



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102740879 B

(45) 授权公告日 2016.05.04

(21) 申请号 201180008304.7

(22) 申请日 2011.01.21

(30) 优先权数据

10305114.0 2010.02.04 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.08.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/050800 2011.01.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/095402 EN 2011.08.11

(73) 专利权人 赛诺菲巴斯德有限公司

地址 法国里昂

(72) 发明人 A·布克诺格 R·福拉特

D·克勒瓦

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 张国梁

(51) Int. Cl.

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/295(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101541344 A, 2009.09.23,

WO 03101397 A2, 2003.12.11,

KING, GAIL E 等. Simultaneous

administration of childhood vaccines: an important public health policy that is safe and efficacious. 《Pediatric Infectious Disease Journal》. 1994, 第13卷(第5期), 表2, 第398-401页.

审查员 李娟娟

权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

免疫组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供在哺乳动物中诱导针对血清型的登革病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、风疹和/或 VZV 病毒的方法和组合物。

1. 包含四种血清型的疫苗登革病毒的四价疫苗登革组合物和 MMR 疫苗组合在制备药物中的用途,所述药物用于在哺乳动物中诱导针对登革病毒的四种血清型、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒和风疹病毒的中和抗体的方法中,其中所述方法包括向所述哺乳动物给药所述包含四种血清型的疫苗登革病毒的四价疫苗登革组合物并且共同给药三价 MMR 疫苗组合物。

2. 权利要求 1 所述的用途,其中所述四价疫苗登革组合物包含 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。

3. 权利要求 1 所述的用途,其中所述四种血清型的疫苗登革病毒的量在 10^3 至 10^6 CCID₅₀ 的范围内。

4. 针对登革热、流行性腮腺炎、麻疹和风疹的免疫试剂盒,所述免疫试剂盒包含盒,所述盒至少包含 (a) 容纳三价 MMR 疫苗的第一容器,和 (b) 容纳四价登革疫苗的第二容器,所述四价登革疫苗包含四种血清型的疫苗登革病毒。

5. 权利要求 4 所述的试剂盒,其还包含第三容器,所述第三容器容纳用于重建的溶剂。

6. 权利要求 4 或 5 所述的试剂盒,其中所述容器是预填充的注射器。

7. 四价登革疫苗和三价 MMR 疫苗病毒在制备用于针对登革病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒和风疹病毒进行免疫的疫苗中的用途,其中所述四价登革疫苗包含四种血清型的疫苗登革病毒,并且其中所述四价登革疫苗在使用所述 MMR 疫苗病毒的 3 天内使用。

免疫组合物和方法

[0001] 发明背景

[0002] 登革热是继疟疾之后的第二重要的热带传染病,世界上约有一半的人口生活在存在流行传播风险的区域。每年估计有5千万至1亿例登革热(Dengue fever),导致500,000患者因出血性(hemorrhagic)登革热而就医,并导致约25,000人死亡。登革热病毒传染在超过100个热带国家流行并且出血性登革热已经在这些国家中的60个有记录(Gubler, 2002, *TRENDS in Microbiology*(微生物学趋势),10:100-103;Monath,1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*(美国科学院院刊),91:2395-2400)。

[0003] 登革热由黄病毒属(flavivirus genus)的四种病毒引起,所述病毒具有相似的血清型但是在抗原方面有所不同(Gubler等,1988,在:*Epidemiology of arthropod-borne viral disease*(节肢动物传播的疾病的流行病学)中.Monath TPM,编辑,Boca Raton (FL):CRC Press:223-60;Kautner等,1997, *J. of Pediatrics*(儿科学杂志),131:516-524;Rigau-Pérez等,1998, *Lancet*(柳叶刀),352:971-977;Vaughn等,1997, *J. Infect. Dis.*(传染病杂志),176:322-30)。”登革热病毒(dengue fever virus)”或”登革病毒(dengue virus)”是正义单链RNA病毒,其属于黄病毒科(flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus genus)。RNA基因组包含5' I型末端(type I end)但是缺少3'聚腺苷酸(poly-A)尾部。基因组的组织包含以下元件:5'非编码区(NCR)、编码结构蛋白质(衣壳(C)、前膜(pre-membrane)/膜(prM/M)、包膜(E))的区域和编码非结构蛋白质(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)的区域以及3'NCR。病毒基因组RNA结合衣壳蛋白从而形成核壳体。登革病毒基因组编码连续编码区,所述连续编码区被翻译为单个的多聚蛋白,所述单个的多聚蛋白经历翻译后加工,这对黄病毒而言是典型的。

[0004] 登革病毒被保持在包括哺乳动物和伊蚊(*Aedes mosquito*)的循环内。哺乳动物中的感染始于在被感染的伊蚊吸食血液期间登革病毒的注入,由此登革病毒主要沉积在血管外组织中。在蚊子叮咬后,病毒的潜伏期(incubation period)为约4天(3至14天)。

[0005] 哺乳动物受试者被接种后,被感染的第一类哺乳动物细胞是树突细胞,树突细胞然后迁移到淋巴神经节(Wu等,2000, *Nature Med.*(自然医学),7:816-820)。除了树突细胞,单核细胞和巨噬细胞属于登革病毒的首要目标。在皮肤和淋巴神经节中的初始复制后,在急性发热期登革病毒出现在血液中,通常为3至5天。

[0006] 一种血清型登革(dengue)的感染可能产生从非特异性病毒综合征(non-specific viral syndrome)到严重致死性出血疾病(severe fatal hemorrhagic disease)的一系列临床疾病。对登革热的常规实验室诊断是基于病毒的分离和/或对登革热病毒具有特异性的抗体的检测。原发感染可能是无症状的或者可能导致登革热。登革热表征为两个阶段的发热、头痛、身体不同部分的疼痛、衰竭、发疹和淋巴结病(Kautner等,1997, *J. of Pediatrics*(儿科学杂志),131:516-524;Rigau-Pérez等,1998, *Lancet*(柳叶刀),352:971-977)。病毒血症期(viremic period)与发热期相同(Vaughn等,1997, *J. Infect. Dis.*(传染病杂志),176:322-30)。登革热的治愈在7至10天后完成,而延长的虚弱是正常的。频繁发生白细胞和血小板数目的减少。

[0007] 登革出血热 (dengue haemorrhagic fever, DHF) 是登革病毒感染的潜在致死的并发症。DHF 表征为高烧和登革热症状,并极度嗜睡和困倦。增加的血管渗透性和异常的内稳态可能导致血量的减少、低血压,并且在严重的情况中,低血容量性休克 (hypovolemic shock) 和内出血。两种因素表现出在出血性登革热的发生中起主要作用 - 具有高水平的病毒血症的快速病毒复制 (该疾病的严重性与病毒血症的水平相关;Vaughn 等,2000, J. Inf. Dis. (传染病杂志),181:2-9) 以及具有炎症介质的高水平释放的主要的炎症反应 (Rothman 和 Ennis,1999, Virology (病毒学),257:1-6)。不经治疗,出血性登革热的致死率可以达到 10%,但是在大多数具有治疗经验 (WHO 技术指导,1986 Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control (登革出血热: 诊断、治疗和控制), p. 1-2. 世界卫生组织,日内瓦,瑞士) 的中心致死率 $\leq 1\%$ 。

[0008] 登革休克综合征 (dengue shock syndrome, DSS) 通常是 DHF 的进展并且经常是致死的。DSS 产生自导致血浆渗入到血管外空间的一般性血管炎 (vasculitis)。DSS 表征为快速和量少的 (poor volume) 脉搏、低血压、四肢冰冷和坐立不安。

