢查時，對全部四種登革熱血清型引發中和抗體，與在第0天時一或二劑投藥無關。對在第0天時接受二劑的群組1及3來說，中劑量DENVaxTM調配物第28天時特別對DEN-1及DEN-3引發稍微較高的中和抗體力價，與在第0天時僅接受單一劑量的群組(群組2及4)比較。從在第56天時收集的血清所獲得之抗體力價指示出該中和抗體反應持續及不衰落，不管該動物是否在第42天時追加或僅有在第0天時接受疫苗。在此研究中所獲得的結果進一步支持在第0天時於二個可區別的位置處(例如，免疫學地)投藥二劑之新穎的給藥計劃表之應用。

表13. AG129老鼠研究DEN-013的中和抗體力價

			DEN-1		DEN-2		DEN-3		DEN-4	
			第28天	第56天	第28天	第56天	第28天	第56天	第28天	第56天
研究1	3 : 3 : 3 : 3	2(d0)	640	800	320	1600	160	800	20	40
		2(d0,42)	320	800	320	800	160	400	40	40
	4 : 3 : 4 : 5	2(d0)	1280	3200	320	800	640	800	80	40
		2(d0,42)	320	1600	160	800	80	800	40	80
	FTA	2(d0)	40	20	<20	20	20	20	<20	20
	NMS		20	20	20	20	20	20	<20	20
	3 : 3 : 3 : 3	2(d0)	800	3200	200	400	800	1600	160	160
		2(d0,42)	400	1600	100	200	200	800	40	40
研究2	FTA	2(d0,14)	20	<20	<20	<20	20	20	20	<20
	NMS		20	20	40	20	20	20	20	20

使用 50% NMS 截止，在 1 : 20 的起始稀釋下計算 ELISPOT 登革熱病毒中和力價。儲備來自一群組內的各別動物之血清及以一式三份測試。

實施例8

[0138] 圖9A-9D顯示出在以四價DENVax免疫後，於非人類靈長類動物中所達成之中和抗體力價的比較曲線圖，其中該DENVax包括DENVax-1(1×10^5 PFU)；DENVax-2(1×10^4 PFU)；DENVax-3(1×10^5 PFU)；DENVax-4(1×10^6 PFU)。二個群組係以無針PharmaJet裝置經由皮下途徑接種疫苗，在相同天兩次(0,0)、或在第0天時一次及在第60天時再一次(0,60)。在0、30、53、75及88天時分析血清之抗體存在，及分析抗四種登革熱血清型的抗體之偵測(DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4)。

[0139]在另一個實施例中，以二劑之四價調配物 DENVax 來免疫血清反應陰性的人類個體，其中該 DENVax 包含 DENVax-1(1×10^4 PFU)；DENVax-2(1×10^3 PFU)；DENVax-3(1×10^4 PFU)；DENVax-4(1×10^5 PFU)。免疫途徑係皮下或皮內，及該疫苗接種係分開90天提供。在0、30、60、90及120天時分析抗每種登革熱血清型的抗體程度。該疫苗對全部四種血清型引發中和抗體。但是，當比較免疫途徑時，血清抗體轉換的程度不同。整體來說，在此研究中，所產生的免疫之皮內途徑顯示出係更“平衡的”免疫反應且抗體程度係更相等，如與皮下途徑比較。

[0140]圖10顯示出從哥倫比亞的人類臨床試驗獲得之資料。對血清反應陰性的人類皮下或皮內地提供二劑之四價調配物 DENVax，其中該 DENVax 包含 DENVax-1(1×10^4 PFU)；DENVax-2(1×10^3 PFU)；DENVax-3(1×10^4 PFU)；DENVax-4(1×10^5 PFU)。在0、30、60、90及120天時分析抗每種登革熱血清型的抗體程度。

[0141]在此典型的方法中，在第0天時同時地以二劑的四價疫苗(例如 DENVaxTM DENVax-1： 2×10^4 PFU，DENVax-2： 5×10^4 PFU，DENVax-3： 1×10^5 PFU，DENVax-4： 3×10^6 PFU)免疫非人類靈長類動物，或分別在0及60天時二劑。該疫苗對全部四種登革熱血清型引發中和抗體。接種後90天，二個群組的中和抗體力價相對地相等(圖11)。但是，在第0天時接受二次免疫的群組之免疫反應的動力學係更快速。在此研究中所獲得的結果進一步支持在第0天時於

二個免疫學可區別的位置處投藥二劑之新穎的給藥計劃表之應用。

[0142]圖11顯示出在以四價DENVax皮下免疫後，在非人類靈長類動物中達成之中和抗體力價的比較曲線圖，其中該DENVax包括DENVax-1(1×10^5 PFU)；DENVax-2(1×10^4 PFU)；DENVax-3(1×10^5 PFU)；DENVax-4(1×10^6 PFU)。二個群組在相同天接種疫苗兩次(0,0)，或在第0天時一次及在第60天時再一次(0,60)。在0、28、58、73及90天時分析血清抗體之存在，及分析抗四種登革熱血清型(DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4)的抗體之偵測。

實施例9

[0143]圖12顯示出單一對雙重投藥登革熱病毒疫苗之分析。此資料顯示出在0,0或單一注射後於個體中之多種基因轉錄程度改變，但是雙重劑量之改變量係較大。因此，在相同天具有揭示於本文的組成物之雙重投藥的個體中，先天性免疫力的引發可較大。

[0144]四種登革熱病毒血清型(DENV-1-4)是遍及全球人類最流行的蚊媒病毒疾病之原由。四價疫苗係在發展中，但是直至本申請案，需要超過6個月至一年的時期多重免疫。快速免疫對策(RIS)對全部四種DENV血清型引出免疫反應及需要較少就診健康提供者，因此增加疫苗容量彈性及引發快速血清抗體轉換，將對在流行國家中的人們增加安全性和保護旅行者及軍事人員不受登革熱。使用具有預定比率的多種四價調配物來研究RIS，其係由在起始接種

就診(第0天)時，於二個不同解剖位置處投藥二個最大疫苗劑量組成。此接種對策對全部四登革熱病毒血清型產生有效率的初打及引發長週期(3個月)有效力的中和抗體反應，如與傳統的初打及隨後數週或數月後的第2劑(追加)比較。此外，在主要免疫後之先天性免疫反應的分析支持由RIS所提供的初打效率係因此免疫方法刺激的免疫標記量較高之結果的觀點，如與單一劑量免疫比較。

