

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
5 juin 2008 (05.06.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/065315 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/052431

(22) Date de dépôt international :
30 novembre 2007 (30.11.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0655255 1 décembre 2006 (01.12.2006) FR

(71) Déposant : SANOFI PASTEUR [FR/FR]; 2 avenue du
Pont Pasteur, F-69367 Lyon Cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs: GUY, Bruno; 15B rue des Noyers, F-69005
Lyon (FR). BARBAN, Véronique; 7 ter rue Jean-Claude
Martin, F-69290 Craponne (FR). FORRAT, Rémi; 2 rue
Pierre Devaux, F-69780 Serezin Du Rhône (FR). LANG,
Jean; 118 route de Saint-Priest, F-69780 Mions (FR).

(74) Mandataires : SCHAEFFER, Nathalie etc.; Sanofi Pas-
teur, Direction de la Propriété Intellectuelle, 2, avenue du
pont Pasteur, F-69367 Lyon cedex 07 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international



WO 2008/065315 A1

(54) Title: IMMUNIZATION PROTOCOL AGAINST THE 4 DENGUE SEROTYPES

(54) Titre : METHODE D'IMMUNISATION CONTRE LES 4 SEROTYPES DE LA DENGUE

(57) Abstract: The invention relates to a method to induce a protection against the 4 dengue serotypes in a patient, comprising:
(a) the administration of a monovalent vaccine comprising a vaccine virus of a first dengue serotype, and (b) the administration of a tetravalent vaccine comprising vaccine viruses of the four serotypes of dengue, wherein the administration (b) is implemented at least 30 days to at most 12 months after the first administration (a).

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode pour induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant : (a) l'administration d'un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal d'un premier sérotype de la dengue, et (b) l'administration d'un vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des quatre sérotypes de la dengue, dans laquelle l'administration (b) est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première administration (a).

Méthode d'immunisation contre les 4 sérotypes de la dengue

L'invention concerne une méthode pour induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant :

- 5 (a) une première administration d'un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype
 - (b) une deuxième administration d'un vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des 4 serotypes de la dengue, et
- 10 dans laquelle la deuxième administration (b) est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première administration (a).

Les maladies dengue sont causées par quatre virus du genre flavivirus de type sérologique proches mais distincts d'un point de vue antigénique (Gübler et al., 1988 In: Epidemiology of arthropod-borne viral disease. Monath TPM, editor, Boca Raton (FL): CRC Press: 223-60 ; Kautner et al., 1997, J. of Pediatrics, 15 131:516-524; Rigau-Pérez et al., 1998, Lancet; 352: 971-977 ; Vaughn et al., 1997, J Infect Dis; 176: 322-30). L'infection avec un sérotype de la dengue peut produire un spectre de maladie clinique allant d'un syndrome viral non spécifique jusqu'à une maladie sévère hémorragique fatale. La période d'incubation de la fièvre dengue après piquûre du moustique est d'environ 4 jours

20 (allant de 3 à 14 jours). La fièvre dengue est caractérisée par une fièvre biphasique, des maux de tête, des douleurs dans différentes parties du corps, une prostration, des éruptions, et une lymphadénopathie, (Kautner et al., 1997, J. of Pediatrics, 131:516-524 ; Rigau-Pérez et al., 1998, Lancet; 352: 971-977). La période virémique est la même que la période fébrile (Vaughn et al., 1997, J. Infect. Dis.; 176: 322-30). La guérison de la fièvre dengue est acquise au bout

25 de 7 à 10 jours, mais une asthénie prolongée est usuelle. Des baisses de la numération des leucocytes et des plaquettes sont fréquentes.

La dengue hémorragique est une maladie fébrile sévère caractérisée par des anomalies de l'homéostasie et une augmentation de la perméabilité

30 vasculaire qui peut conduire à une hypovolémie et à une hypotension (dengue avec syndrome de choc) souvent compliquée par des hémorragies internes sévères. Le taux de mortalité de la dengue hémorragique peut atteindre jusqu'à 10 % sans thérapie, mais est ≤ 1 % dans la plupart des centres ayant une

expérience thérapeutique (WHO technical Guide, 1986. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control, p1-2. World Health Organization, Geneva, Switzerland).