[0009] 登革病毒的四种血清型具有约 60-80% 的序列同源性。一种登革血清型的感染提供持续的同源免疫性但是提供有限的异源免疫性。(Sabin,1952, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1: 30-50)。因此,随后个体可能为不同血清型感染。理论上,产生自不同血清型登革热的二次感染是 DHF 发展的危险因素。显示 DHF 的大部分患者之前曾经暴露于登革病毒的四种血清型中的至少一种。然而,DHF 是多因素的 - 因素包括涉及的病毒株以及患者的年龄、免疫状态和遗传素质。据信,同源的再次感染后,对该血清型具有特异性的抗体与表面蛋白结合并防止病毒结合目标细胞。然而,异源登革血清型的再次感染后,异源病毒将激活免疫系统以攻击,好像它是第一血清型那样。这些针对之前血清型的抗体结合病毒,但不使其失活。免疫应答吸引众多巨噬细胞,然后异源血清型将感染所述巨噬细胞。假说认为当个体随后被不同登革血清型感染时,由在前的登革血清型感染产生的抗体可以产生严重性增强的症状。因此,需要针对所有登革的四种血清型来对个体进行免疫。

[0010] 没有针对登革热的特殊治疗。对登革热的治疗是针对症状的,卧床休息,通过解热药和镇痛剂控制发热和疼痛,以及充足的饮水。出血性登革热的治疗需要平衡液体损失,替换凝固因子以及输注肝素。

[0011] 尤其易受登革病毒感染影响的一类人是儿童。在儿童中,登革病毒感染的影响更严重。虽然,多种儿科疫苗的应用已经减轻了多种儿科人群疾病的治疗,但是这些疫苗被推荐的给药产生增加的复杂性和密集的疫苗接种时间表。目前用于给药登革疫苗的方案预期需要多种疫苗以保证实现针对所有血清型的保护。将此登革疫苗接种时间表增加到本已密集的儿童疫苗接种时间表中产生对推荐的儿科疫苗接种时间表顺从的问题,尤其是在世界上难以获得常规医疗可用性的那些地区。不幸地,这些相同的地区就是急迫需要登革热治疗的地区。因此,需要通过共同给药来联合多种疫苗以增强对推荐的疫苗接种时间表的顺从。

[0012] 通过将多种疫苗接种结合为单一剂型,已经成功地使疫苗接种频率最小化。然而,在单一剂型中的不同试剂之中存在不相容的可能性。此外,多种疫苗的单次给药还产生有效疫苗接种的问题。只要组合地给药多价疫苗 (或共同给药多种疫苗),该组合的每个个体抗原就会诱导免疫应答。可能抑制免疫系统充分响应所有被给药的抗原的能力,并且对一

种或多种抗原不提供持续的保护性应答。

[0013] 本发明通过提供能够使流行性腮腺炎、麻疹和风疹免疫接种与针对登革血清型 1、2、3 和 4 的登革免疫接种同时进行的方法和组合物来解决上述需要。

[0014] 发明详述

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供在哺乳动物中诱导针对登革病毒的四种血清型和麻疹病毒的中和抗体的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给药登革疫苗组合物并且共同给药麻疹疫苗组合物。

[0016] 在一个实施方案中,本发明提供在哺乳动物中诱导针对登革病毒的四种血清型 (four serotypes of dengue virus)、流行性腮腺炎病毒 (mumps virus)、麻疹病毒 (measles virus) 和风疹 (rubella) 的中和抗体的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给药登革疫苗组合物并且共同给药 MMR 疫苗组合物。

[0017] 在一个实施方案中,本发明提供在哺乳动物中诱导针对登革热的四种血清型、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹和 VZV 的中和抗体的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给药登革疫苗组合物并共同给药 MMRV 疫苗组合物。

[0018] 在一个实施方案中,本发明提供在哺乳动物中诱导针对登革病毒的四种血清型、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒和风疹以及白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和 Hib 抗原的中和抗体的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给药登革的四种血清型的疫苗登革病毒并且共同给药 MMR 疫苗组合物,继之以给药包含白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和 Hib 抗原的组合物。

[0019] 在一个本发明的实施方案中,通过给药四价疫苗病毒组合物来实现登革的四种血清型的疫苗登革病毒的给药。

[0020] 在本发明的一个实施方案中,通过两种二价疫苗登革病毒组合物的共同给药来实现登革的四种血清型的疫苗登革病毒的给药。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,通过给药包含 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4 的四价疫苗病毒组合物来实现登革的四种血清型的疫苗登革病毒的给药。

[0022] 在本发明的一个实施方案中,通过四价疫苗病毒组合物的给药来实现登革的四种血清型的疫苗登革病毒的给药,在所述四价疫苗病毒组合物中,血清型 1、2、3 和 4 的登革热的疫苗病毒的量处于 10^3 至 10^6 CCID₅₀ 的范围内。

[0023] 单价 ; 双价等

[0024] 除了药用赋形剂之外还包含来源于单个微生物株、设计用于诱导出针对特定病原体的中和抗体应答的抗原时,一剂药物 (dose)、组合物或疫苗被称为“单价的”,而当其包含来源于多株、设计用于诱导出针对多种病原体的中和抗体的抗原时,一剂药物、组合物或疫苗被称为多价的。所用术语与常规术语一致。例如,当其分别包含用于诱导出针对两种、三种或四种病原体的中和抗体的抗原时,一剂药物、组合物或疫苗被认为是双价、三价或四价的。多价组合物可以通过简单地混合单价组合物来制备。这种多价组合物可以提前在制造时制备或者可以由最终用户在向受试者给药时组合。登革病毒的四种血清型的疫苗病毒的给药可以通过单价或双价疫苗登革病毒的共同给药或四价疫苗登革病毒组合物的给药来实现。当用于本文时,“四价登革组合物”包含诱导针对所有登革的四种血清型的中和抗体的抗原。

[0025] 疫苗登革组合物：

[0026] 术语“疫苗登革组合物”指包含疫苗登革病毒和 / 或登革免疫蛋白的组合物。疫苗登革组合物可以包含一种或多种疫苗登革病毒、一种或多种登革免疫蛋白或一种或多种疫苗登革病毒和一种或多种登革免疫蛋白的组合。

[0027] 疫苗登革病毒

[0028] 在本发明的环境中，“疫苗登革病毒”是指能够通过向有免疫力的哺乳动物给药这种疫苗登革病毒来诱导针对一种或多种血清型的登革病毒的中和抗体的登革病毒。疫苗登革病毒的实例包括失活的登革病毒、减毒登革病毒和嵌合登革病毒。登革病毒的血清型包括血清型 1、2、3 和 4。

[0029] 失活的登革病毒

[0030] 如果病毒不能够在允许野生型病毒复制的细胞中以任何显著的程度复制，则它被认为是“失活的”。可以通过本领域技术人员已知的多种方法使病毒失活，所述方法包括但不限于连续传代、遗传操作、化学处理或辐射（包括热或电磁辐射，其典型地以 X 射线或紫外线辐射的形式）。失活的登革病毒描述于于 2001 年 7 月 3 日颁发的美国专利号 6, 254, 873 中。

[0031] 减毒登革病毒

[0032] “减毒病毒”是这样的病毒，其在许可宿主细胞 (permissive host cell) 中复制，但是其复制效率相对于相同细胞类型中的野生型病毒显著降低。减毒病毒可以复制到一定小的范围程度，其在哺乳动物中不诱发与野生型病毒相关的疾病状态。减毒病毒的实例是本领域中已知的。减毒病毒可以由例如野生型病毒通过重组 DNA 技术、定点突变、遗传操作、连续传代、化学处理、化学诱变或电磁辐射制备。用于本发明的减毒病毒在大多数免疫接种的个体中可能产生适度强度的（即中等至轻微，或无）副作用，同时保持其在哺乳动物中诱导中和抗体的能力。