[0145]揭示於本文的組成物包括嵌合登革熱病毒組成物，其中一種登革熱病毒的骨架可調和一或多種其它登革熱病毒組分。

可按照本揭示沒有過度的實驗而製得及執行於本文所揭示及主張的全部組成物及方法。雖然已經就較佳具體實例描述出該組成物及方法，要由熟習該項技術者明瞭的是，可對該組成物及方法及在描述於本文的方法之步驟中或在步驟順序中施加變化而沒有離開於本文的概念、精神及範圍。更特別的是，對描述於本文的試劑來說，某些化學及生理學二者相關的試劑可經取代，同時將達成相同或類似結果。由熟習該項技術者明瞭之全部此類似的代替品及改質視作在如由所附加的申請專利範圍定義之精神、範圍及概念內。

【符號說明】

(無)

發明摘要

※ 申請案號：102120553

※ 申請日：

102.6.10

※IPC 分類：A61K39/295 (2006.01)
A61P37/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抗登革熱病毒疫苗之組成物及投藥方法

COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADMINISTRATION OF
VACCINES AGAINST DENGUE VIRUS

【中文】

本發明的具體實例報導出用以接種一個體抗全部登革熱病毒血清型的組成物及方法。在某些具體實例中，可在不同解剖位置處將多重疫苗組成物投藥至一個體以對全部登革熱病毒血清型引發快速反應。在某些具體實例中，將二或更多種疫苗組成物投藥至一個體以抗全部登革熱病毒血清型可包括二或更多種投藥途徑。

【英文】

Embodiments of the present invention report compositions and methods for vaccinating a subject against all dengue virus serotypes. In some embodiments, multiple vaccine compositions may be administered to a subject in different anatomical locations in order to induce a rapid response to all dengue virus serotypes. In certain embodiments, administration of two or more vaccine compositions to a subject against all dengue virus serotypes may include two or more routes of administration.

申請專利範圍

1. 一種包含至少三種活的減毒登革熱病毒血清型或其片段之單一疫苗組成物，其使用於快速引發一個體中對抗至少三種登革熱病毒血清型的免疫反應，其中該單一疫苗組成物的至少二劑係在同一天投藥於需要該組成物之個體的二或更多個解剖位置，在該個體中引發中和抗體以對抗至少三種登革熱病毒血清型。
2. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該活的減毒登革熱疫苗的調配物之至少一次額外補強投藥係在如請求項1之同時投藥後的1至180天投藥。
3. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該單一疫苗組成物包含在該單一疫苗組成物中一預定比率的該三或更多種登革熱病毒血清型的多個單價疫苗。
4. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該單一疫苗組成物包含在該單一疫苗組成物中一等效比率的該三或更多種登革熱病毒血清型的多個單價疫苗。
5. 如請求項2之單一疫苗組成物，其中該欲使用於該至少一次額外補強投藥之活的減毒登革熱疫苗調配物係與使用於如請求項1之同時投藥的單一疫苗組成物相同。
6. 如請求項2之單一疫苗組成物，其中該欲使用於該至少一次額外補強投藥之活的減毒登革熱疫苗調配物係與使用於如請求項1之同時投藥的單疫苗組成物不同，且包含預定濃度的該等登革熱病毒血清型之一或多種單

價疫苗。

7. 如請求項6之單一疫苗組成物，其中該登革熱病毒血清型的濃度包括一比使用於如請求項1之該同一天投藥的調配物濃度為高的一或多種登革熱病毒血清型的濃度。
8. 如請求項7之單一疫苗組成物，其中該高的濃度係比使用在如請求項1的單一調配物中的濃度大2至100,000倍的濃度。
9. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該二或更多個解剖位置包括使用相同投藥模式的不同解剖位置。
10. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該二或更多個解剖位置包括使用不同投藥模式的不同解剖位置。
11. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該疫苗之投藥模式包括皮下(SC)、皮內(ID)或肌肉內(IM)。
12. 如請求項1之單一疫苗組成物，該組成物更包含至少一種給該個體的免疫性藥劑(immunogenic agent)。
13. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該組成物包含一四價的單一疫苗組成物，其代表全部四種登革熱病毒血清型。
14. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該組成物包含為一預定比率的全部四種登革熱病毒血清型。
15. 如請求項1之單一疫苗組成物，其中該活的減毒登革熱病毒包含一或多種活的減毒登革熱病毒及一或多種登革熱-登革熱嵌合病毒，更包含該經減毒的登革熱病毒之殼體及非結構性蛋白與至少一第二種登革熱病毒之

原膜蛋白 (Pre-membrane protein)及包膜蛋白。

16. 如請求項15之單一疫苗組成物，其中該殼體及非結構性蛋白係來自於一經減毒的登革熱-1、登革熱-2、登革熱-3或登革熱-4病毒。
17. 如請求項15之單一疫苗組成物，其中當該經減毒的登革熱病毒為登革熱-1時，該至少一第二種登革熱病毒的原膜蛋白及包膜蛋白為登革熱-2、登革熱-3或登革熱-4；或，當該經減毒的登革熱病毒為登革熱-2時，則為登革熱-1、登革熱-3或登革熱-4；或，當該減毒的登革熱病毒係登革熱-3時，則為登革熱-1、登革熱-2或登革熱-4；或當該減毒的登革熱病毒係登革熱-4時，則為登革熱-1、登革熱-2或登革熱-3。
18. 如請求項15之單一疫苗組成物，其中該登革熱-登革熱嵌合病毒包含該經減毒的登革熱-2病毒之殼體與非結構性蛋白，以及登革熱-1、登革熱-3或登革熱-4的原膜蛋白及包膜蛋白。
19. 一種疫苗套組，其包含；
如請求項1或14中任一項之單一疫苗組成物；及
至少一種裝置，其中該裝置能被使用於將該組成物投藥至一個體的二個不同解剖位置。
20. 如請求項19之套組，其中該單一疫苗組成物包含預定比率的該三或更多種登革熱病毒血清型。
21. 如請求項19之套組，其包含二或更多種疫苗組成物，其中至少一種疫苗組成物包含大約平均分配的全部四種