[0033] 虽然减毒病毒在典型的宿主细胞中以小于野生型病毒的程度复制，但是这种减毒病毒可以在能够补足减毒病毒中遭破坏的功能的细胞（“生产细胞”）中有效地制备。生产细胞可以是许可宿主细胞 (permissive host cell) 天然存在的变体或者可以通过其他方式如重组 DNA 技术产生。在使用重组 DNA 技术制备经改造的生产细胞中，通过插入补足减毒病毒中遭破坏的功能的外源核酸来对细胞进行修饰。这种外源核酸可以被引入到细胞的基因组中或者可以保持在染色体外。

[0034] 在实施本发明的环境中使用的疫苗登革病毒可以是减毒登革病毒。减毒登革病毒可以来源于登革病毒血清型 1、2、3 或 4。在一个实施方案中，减毒登革病毒是在许可细胞类型中具有比相同细胞类型中的野生型病毒低至少一个数量级的复制效率的减毒登革病毒。在其他实施方案中，将减毒登革病毒减毒以使其复制到相对于相同细胞类型中的野生型病毒的至少两个数量级、三个数量级、四个数量级、五个数量级、六个数量级、七个数量级以上的程度。

[0035] 在一个实施方案中，疫苗登革病毒是减毒登革病毒，其在 37°C 或 39°C 在 Huh-7、VERO 和 / 或 C6/36 肝细胞中的生长产生最大效价，所述最大效价比利用野生型亲株在相同培养条件下并且当使用用于确定效价的给定方法测量时获得的最大效价小至少 10 倍。用于实施本发明的减毒疫苗登革病毒的实例包括 VDV-1、VDV-2 以及在例如申请 W002/66621、

W00057904、W00057908、W00057909、W00057910、W002/0950075 和 W002/102828 中描述的毒株。

[0036] “VDV” 或 “Vero 登革疫苗” 是指这样的减毒登革病毒, 其能够在 Vero 细胞中复制并且能够在哺乳动物中诱发特异性体液应答, 包括诱导中和抗体。“VDV-1” 是来源于野生型 DEN-1 16007 株的病毒, 其经历了通过 PDK 细胞的 11 次传代 (DEN-1 16007/PDK11) 并且随后在 Vero 细胞中在 32°C 被扩增, 将其 RNA 纯化并转染到 Vero 细胞中。VDV-1 株与 DEN-116007/PDK13 疫苗株 (通过 PDK- 原代犬肾- 细胞传代 13 次) 相比具有 14 个额外的突变。DEN-116007/PDK13 株 (也被称为 “LAV1”) 已经描述于以 Mahidol 大学名义的专利申请 EP1159968 中并且已经提交给了 National Microorganisms Cultures Collection (国家微生物保藏中心) (CNCM), 编号为 I-2480。制备和表征 VDV-1 株的方法已经描述于以 Sanofi-Pasteur 和疾病控制和防治中心 (Center for Disease Control and Prevention) 名义的以编号 PCT/IB 2006/001313 提交的国际专利申请中。

[0037] “VDV-2” 是这样的毒株, 其获得自野生株 DEN-216681 并且已经通过 PDK 细胞经历了 50 次传代 (DEN-2 16681/PDK50), 进行平板纯化, 抽提和纯化其 RNA, 然后转染到 Vero 细胞中。VDV-2 株随后通过平板纯化和在 Vero 细胞中的扩增获得。VDV-2 株相比 DEN-2 16681/PDK53 疫苗株 (通过 PDK 细胞传代 53 次) 具有 10 个额外的突变, 其包括 4 个沉默突变。DEN-216681/PDK53 株 (也被称为 “LAV2”) 已经描述于以 Mahidol 大学名义的专利申请 EP1159968 中, 并且已经提交给了国家微生物保藏中心 (CNCM), 编号为 I-2481。制备和表征 VDV-2 株的方法已经描述于以 Sanofi-Pasteur 和疾病控制和防治中心 (Center for Disease Control and Prevention) 名义的以编号 PCT/IB 2006/001513 提交的国际专利申请中。

[0038] VDV 1 和 2 株通过在 Vero 细胞中的扩增制备。收集制备的病毒并通过过滤从细胞碎片中净化。通过用酶处理来消化 DNA。通过超滤除去杂质。可以通过浓缩方法增加感染效价。在加入稳定剂后, 在使用前将毒株以冻干或冷冻形式存储, 然后当需要时使其重建 (reconstitution)。

[0039] 嵌合登革病毒

[0040] 本发明的疫苗登革病毒也可以是嵌合登革病毒。嵌合登革病毒是非登革病毒, 其基因组被修饰成编码登革病毒的包膜蛋白以致嵌合登革病毒对细胞的感染导致登革病毒的包膜蛋白在感染细胞中的表达。用于制备嵌合登革病毒的非登革病毒可以来源于野生型或失活的非登革病毒。用于外源核酸在哺乳动物细胞中的转移和表达以及用于制备登革嵌合病毒的非登革病毒的实例在本领域中是已知的。可以用于构建嵌合登革病毒的非登革病毒的示例性实例包括黄病毒、痘病毒 (poxvirus)、腺病毒和腺相关病毒。在本发明的一个实施方案中, 非登革病毒是野生型或减毒黄病毒。在本发明的一个实施方案中, 非登革病毒是减毒黄热病毒, 其中这种减毒热病毒的病毒基因组已经被修饰为编码登革病毒血清型的 prM 和 E 基因。嵌合登革病毒导致登革包膜蛋白在感染的细胞中的表达, 并诱发免疫应答, 所述免疫应答包括抗体中和作为该登革包膜蛋白来源的登革血清型, 可以因此用于本发明的环境中。可用于实施本发明的嵌合病毒的实例包括描述于专利申请 W0 98/37911 中的登革登革 /YF 嵌合病毒, 以及登革 / 登革热嵌合体, 如描述于专利申请 W09640933 和 W00160847 中的那些。

[0041] 在一个实施方案中,嵌合 YF/ 登革病毒包含减毒的黄热病毒株 YF17D(Theiler M 和 Smith H. H. (1937) J. Exp. Med. (实验医学杂志), 65, p. 767-786) (病毒 YF17D/DEN-1、YF17D/DEN-2、YF17D/DEN-3、YF17D/DEN-4) 的基因组构架 (backbone)。可以使用的 YF17D 株的实例包括 YF17D204 (YF-Vax® , Sanofi-Pasteur, Swifwater, PA, 美国 ;Stamaril®, Sanofi-Pasteur, Marcy l'Étoile, 法国 ;ARILVAX™, Chiron, Speke, Liverpool, 英国 ; FLAVIMUN®, Berna Biotech, Bern, 瑞士 ;YF17D-204 法国 (X15067, X15062) ; YF17D-204, 234 美国 (Rice 等, 1985, Science (科学), 229 :726-733), 或此外相关的毒株 YF17DD (Genbank 登录号 U17066)、YF17D-213 (Genbank 登录号 U17067) 以及由 Galler 等描述的毒株 YF17DD (1998, Vaccines (疫苗), 16 (9/10) :1024-1028)。可以用于人的任何其他减毒黄热病毒株可以用于构建本发明环境中的嵌合体。