登革熱病毒血清型，以及至少一第二疫苗組成物，該第二疫苗組成物包含一預設比率的全部四種登革熱病毒血清型。

22. 如請求項19之套組，其更包含二或更多裝置，該裝置係選自於由皮內注射裝置、皮下注射裝置及肌肉內裝置所組成之群組。

圖 1

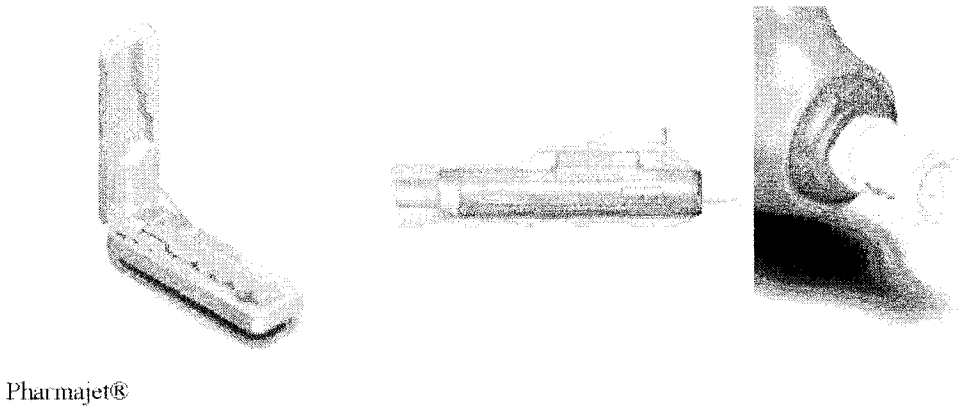


圖 2

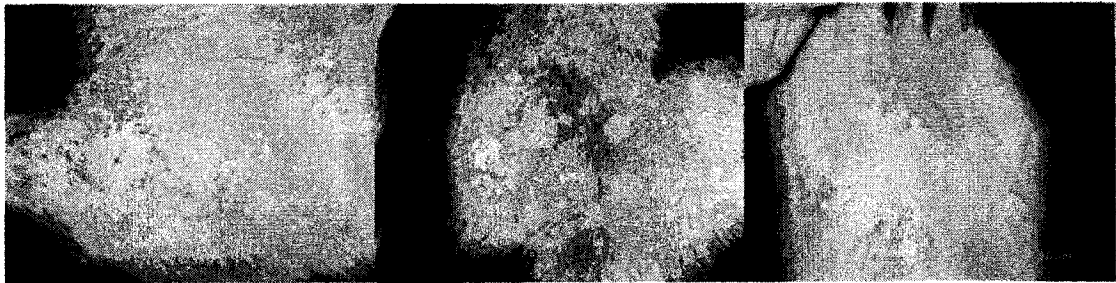


圖 3 在主要免疫後之免疫反應

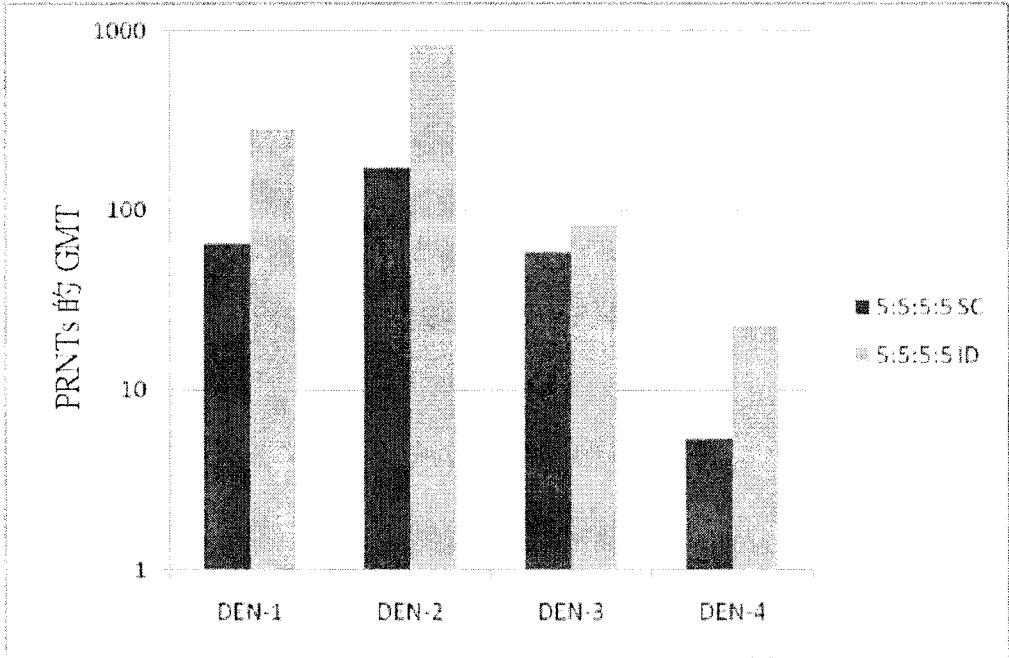


圖 4 在追加後的免疫反應

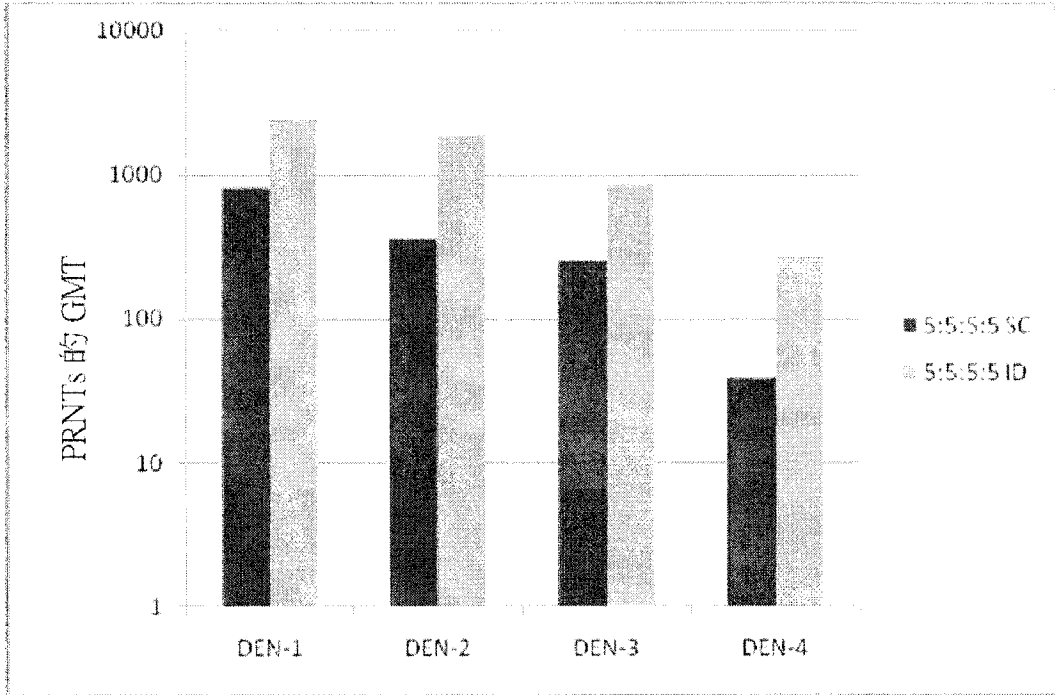


圖 5

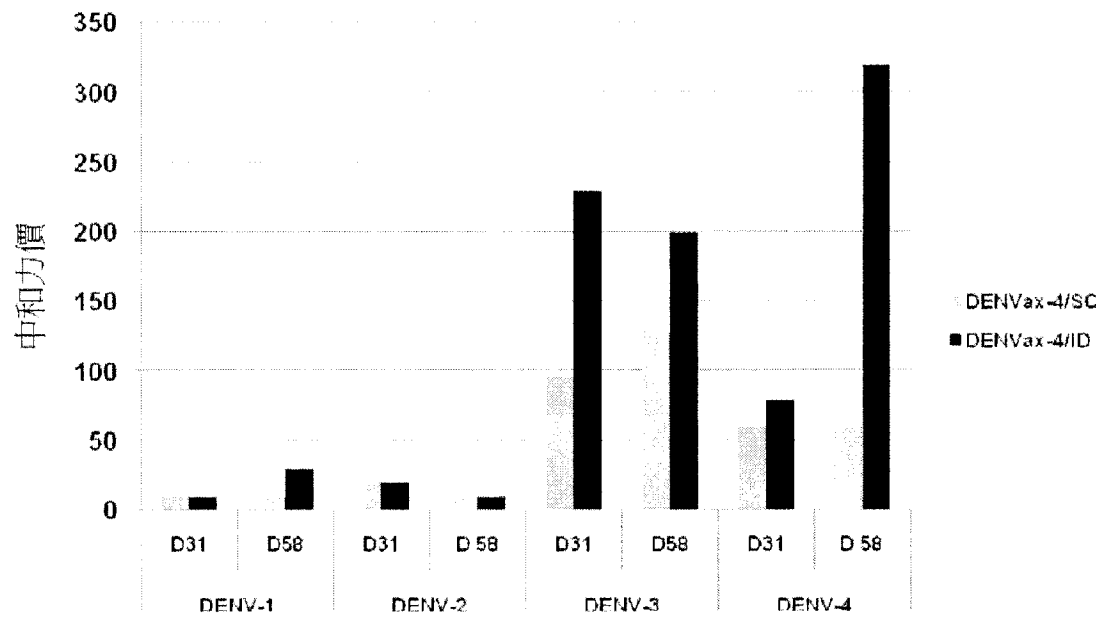
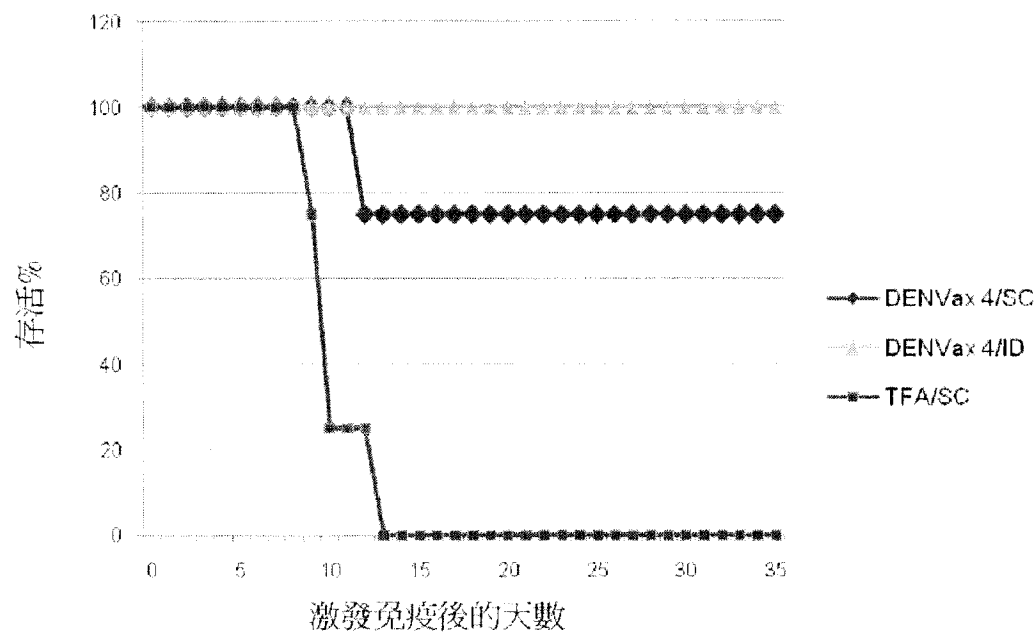


圖 6A和6B

A.



B.

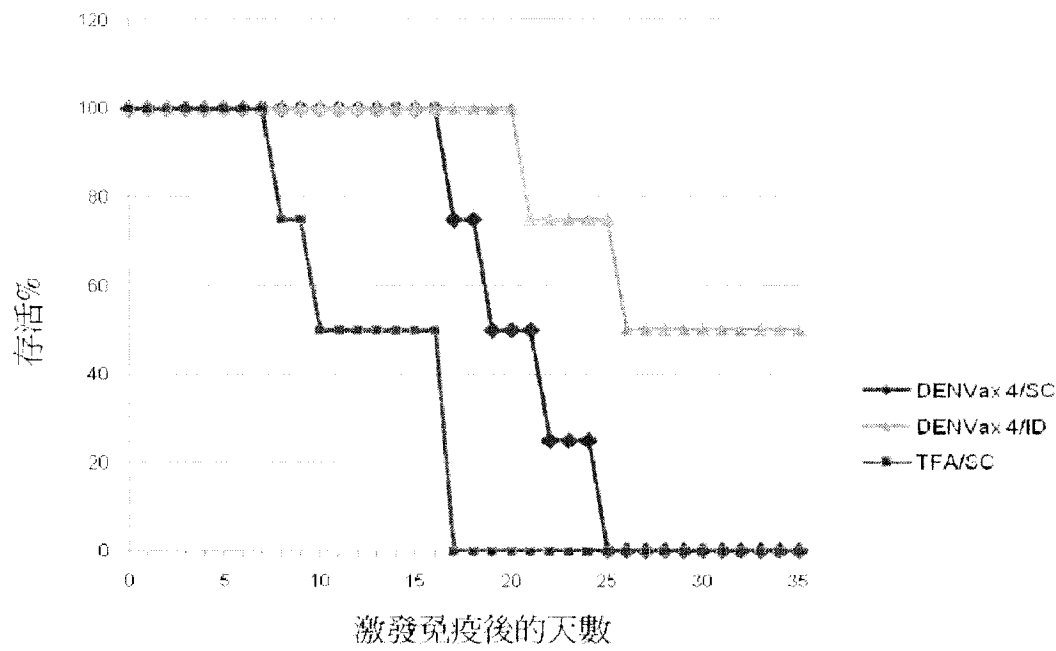


圖 7

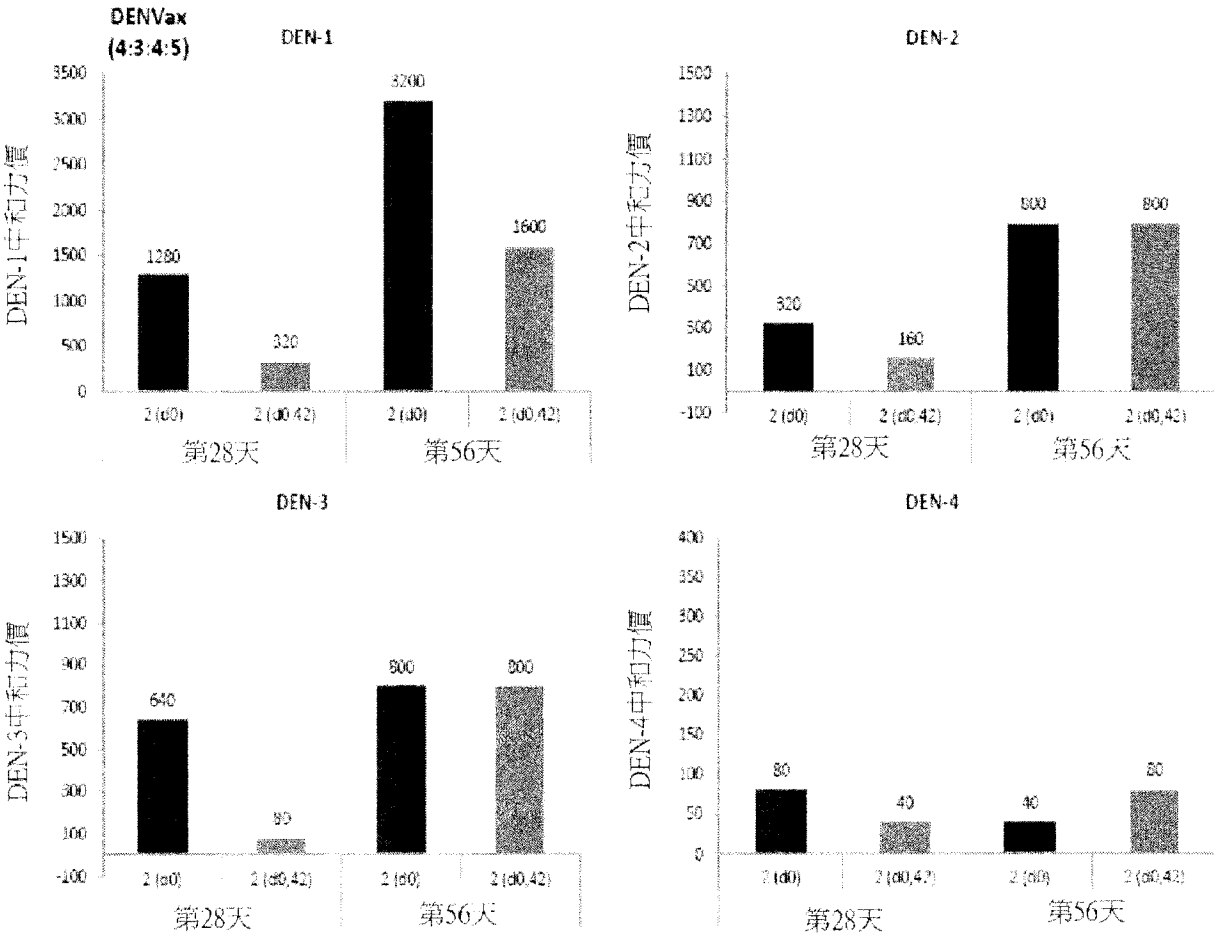


圖 8