[0042] 适用于实施本发明的嵌合登革病毒的一个实例是 " Chimerivax™ 登革 " 或 " CYD " , 其是一种包含 YF 病毒基因组骨架的嵌合黄热 (YF) 病毒, 其中编码前膜 (prM) 和包膜 (E) 蛋白的序列已经被编码登革病毒的相应的结构蛋白的核酸序列替代。可以基本根据 Chambers 等 (1999) J Virology (病毒学杂志) 73 (4) :3095-3101 的教导完成嵌合 Chimerivax 病毒的构建。包含血清型 1 登革热株 (DEN-1) 的 prM 和 E 序列的嵌合登革病毒被称为 " CYD-1 或 CYDDEN1 " 。包含 DEN-2 株的 prM 和 E 序列的嵌合 YF 被称为 " CYD-2 或 CYD DEN2 " 。包含 DEN-3 株的 prM 和 E 序列的嵌合 YF 病毒被称为 " CYD-3 或 CYD DEN3 " 。含 DEN-4 株的 prM 和 E 序列的嵌合登革病毒被称为 " CYD-4 或 CYD DEN4 " 。这些登革 Chimerivax™ 病毒的制备已经详细描述于国际专利申请 WO 98/37911 和 WO 03/101397 中, 为准确描述它们的制备方法可以参考所述专利申请。实施例中描述的嵌合体通过使用来自毒株 DEN 1PU0359 (TYP1140)、DEN2 PU0218、DEN3 PaH881/88 和 DEN 4 1228 (TVP980) 的 prM 和 E 序列来制备。备选地, 其他登革热病毒株可以被用作核酸源以有助于可用于实施本发明的嵌合病毒的构建。

[0043] 血清型 1 登革病毒的疫苗登革病毒的实例可以例如是疫苗株 VDV1 或 Chimerivax™ DEN-1 (包含 DEN-1 16007/PDK13 株的 prM 和 E 基因的 YF17D/DEN-1 嵌合病毒)。血清型 2 登革病毒的疫苗病毒的实例是疫苗株 VDV2 或 Chimerivax™ DEN-2 (包含 DEN-2 16681/PDK53 株的 prM 和 E 基因的 YF17D/DEN-2 嵌合病毒)。血清型 3 登革病毒的疫苗病毒的实例是 Chimerivax™ DEN-3 (YF17D/DEN-3 嵌合病毒)。血清型 4 登革病毒的疫苗病毒的实例是 Chimerivax™ DEN-4 (YF 17D/DEN-4 嵌合病毒)。技术人员可以参考上述公布的国际专利申请以获得对提及的毒株的详述、用于获得它们以及构建这些嵌合病毒的方法。

[0044] 登革免疫蛋白

[0045] 登革疫苗组合物也可以包含登革免疫蛋白。登革免疫蛋白是当被给药于具有免疫力的哺乳动物时诱导针对登革血清型 1、2、3 和 / 或 4 的血清中和抗体的登革结构蛋白或其衍生物。登革免疫蛋白包括登革结构蛋白的天然、衍生化或变性形式, 包括其化学缀合物、免疫学片段和融合蛋白。

[0046] 登革病毒的基因组序列和组织在本领域中得到充分表征, 这有助于此类蛋白的重组制备。参见例如 Sughrue 等 (1997) J. General Virology (普通病毒学杂志) 78 (8) : 1861-1866。登革病毒粒由三种结构蛋白构成 : 基因组相关的衣壳蛋白、在病毒成熟期间通过由糖基化前体蛋白 (prM) 的内部切割产生的膜相关蛋白 (M) 以及定位于膜的血细胞凝集

包膜蛋白(E)。据信,E是血清型特异性的主要抗原决定簇(Markoff,J.(1989)J Virol.(病毒学杂志)63(8):3345-3352)。然而,prM基因的产物(糖基化的M蛋白及其片段)也具有能够引发特异性免疫应答的抗原能力(Vasquez等(2002)Vaccine 20:1823-1830)。登革包膜蛋白的重组表达是本领域中已知的。见例如Zhao等(1987)J Virol.(病毒学杂志)61:4019-4022。备选地,登革结构蛋白可以分离自登革病毒粒或登革病毒感染的细胞。

[0047] 登革结构蛋白可以被给药于哺乳动物以引发特异性免疫应答从而诱导针对登革的四种血清型的血清中和抗体。这种结构蛋白可以天然的、衍生化的或变性的形式给药。可以使用常规变性方法来实现登革结构蛋白的变性,所述方法如热或化学变性剂化学品如甲醛或 β -丙内酯。备选地,这种登革表面蛋白的亚基可以用于引发只对一种或多种血清型的登革的免疫应答。登革结构蛋白的免疫活性表位描述于文献中。本发明的登革疫苗组合物包括针对登革血清型的单价亚基疫苗并且包括能够引发针对多种登革血清型的免疫应答的多价登革亚基疫苗。

[0048] 此类登革结构蛋白,其衍生物及亚基也可以与载体分子缀合以提供可用于在有免疫力的哺乳动物中产生中和抗体并且可用于实施本发明的缀合登革抗原。这种缀合可以通过以下方法实现:化学缀合技术或包含登革结构蛋白或其免疫活性亚基及载体蛋白的融合蛋白的重组表达。可用于制备可用于实施本发明的缀合物的载体分子的实例包括白喉类毒素(diphtheria toxoid)、破伤风类毒素(tetanus toxoid)、破伤风毒素的C片段、白喉毒素的突变体,包括CRM 197、CRM 176、CRM228、CRM 45、CRM9、CRM 45、CRM 102、CRM 103和CRM 107,肺炎球菌的肺炎球菌溶血素(pneumococcal pneumolysin)、OMPC、热休克蛋白、百日咳蛋白、肺炎球菌表面蛋白PspA或艰难梭菌(*C. difficile*)的毒素A或B。

[0049] 流行性腮腺炎、麻疹和风疹疫苗组合物

[0050] 包含流行性腮腺炎、麻疹和风疹病毒的疫苗组合物在本领域中一般被称为“MMR”疫苗。在本发明的实施中,MMR疫苗可以通过同时给药单价流行性腮腺炎、单价麻疹和单价风疹疫苗组合物来实现。备选地,MMR疫苗可以通过包含减毒或失活的流行性腮腺炎、麻疹和风疹病毒的三价组合物来实现。此外,MMR疫苗通过失活的或减毒的水痘带状疱疹病毒(varicella zoster virus,VZV)进行补充,该疫苗被称为MMRV疫苗。

[0051] 用于预防麻疹、流行性腮腺炎、风疹和/或VZV的单价和多价疫苗组合物可以单独地或组合地用于实施本发明。用于预防麻疹、流行性腮腺炎、风疹和/或VZV的疫苗组合物的制备是本领域技术人员已知的。可用于制备麻疹疫苗组合物的麻疹株的实例包括Enders-Edmonston、Edmonston-Zagreb和Schwarz麻疹株。单价麻疹疫苗组合物也被称为“麻疹疫苗”。可用于制备疫苗流行性腮腺炎组合物的流行性腮腺炎病毒株的实例包括Jeryl Lynn、Urabe AM 9、RIT 4385和Rubini株。可用于制备疫苗风疹组合物的风疹病毒株的实例包括Wistar RA 27/3和Wistar RA 27/3M株。已经批准单价流行性腮腺炎、麻疹和风疹疫苗可用于人类并且可商购。可用于制备疫苗VZV组合物的VZV株的实例包括Oka/Merck和Oka株。可用于实施本发明的市售单价流行性腮腺炎疫苗的实例是MumpsVax®疫苗(Merck & Co,Whitehouse Station,NJ,USA)。可用于实施本发明的市售单价麻疹疫苗的实例是Attenuvax®疫苗(Merck & Co,Whitehouse Station,NJ,USA)。可用于实施本发明的市售单价风疹疫苗的实例是Meruvax®II疫苗(Merck & Co,Whitehouse Station,NJ,USA)。市售单价减毒VZV疫苗的实例包括Varivax®和Zostavax®疫苗(Merck & Co,