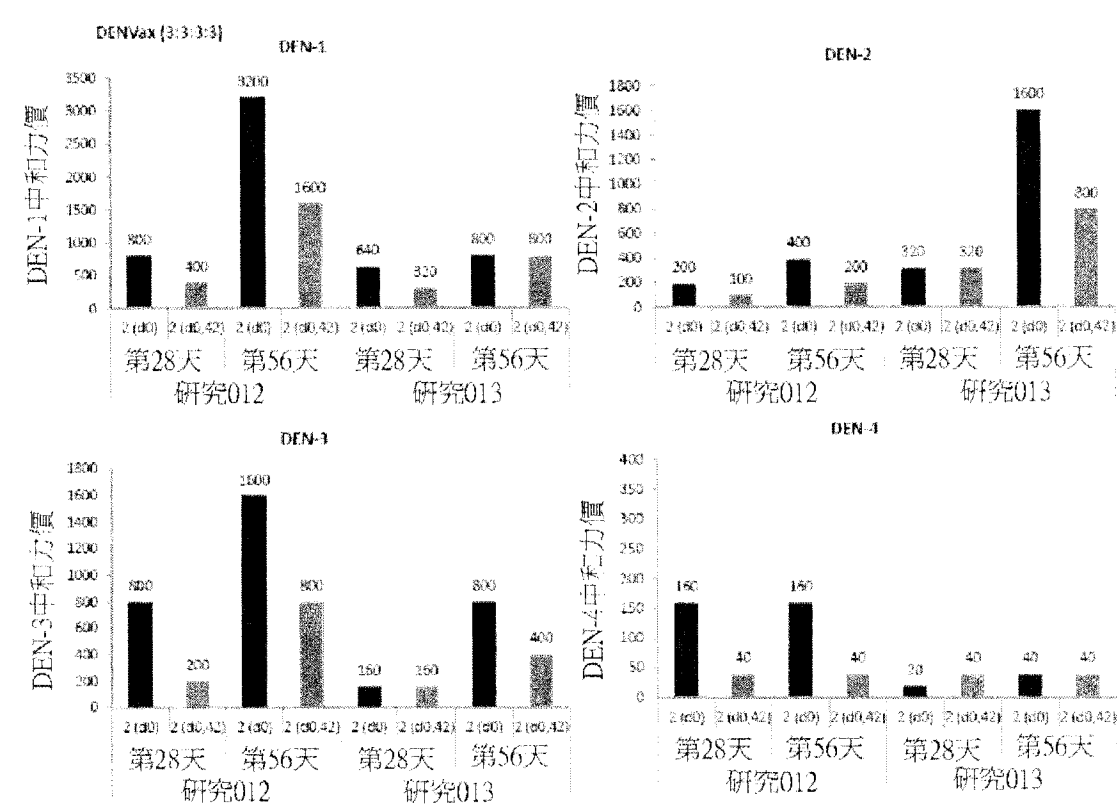
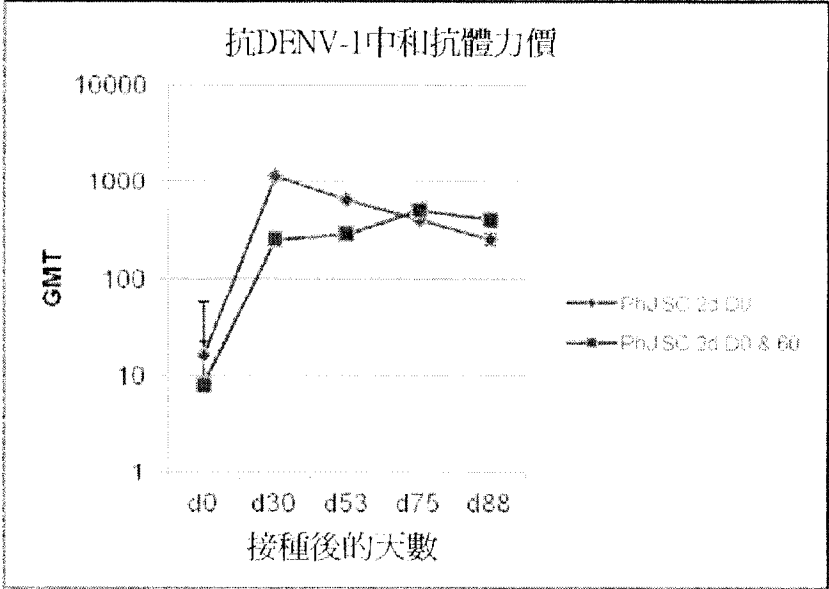
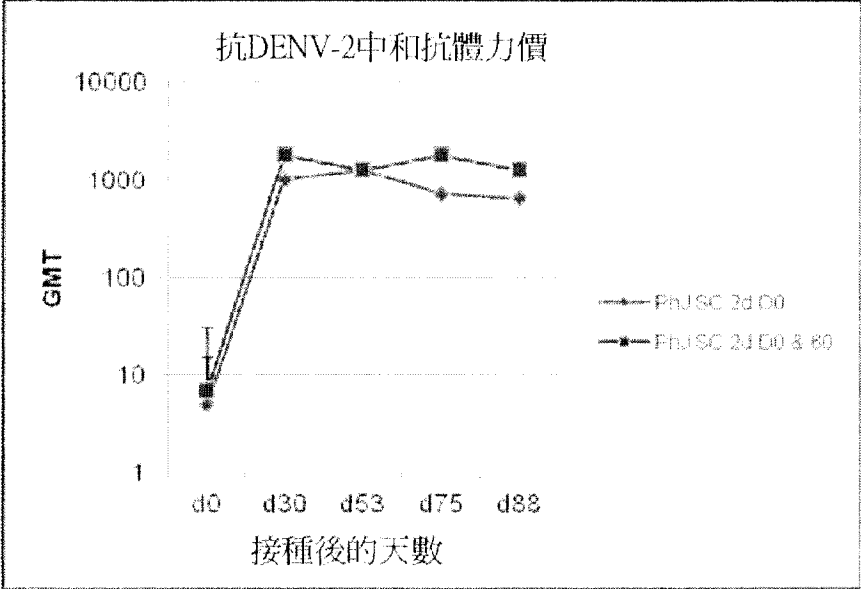