Whitehouse Station, NJ, USA) 和 Okavax (Sanofi Pasteur SA, Lyon FR)。

[0052] 备选地, 流行性腮腺炎、麻疹和风疹疫苗组合物可以提供在三价疫苗组合物中。可以使用上述流行性腮腺炎、麻疹和风疹病毒的疫苗株来制备三价 MMR 疫苗。用于针对流行性腮腺炎、麻疹和风疹的疫苗接种的三价 MMR 组合物已经被管理当局批准为可安全且有效的供人类使用并且可商购。市售三价 MMR 疫苗组合物的实例包括 **M-M-R®** II 疫苗 (购自 Merck & Co, Whitehouse Station, NJ USA)、Triviraten **Berna®** (也被称为 Berna-MMR) 疫苗 (购自 Berna Biotech, Basel, Switzerland)、Priorix™ 疫苗 (购自 Glaxo SmithKline Biologics, Rixensart, Belgium) 以及 **Trimovax®** 疫苗 (购自 Sanofi Pasteur SA, Lyon, France)。

[0053] 备选地, 麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 / 或 VZV 疫苗用于四价疫苗组合物。可以使用上述麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 / 或 VZV 的疫苗株来制备三价 MMRV 疫苗。用于针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 / 或 VZV 的疫苗接种的四价 MMR 组合物已被批准可用于人类并且是可商购的。四价 MMR 疫苗组合物的实例是可商购的如 ProQuad (Merck and Company, Whitehouse Station NJ USA) 和 Priorix **Tetra®** (购自 Glaxo SmithKline Biologics, Rixensart, Belgium)。

[0054] 诱导中和抗体

[0055] 在本发明的环境中, “疫苗组合物”是指包含免疫有效量的抗原的组合物, 所述免疫有效量的抗原足以在有免疫力的哺乳动物中引起包括针对病原体的中和抗体的特异性免疫应答。可用于实施本发明的疫苗组合物的实例是 (单独地以及共同地) 疫苗登革组合物、疫苗登革病毒、疫苗登革免疫蛋白、麻疹疫苗、流行性腮腺炎疫苗组合物、VZV 疫苗组合物、风疹疫苗组合物、MMR 疫苗和 MMRV 疫苗。根据上下文, 当本发明的某些程序或方面可施用于各类组合物的一个或多个实例时, 该术语被共同地或单独地使用。

[0056] 对针对登革血清型、流行性腮腺炎、麻疹风疹和 / 或 VZV 的血清中和抗体的检测在科学文献中是已知的。这种登革血清中和测定的实例描述于以下实施例 1 中。备选地, 有用于鉴定针对登革、流行性腮腺炎、麻疹和风疹的血清中和抗体的可商购的试剂盒。当如此确定的中和抗体的效价不低于 1 : 10 (统一 : 1/ 稀释) 时, 认为血清样品存在针对疫苗组合物的中和抗体。在备选实施方案中, 当连续稀释因子为 16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096 或更大时, 来自接受了登革疫苗组合物给药的哺乳动物的血清样品显示存在针对登革结构蛋白的血清中和抗体。

[0057] 哺乳动物 :

[0058] 术语哺乳动物包括哺乳动物家族的个体, 包括牛、狗、马、灵长类动物、人类、猪、兔、猫。已经证明, 登革病毒能够感染除人以外还包括啮齿类动物和有袋类动物在内的哺乳动物。见例如 Dengue infection in neotropical forest mammals (新热带森林哺乳动物中的登革感染), deThoissy 等 (2009) Vector Borne Zoonotic Disease (载体携带的动物传染病) 9(2) : 157-70。适于给予本发明的组合物和方法的哺乳动物的实例包括从未暴露于登革、麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 / 或 VZV 病毒的 (即免疫上首次的) 哺乳动物或之前已经暴露于一种或多种登革病毒血清型和 / 或麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 / 或 VZV 的哺乳动物 (包括已经显示与登革、流行性腮腺炎、麻疹、VZV 或风疹病毒感染相关的一种或多种疾病状态的症状的哺乳动物) (即非首次的) 两者。有免疫力的哺乳动物是这样的哺乳动物,

当所述哺乳动物暴露于疫苗组合物时,具有能够引发血清中和抗体产生的功能免疫系统。

[0059] 持久

[0060] 如果当在疫苗接种后的时间点采样时,哺乳动物的血清维持针对被接种的疫苗组合物所来源的病原体的血清中和抗体的存在,则针对疫苗组合物的免疫应答被认为是“持久的”。在本发明的环境中,当在哺乳动物中本发明的疫苗组合物针对被给药的抗原显示 1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32 以上的效价达 90 天、120 天、150 天、180 天、210 天、240 天、270 天、300 天、330 天、一年、两年、5 年或更长时,则证明了持久的免疫应答。

[0061] 免疫:

[0062] 术语“接种”指给药疫苗组合物。术语“免疫”是指在有免疫力的哺乳动物中对接种疫苗组合物的生物学应答,其导致针对所述抗原所来源的病原体的中和抗体的持久存在。对用单一疫苗组合物接种的应答可以导致产生针对单一病原体、所述病原体的变体或不同病原体(被称为交叉反应性)的血清中和抗体。本发明的疫苗组合物可以显示交叉反应性以致针对多种病原体或相同病原体的不同变体来免疫有免疫力的哺乳动物。如果哺乳动物持久地维持针对病原体的血清中和抗体,并且保持可诱导的免疫记忆(所述可诱导的免疫记忆允许所述哺乳动物产生足够的针对所述病原体的中和抗体从而在用所述病原体再次挑战时最小化或避免在所述哺乳动物中的与所述病原体相关的疾病状态的症状),则认为哺乳动物相对于特定病原体被“免疫”。

[0063] 疫苗登革病毒剂量:

[0064] 包含在单位剂型中的疫苗病毒组合物的量通常以病毒空斑形成单位(PFU)或感染 50% 组织培养物的剂量或感染 50% 细胞培养物的剂量(CCID₅₀)表示。例如,对于单价或四价组合物,根据本发明的组合物可以包含 10 至 10⁶CCID₅₀,尤其 10³至 10⁵CCID₅₀的血清型 1、2、3 或 4 的疫苗登革病毒。因此,在根据本发明的组合物或应用中,血清型 1、2、3 和 4 的疫苗登革病毒的剂量优选各自落入 10 至 10⁶CCID₅₀的范围内,如 10、10²、10³、10⁴、10⁵或 10⁶CCID₅₀,尤其在 10³至 10⁵CCID₅₀的范围内。疫苗病毒可以以相同或不同剂量使用,所述剂量可以相对于所用疫苗病毒的性质和所获得的免疫应答的强度来调节。

[0065] 备选地,包含在单位剂型中的疫苗病毒组合物可以被描述为在给定制剂中的病毒颗粒的量或浓度。病毒颗粒的量或浓度可以使用常规分光光度法或免疫测定方法来确定。使用给定的确定 PFU 的测定方法,技术人员可以容易地建立这种测定的标准曲线从而容易地将 PFU 剂量转化为基于病毒颗粒量或浓度的剂型。

[0066] 根据根据本发明的方法的特别的实施方案,减毒疫苗登革病毒在单价和四价组合物或疫苗中的量为 10³至 10⁵ CCID₅₀。根据特别的实施方案,单价疫苗包含 10⁴ CCID₅₀的 VDV1 或 VDV2,优选 VDV2。根据特别的实施方案,四价疫苗包含 10⁵ CCID₅₀的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4(CYDDEN-1、2、3、4)。根据一个有利的实施方案,四价疫苗包含 10⁵ CCID₅₀的 Chimerivax™ DEN-1、2 和 3 以及 10³ CCID₅₀的 Chimerivax™ DEN-4。在本发明的另一个实施方案中,在 0.5ml 的单位剂量体积中给予包含 5±1log₁₀ CCID₅₀编码登革血清型 1、2、3 和 4 的 prM 和 E 基因的减毒 Chimerivax 病毒的四价登革疫苗组合物。

[0067] 单位剂型的配制:

[0068] 本发明的疫苗组合物还可以包含一种或多种药用载体(vehicle)。术语“载体”指通常用于药物和疫苗的制剂以增强活性试剂的稳定性、无菌性和递送能力的化合物。合适

的载体以及它们的制备描述于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington 药物科学), 第 16 版, A. Osol, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA (1980) 和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 19 版, A. R. Gennaro, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) 中。

[0069] 当疫苗组合物被配制为溶液或混悬液时, 免疫活性试剂被提供在药用载体中, 优选水性载体。可以使用多种水性载体, 例如水、缓冲的水、0.8% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸等。可以通过常规、已知的技术对这些组合物进行杀菌, 所述技术包括经由 0.2 微米孔滤膜的无菌过滤。可以将所得的水溶液密封以供使用。备选地, 可以将水溶液冻干, 在给药前, 利用无菌水溶液使冻干的制剂重建。

[0070] 根据近似生理条件的需要, 疫苗组合物可以任选地包含药用辅助物质, 如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、湿润剂等, 例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸脱水山梨糖酯 (sorption monolaurate)、三乙醇胺油酸酯、人血清清蛋白、必需氨基酸、非必需氨基酸、L-精氨酸盐酸盐、蔗糖、无水 D-海藻糖、山梨糖醇、三(羟甲基)氨基甲烷和/或尿素。此外, 疫苗组合物可以任选地包含药用添加剂, 所述药用添加剂包括例如稀释剂、粘合剂、稳定剂和防腐剂。

[0071] 本发明的疫苗组合物的单位剂量制剂可以包含在产品试剂盒中, 所述产品试剂盒包含冻干形式的疫苗病毒和用于使冻干产物重建的溶液。本发明的重组病毒可以通过常规程序冻干和重建。这种用于使冻干的疫苗组合物重建的溶液可以是包含缓冲剂、有机或无机盐以及增溶剂的水溶剂。

[0072] 佐剂

[0073] 疫苗组合物可以任选地包含一种或多种佐剂以增强疫苗组合物在哺乳动物中的免疫原性。合适的佐剂包括铝盐如氢氧化铝凝胶或磷酸铝或明矾, 但是也可以是钙、镁、铁或锌的盐, 或者可以是酰化酪氨酸或酰化糖、阳离子或阴离子衍生化的糖类, 或聚磷腈的不溶的混悬剂。

[0074] 备选地, 佐剂可以是水包油乳剂佐剂 (EP 0399843B), 以及水包油乳剂和其他活性试剂的组合 (WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241)。已经描述了其他油乳剂佐剂, 如油包水乳剂 (美国专利号 5, 422, 109; EP 0480982B2) 和水包油包水 (water-in-oil-in-water) 乳剂 (美国专利号 5, 424, 067; EP 0480981B)。这种佐剂的实例包括 MF59、AF03、AF04、AF05、AF06 及其衍生物。

[0075] 备选地, 佐剂可以是皂苷、脂质 A 或其衍生物、免疫刺激寡核苷酸、烷基葡萄糖酰胺磷酸酯。水包油乳剂或其组合。皂苷的实例包括 Quil A 及其经纯化的片段如 QS7 和 QS21。

[0076] 给药途径:

[0077] 本发明的疫苗组合物的给药或共同给药可以通过经皮、皮下、肌肉内或皮内注射实现。可以使用常规皮下注射器或安全注射器如可购自 Becton Dickinson Corporation (Franklin Lakes, NJ, USA) 的那些或射流式注射泵 (jet injector) 来给药疫苗组合物。对于皮内给药, 可以采用常规皮下注射器, 使用 Mantoux 技术, 或也可以被采用专门的皮内递送设备如 BD Soluvia™ 微注射系统 (Becton Dickinson Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA)。

[0078] 给药方案

[0079] 在本发明的一个实施方案中,将包含登革的四种血清型的疫苗登革组合物与 MMR 疫苗一起共同给药于有免疫力的哺乳动物。在本发明的一个实施方案中,将包含登革的四种血清型的疫苗登革组合物与单价麻疹疫苗一起共同给药于有免疫力的哺乳动物。在本发明的一个实施方案中,将包含登革的四种血清型的疫苗登革组合物与 MMRV 疫苗一起共同给药于有免疫力的哺乳动物。术语共同给药是指在 3 天、2 天、24 小时、12 小时、6 小时、3 小时、2 小时、1 小时、30 分钟、15 分钟内或同时将组合物给药于个体。在一个实施方案中,在一个实施方案中,有免疫力的哺乳动物是年龄小于 48、36 或 24 个月的人。

[0080] 在一个实施方案中,本发明提供多步给药方案。在 T_0 时刻进行登革疫苗组合物和单价麻疹、MMR 或 MMRV 疫苗组合物的起始的共同给药,并且可以在 T_0 后的约 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个月的日期通过登革的四种血清型的疫苗登革组合物的第二次给药的给药来加强。在一个实施方案中,此起始共同给药事件可以通过如下给药来补充:在 T_0 后的约 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个月的日期的登革的四种血清型的疫苗登革组合物的第二次给药(在被称为 T_1 的日期给药此第二次给药)以及在 T_1 后的约 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个月的日期的登革的四种血清型的疫苗登革组合物的第三次给药(在被称为 T_2 的日期给药此第三次给药)。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明提供这样的给药方案,其中在 T_1 和 T_2 之间的中间时间点,哺乳动物被给药以包含白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和 Hib 抗原(本文中称为“组合(combo)”)疫苗的疫苗组合物。在 T_1 后的约 1、2、3、4、5 或 6 个月的日期给药该组合疫苗,然后继之以在 T_2 给药四价疫苗登革组合物。

[0082] 在如本文所示例的本发明的一个实施方案中,根据以下步骤,针对登革的四种血清型、流行性腮腺炎、麻疹和风疹对人进行免疫:

[0083] (1) 在 T_0 时刻,给人在一只手臂中皮下注射 0.5ml 体积的 CYD DEN12、3、4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀ 的四价疫苗并且在另一支手臂中皮下注射以 MMR 疫苗。两次注射在 3 个小时内进行。在一个实施方案中,该人在 T_0 时刻的年龄小于 36 个月。在一个实施方案中,MMR 疫苗是 **Trimovax®** (Sanofi Pasteur Lyon FR)。

[0084] (2) 在 T_0 后的约六个月 (T_1 时刻),接受了上述初始免疫的相同的人接受体积为 0.5ml 的四价疫苗登革组合物的第二次皮下给药,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 1、2、3、4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。在此时刻不需要给药 MMR 疫苗。

[0085] (3) 在 T_1 后的约六个月 (T_2 时刻),接受了上述初始免疫的相同的人接受体积为 0.5ml 的四价疫苗登革组合物的第二次皮下给药,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 12、3、4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。在此时刻不需要给药 MMR 疫苗。