圖 9A-9B

A.

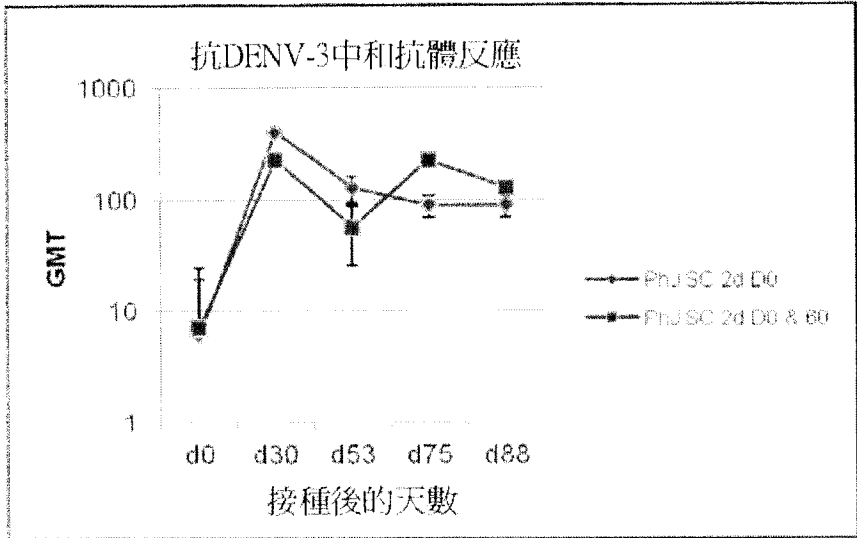


B.



接續
圖 9C-9D

C.



D.

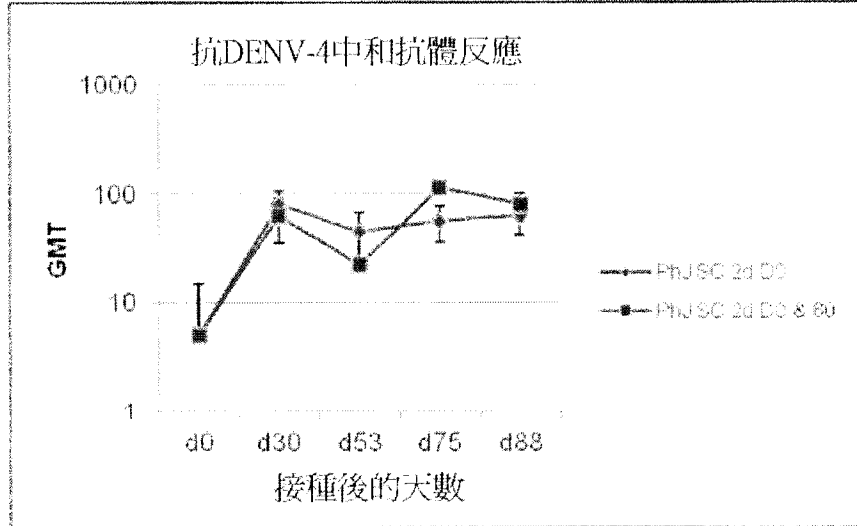
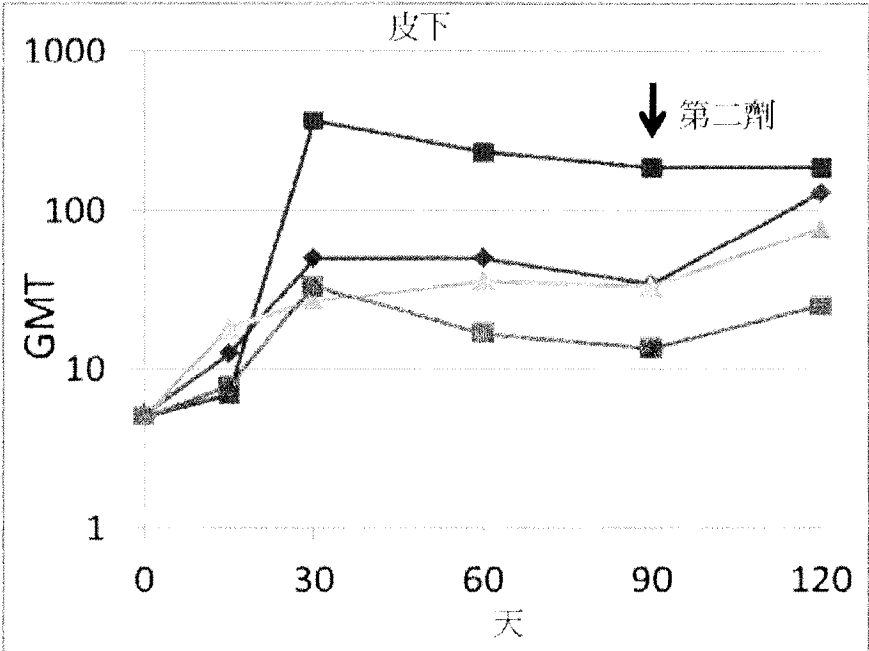
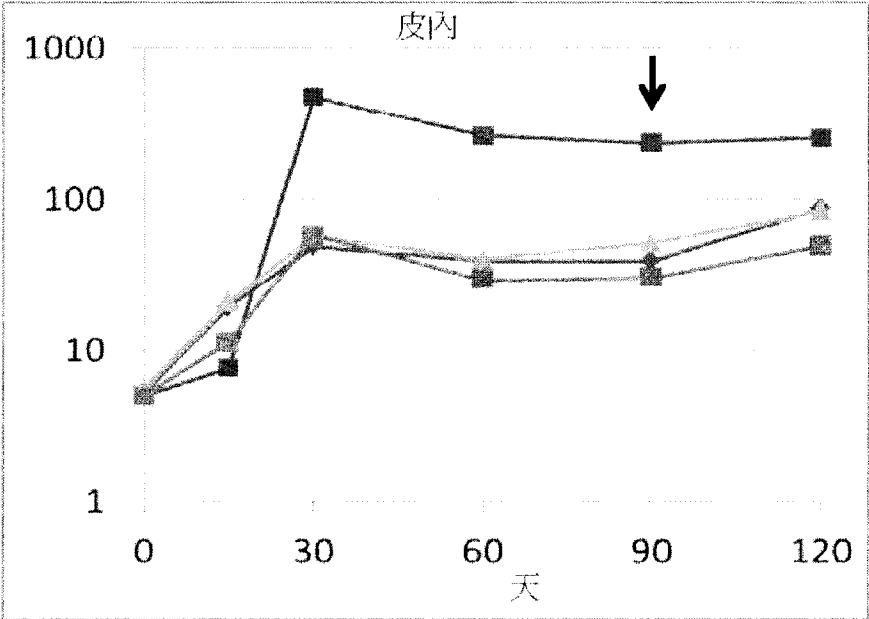


圖 10A-10B

A.



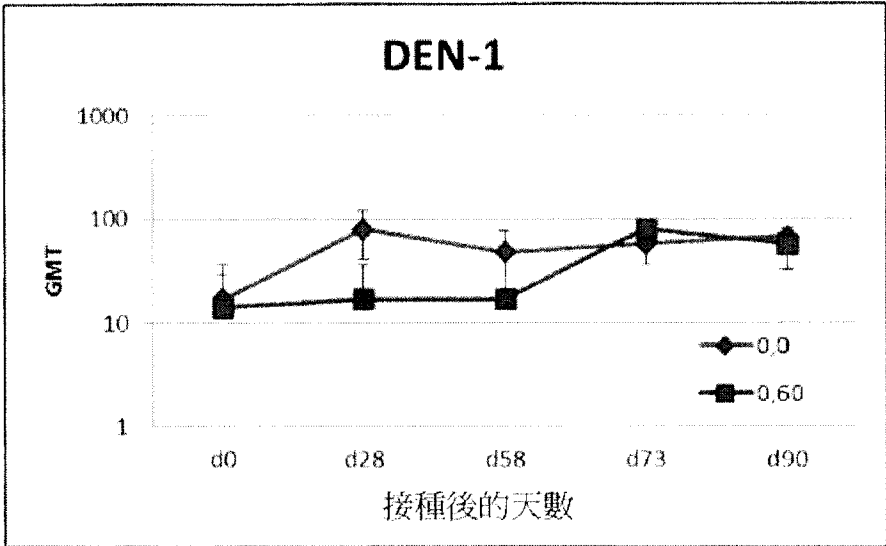
B.



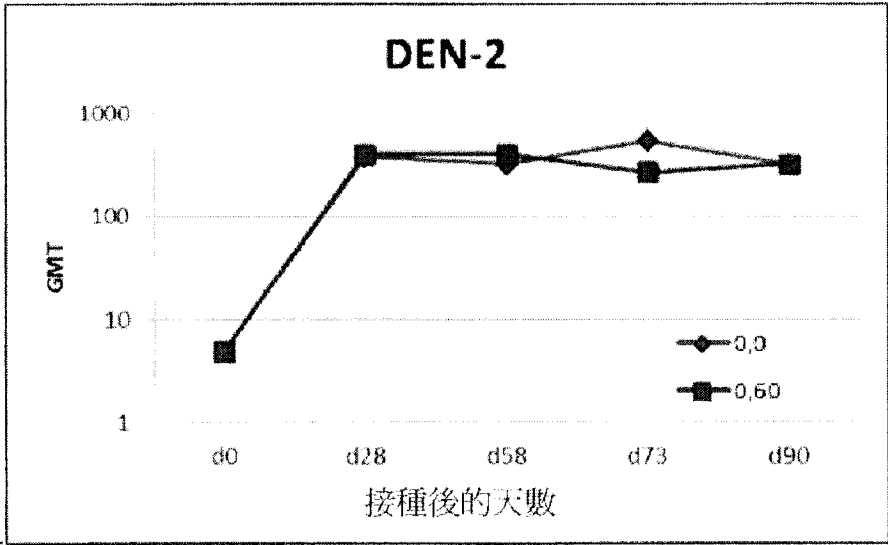
- DEN-1
- DEN-2
- DEN-3
- DEN-4

圖 11A-11B

A.