[0086] 本发明还提供基本根据上述三步时间表的备选的免疫时间表,该免疫时间表在 T_1 和 T_2 之间的中间时间点加入额外的利用“组合”疫苗的免疫。优选地,在 T_1 (给药第二剂 DEN-1、2、3、4 组合物) 后的约 3 个月的时间点,给相同的人肌肉内注射“组合”疫苗。在一个实施方案中,组合疫苗是在 0.5ml 的体积中除了赋形剂和氢氧化铝佐剂还包含以下各项的药物制剂:至少 30IU 白喉类毒素、至少 40IU 破伤风类毒素,约 25 微克百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 百日咳类毒素和丝状血细胞凝集素抗原、约 40DU 失活的 1 型脊髓灰质炎病毒、约 40DU 失活的 1 型脊髓灰质炎病毒、约 8DU 失活的 2 型脊髓灰质炎病毒、约 32DU 失活的 3 型脊髓灰质炎病毒和约 10 微克的与破伤风毒素缀合的 b 型流感嗜血菌

(Haemophilus influenzae) 的多糖。组合疫苗可以是Pentaxim® (Sanofi Pasteur, Lyon FR)。在组合疫苗给药 (T2) 后的约三个月的时间点,相同的人接收体积为 0.5ml 的四价疫苗登革组合物的第三次皮下给药,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。在此时刻不需要给药 MMR 疫苗。

[0087] 在上述给药方案期间选择的时间点以及在其后限定的时间点从人身上采集血液样品。根据本领域中已知的说明和技术的教导,将来自这种样品的血清分离并评估针对在给药方案中被给药的抗原的中和抗体的存在。

[0088] 疫苗登革组合物、MMR 疫苗和 / 或 “组合” 疫苗的加强给药可以在上述给药方案后给予以在该哺乳动物中保持可靠的免疫保护。这种加强给药可以发生在约 1 年、2 年、3 年、4 年、5 年、10 年或更长的时间点。

[0089] 免疫试剂盒

[0090] 根据另一方面,本发明的目标是提供一种试剂盒以实现针对登革热的四种血清型病毒、流行性腮腺炎、麻疹和风疹。根据本发明的试剂盒包含关于提出的免疫方法所述的疫苗组合物。根据本发明的试剂盒因此包括包含容纳组合物或疫苗的多种容器的盒并且有利地包括说明册,所述说明册包含用于给药所述组合物或疫苗的有用信息。术语容器包括常规密封小瓶和预填充的注射器。

[0091] 根据一个实施方案,本发明因此涉及用于针对登革血清型 1、2、3 和 4 以及 (1) 麻疹或 (2) 麻疹、流行性腮腺炎和风疹或 (3) 麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 VZV 的免疫的试剂盒,所述试剂盒包括盒,所述盒至少包含分别容纳单价麻疹、三价 MMR 或四价 MMRV 疫苗的 (a) 第一容器,以及容纳四价登革疫苗的 (b) 第二容器。

[0092] 可用于根据本发明的试剂盒的疫苗组合物包括本文中关于本发明的免疫方法所述的疫苗组合物。

[0093] 如果疫苗组合物以冻干形式提供,则该试剂盒将有利地包含至少一个额外的容器,所述至少一个额外的容器容纳可用于使适于通过皮内、经皮、皮下或肌肉内给药而给药的冻干的疫苗组合物重建的溶液。药用稀释剂和载体可用于重建。

[0094] 根据特别的实施方案,根据本发明的试剂盒包含四价疫苗,所述四价疫苗包含 10^{5+1} CCID₅₀ 的 Chimerivax™ DEN-1、2、3 和 4。

[0095] 其中在使用前封装有药物制剂的容器可以包括气密容器,所述气密容器封装有一定量的适于其药物有效剂量或有效剂量的倍数的冻干制剂或包含制剂的溶液。药物制剂封装在无菌容器中,并且气密容器被设计成保持药物制剂的无菌性直到使用。

[0096] 任选地,该容器可以结合给药工具和或使用说明。给药工具的实例可以包括用于肠胃外给药的注射器或促进皮内给药的递送系统。

[0097] 药物剂型:

[0098] 给药的疫苗组合物的体积将取决于给药的方法。在皮下注射的情况中,该体积通常为 0.1 至 1.0ml,优选约 0.5ml。

[0099] 给药所有血清型 1 至 4 的最佳时期是在对登革热病毒的潜在暴露之前约 1 至 3 个月。本发明的组合物可以作为针对登革热病毒感染的预防性治疗给药于成人和儿童。目标人群因此包括对于登革热病毒是首次的(naïve) (即之前未被免疫) 或非首次的人。

[0100] 也可以例如在上次给予免疫后的 6 个月至 10 年,例如 6 个月、1 年、3 年、5 年或 10

年,使用血清型 1 至 4 的登革热疫苗病毒的加强给药。

实施例

[0101] 以下实例用于说明本发明的实施而非意在限制如以上提供的本发明的实施的范围。

[0102] 实施例 1 :收集和保存血清样品

[0103] 根据欧洲关于动物实验的指导在猴子上进行实验。在源自毛里塔尼亚的猕猴(食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)) 上进行免疫。在免疫前将猴子隔离六周。使用 0.5ml 疫苗组合在猴的手臂中对猴子进行免疫。

[0104] 在用氯胺酮 (ketamine) (Imalgene, Merial) 轻度麻醉后,通过穿刺腹股沟静脉或隐静脉收集血液。在每次免疫后的第 0 天和第 28 天,采样 5ml 血液以便评估抗体应答。在冰上收集血液并保存在冰上直到通过在 4°C 离心 20 分钟来分离血清。将血清保存在 -80°C 直到测试时。

[0105] 实施例 2 :测量登革中和抗体

[0106] 在 96 孔板中,在每孔中,将基本根据实施例 1 分离的 0.120ml 各种去补体血清加入到 0.480ml 稀释剂 (ISCOVE 4% SVF) 中。通过将 0.150ml 血清转移到 0.450ml 稀释剂中进行因子 6 的连续稀释。将 450 μ l 含 2.7log₁₀ CCID₅₀/ml 的病毒稀释液加入到每孔中以致获得 25 CCID₅₀/孔。将平板在 37°C 孵育 1 小时。然后将 0.1ml 的各个稀释液分配到 96 孔板的 6 个孔中,在所述孔中在实验开始前 VERO 细胞已经以 8000 细胞/孔的浓度在 0.1ml ISCOVE 4% SVF 培养基中接种 3 天。在 37°C、在 5% CO₂ 的存在下孵育 6 天后,在 4°C 使用乙醇/丙酮 (70/30) 混合物将细胞固定 15 分钟,然后在 PBS 中洗涤 3 次并在 37°C 在 0.05ml 抗黄病毒单克隆抗体 (mAb 4G2, 获得自 ATCC H-B112 杂交瘤) 的 1/2000 稀释液的存在下孵育 1 小时。然后将平板洗涤两次并在 37°C 在 0.05ml 与碱性磷酸酶缀合的抗鼠 IgG 的 1/1000 稀释液的存在下孵育 1 小时。通过加入 0.05ml 染色底物:BCIP/NBT 来显示溶菌噬斑 (lysis plaque)。使用以下定义的 Karber 公式计算中和抗体效价:

[0107] $\text{Log}_{10}\text{SN50} = d+f/N(X+N/2)$,

[0108] 其中:

[0109] d :表示提供 100% 中和 (即 6 次重复为阴性,即未呈现感染迹象) 的稀释

[0110] f :将稀释因子表示为 log₁₀ (例如如果稀释因子为 1 : 4, 则 f = 0.6)

[0111] N :表示重复/稀释的数目 (N = 6)

[0112] X :没有感染迹象的孔的总数,除了稀释 d 以外。

[0113] 病毒检测的极限是 10SN50 (即 1.0log₁₀SN50)。用于中和的病毒株是毒株 DEN1 16007、DEN2 16681、DEN3 16562 或 DEN4 1036。在对照的情况中,重新确定初始病毒稀释液的效价。在 SN50 测试中测量的中和效价与在 PRNT50 测试中常规测量的中和效价之间的相关性为: $\log_{10}\text{PRNT50} = \log_{10}\text{SN50} + 0.2$ 。

[0114] 实施例 3 确定麻疹、流行性腮腺炎和风疹抗体

[0115] 通过 ELISA 在 MMF 疫苗接种 28 天后收集的血清中测量针对麻疹、风疹和流行性腮腺炎的抗体水平。简言之,将预吸附有抗原的 96 孔板暴露于血清。测试样品中的 IgG 抗体与预吸附的抗原结合。抗人 IgG 缀合物与抗原抗体复合物结合。除去过量的缀合物并加入

比色底物。缀合物的酶组分催化水解反应,所述水解反应将底物转化并且产生颜色变化。在限定的时间点将反应猝灭。颜色的强度与样品中病毒特异性 IgG 抗体的活性成比例。包含于样品中的病毒特异性 IgG 抗体的活性通过使用参比标准(可自世界卫生组织获得)产生的标准曲线和四参数逻辑回归函数来进行量化。结果以 mIU/mL 报告,此测定的定量的下限是 120mIU/mL。

[0116] 实施例 4 制备 Chimerivax

[0117] 通过在 Vero 细胞中扩增每种血清型来制备每种单价 Chimerivax™ 登革热疫苗病毒(血清型 1、2、3 和 4)。更具体地,在无血清培养基中在贴壁 Vero 细胞中分别制备四种病毒。然后将通过过滤从细胞碎片中净化的病毒收获物浓缩并通过超滤和层析进行纯化以去除来自宿主细胞的 DNA。在加入稳定剂后,在使用前将疫苗株以冷冻或冻干形式保存然后当需要时将其重建。将相同的过程施用于四种嵌合体。

[0118] 实施例 5 登革 MMR 血清免疫

[0119] 基本根据以下程序来实现针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹和登革病毒的四种血清型的免疫。使用 23G1 针在手臂中经皮下进行四价登革疫苗组合物的初始接种,0.5ml 体积的四价疫苗中 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种的含量为 10^{5+1} CCID₅₀,并且接种包含至少 1000 CCID₅₀ 麻疹病毒(Schwarz 株)、至少 5000 CCID₅₀ 流行性腮腺炎病毒(Urabe AM-9 株)和至少 1000CCID₅₀ 风疹病毒(Wistar RA 27/3M)的体积为 0.5ml 的 MMR 疫苗。通过在 1 小时内将每种疫苗组合物的 0.5ml 样品经皮下给药到年龄小于 24 个月的人类的每个手臂中来完成四价登革疫苗组合物和 MMR 疫苗的给药。MMR 疫苗可以是 Trimovax® (Sanofi Pasteur Lyon FR)。

[0120] 通过在第一次给药后大约六个月经皮下给药 0.5ml 体积的四价疫苗登革组合物来给接种有上述共同给药的组合物的相同的人第二次接种,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。在此时不给药 MMR 疫苗。

[0121] 在上述第二次皮下给药四价疫苗登革组合物后大约六个月的时间,通过体积为 0.5ml 的四价疫苗登革组合物的皮下给药来给相同的人第三次接种,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。

[0122] 在上述给药方案期间选择的时间点以及在其后限定的时间点从人身上采集血液样品。根据本领域中众所周知的说明和技术的教导,将来自此类样品的血清分离并评估针对被给药的抗原的中和抗体的存在。数据显示针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹病毒和登革病毒的四种血清型的免疫。实施例 6 登革 MMR 组合免疫(Combo Immunization)

[0123] 针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹、登革病毒的四种血清型以及白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和 Hib 抗原的免疫基本根据以下程序来实现。使用 23G1 针在手臂中经皮下进行初始的共同给药,给受试者接种 0.5ml 体积的四价疫苗,所述四价疫苗中的 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀,并且给受试者接种 0.5ml 体积的 MMR 疫苗 Trimovax® (Sanofi Pasteur),所述 MMR 疫苗包含至少 1000 CCID₅₀ 麻疹病毒(Schwarz 株)、至少 5000 CCID₅₀ 流行性腮腺炎病毒(Urabe AM-9 株)和至少 1000CCID₅₀ 风疹病毒(Wistar RA 27/3M)。通过在 1 小时内将每种疫苗的 0.5ml 样品经皮下给药到年龄小于 24 个月的人类的每个手臂中来完成四价登革疫苗和 MMR 疫苗的给药。

[0124] 通过在第一次给药后大约六个月经皮下给药 0.5ml 体积的四价疫苗登革组合物,

接受了上述四价疫苗登革组合物和 MMR 疫苗的初始共同给药的相同的人接受登革疫苗组合物的第二次接种,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。在此时不给药 MMR 疫苗。

[0125] 在第二次四价登革疫苗给药后的大约 3 个月,通过肌肉内注射“组合”疫苗来给相同的人接种,所述“组合”疫苗是在 0.5ml 的体积中除了赋形剂和氢氧化铝佐剂还包含以下各项的药物制剂:至少 30IU 白喉类毒素、至少 40IU 破伤风类毒素,大约 25 微克博德特氏菌 (*Bordetella*) 百日咳类毒素和丝状血细胞凝集素抗原、大约 40DU 失活的 1 型脊髓灰质炎病毒、大约 40DU 失活的 1 型脊髓灰质炎病毒、大约 8DU 失活的 2 型脊髓灰质炎病毒、大约 32DU 失活的 3 型脊髓灰质炎病毒和大约 10 微克的与破伤风毒素缀合的 b 型流感嗜血菌的多糖。组合疫苗可以是 **Pentaxim®** (Sanofi Pasteur, Lyon FR)。

[0126] 在组合疫苗给药后的大约三个月的时间,相同的人接受体积为 0.5ml 的四价疫苗登革组合物的第三次皮下给药,所述四价疫苗登革组合物包含的 CYD DEN 1 至 4 血清型中每种量为 10^{5+1} CCID₅₀。

[0127] 在上述给药方案期间选择的时间点以及在其后限定的时间点从人身上采集血液样品。根据本领域中众所周知的说明和技术的教导,将来自这样样品的血清分离并评估针对被给药的抗原的中和抗体的存在。数据显示针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹病毒、白喉、百日咳、Hib、破伤风和登革病毒的四种血清型的免疫。

[0128] 实施例 7 麻疹和登革免疫

[0129] 基本根据上文中实施例 5 的教导来实现针对麻疹和登革病毒的四种血清型的免疫,不同之处在于用单价麻疹疫苗代替 MMR 疫苗。

[0130] 实施例 8 麻疹、登革和组合免疫

[0131] 基本根据上文中实施例 6 的教导来实现针对麻疹、登革病毒的四种血清型以及白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和 Hib 抗原的免疫,不同之处在于用单价麻疹疫苗代替 MMR 疫苗。

[0132] 实施例 9MMRV 和登革免疫

[0133] 基本根据上文中实施例 5 的教导来实现针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 VZV 以及登革病毒的四种血清型的免疫,不同之处在于用四价 MMRV 疫苗代替 MMR 疫苗。

[0134] 实施例 10MMRV、登革和组合免疫

[0135] 基本根据上文中实施例 6 的教导来实现针对麻疹、流行性腮腺炎、风疹和 VZV、登革病毒的四种血清型以及白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和 Hib 抗原的免疫,不同之处在于用 MMRV 麻疹疫苗代替 MMR 疫苗。