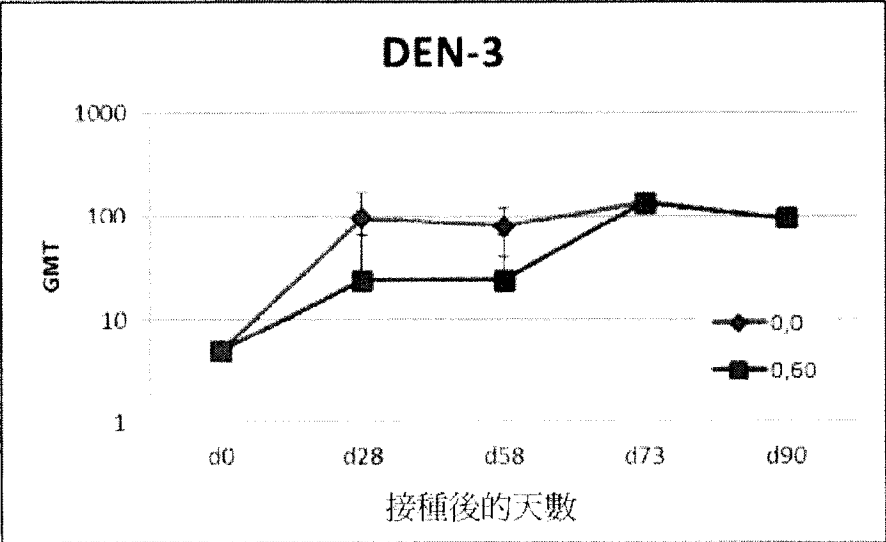


B.



接續
圖 11C-11D

C.



D.

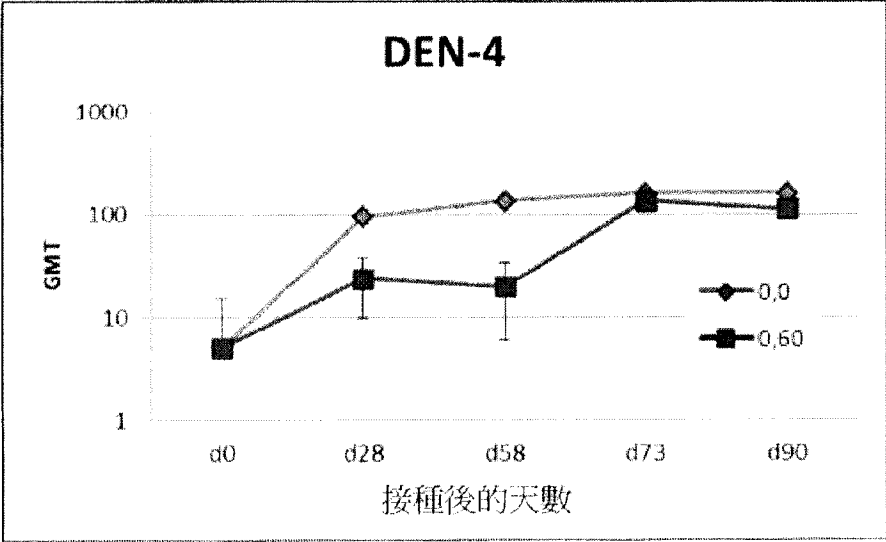
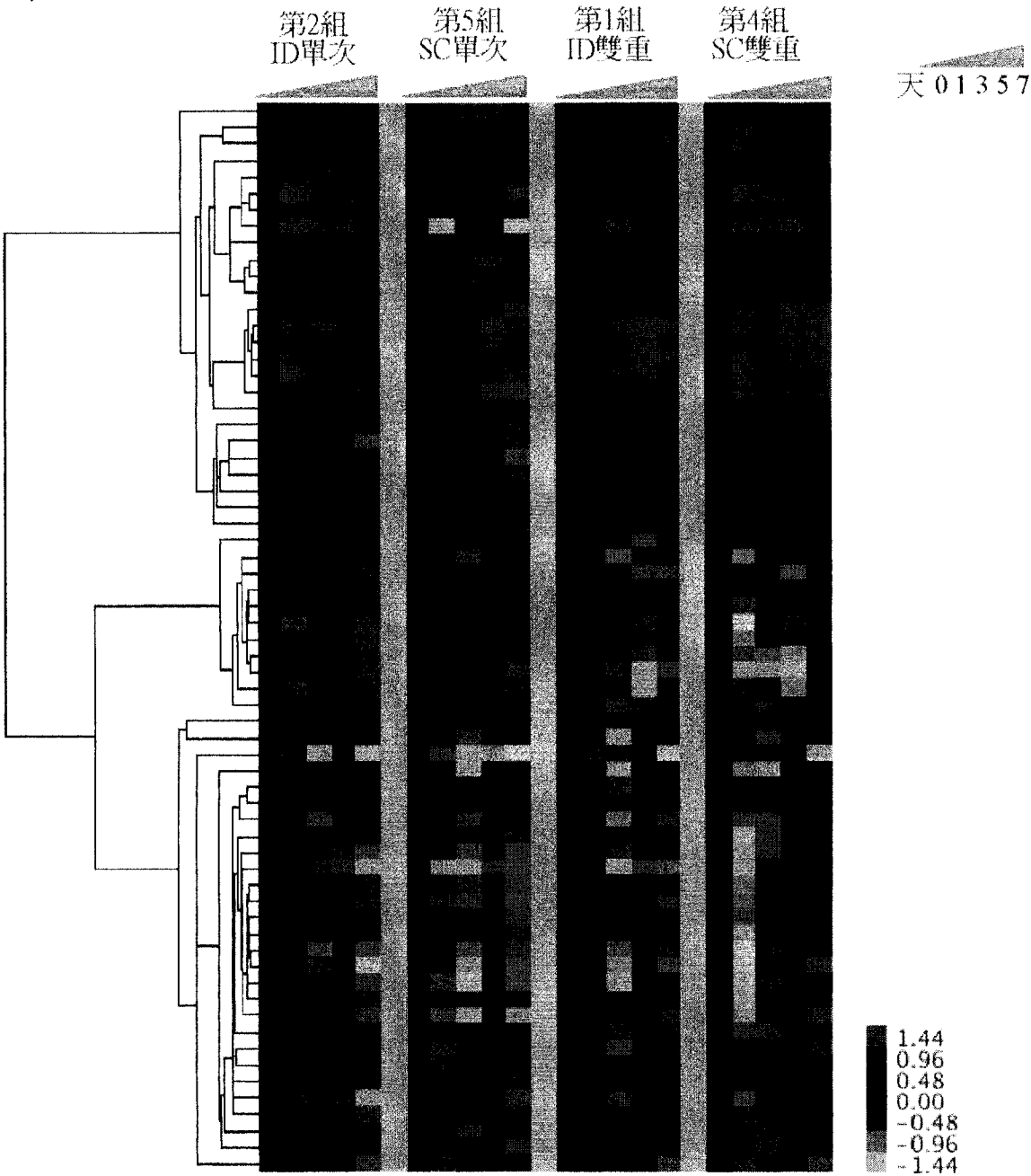


圖 12



【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)