Le diagnostic de routine en laboratoire de la dengue est basé sur
5 l'isolation du virus et/ou la détection d'anticorps spécifiques du virus de la dengue.

La dengue est la deuxième maladie infectieuse tropicale la plus importante après la malaria, plus de la moitié de la population mondiale vivant dans des zones à risque de transmission épidémique. Chaque année, les cas
10 de dengue sont estimés à 50-100 millions, les cas de patients hospitalisés pour une dengue hémorragique à 500 000, et le nombre de morts à 25 000. La dengue est endémique en Asie, dans le Pacifique, en Afrique, en Amérique latine et dans les Caraïbes. Plus de 100 pays tropicaux sont endémiques pour les infections par le virus de la dengue et la dengue hémorragique a été
15 documentée dans 60 de ces pays (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology. 10:100-103 ; Monath, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci.; 91: 2395-2400). Un certain nombre de facteurs bien décrits semblent être impliqués dans la dengue : la croissance de la population ; une urbanisation non planifiée et non contrôlée, en particulier en association avec la pauvreté ; une augmentation des voyages
20 aériens ; le manque de contrôle effectif des moustiques et la détérioration des infrastructures sanitaires et de santé publique (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology. 10:100-103). Les voyageurs et expatriés sont de plus en plus alertés contre la dengue (Shirtcliffe et al., 1998, J. Roy. Coll. Phys. Lond.; 32: 235-237). La dengue a constitué une des principales causes de maladies
25 fébriles au sein les troupes américaines au cours de déploiements dans des zones tropicales endémiques pour la dengue (DeFraités et al., 1994, MMWR 1994; 43: 845-848).

Les virus sont maintenus dans un cycle qui implique les humains et *Aedes aegypti*, un moustique domestique piquant le jour, qui préfère s'alimenter
30 sur l'homme. L'infection chez l'homme est initiée par l'injection du virus au cours du repas de sang d'un moustique *Aedes aegypti* infecté. Le virus salivaire est déposé principalement dans les tissus extravasculaires. La première catégorie de cellules infectées après inoculation sont les cellules dendritiques, qui migrent

ensuite vers les ganglions lymphatiques (Wu et al., 2000, Nature Med.; 7:816-820). Après une réplication initiale dans la peau et dans les ganglions lymphatiques, le virus apparaît dans le sang au cours de la phase fébrile aiguë, généralement pendant 3 à 5 jours.

5 Les monocytes et les macrophages sont, avec les cellules dendritiques, parmi les premières cibles du virus de la dengue. La protection contre une réinfection homotypique est complète et dure probablement toute la vie, mais une protection croisée entre les différents types de dengue dure moins de quelques semaines à quelques mois (Sabin, 1952, Am. J. Trop. Med. Hyg.; 1:
10 30-50). En conséquence, un sujet peut subir une infection avec un sérotype différent. Une seconde infection par la dengue est en théorie un facteur de risque de développer une maladie dengue sévère. Cependant, la dengue hémorragique est multifactorielle : ces facteurs incluent la souche du virus impliqué, ainsi que l'âge, le statut immun et la prédisposition génétique du
15 patient. Deux facteurs jouent un rôle majeur dans la survenue de la dengue hémorragique: une réplication virale rapide avec une virémie élevée (la sévérité de la maladie étant associée au niveau de la virémie ; Vaughn et al., 2000, J. Inf. Dis.; 181: 2-9) et une réponse inflammatoire importante avec la libération de niveaux élevés de médiateurs inflammatoires (Rothman and Ennis, 1999,
20 Virology; 257: 1-6). Il n'y a aucun traitement spécifique contre la dengue. Le traitement de la fièvre dengue est symptomatique avec un alitement, un contrôle de la fièvre et de la douleur avec des antipyrétiques et des analgésiques, et une prise de boisson adéquate. Le traitement de la dengue hémorragique nécessite l'équilibrage des pertes de liquide, le remplacement des facteurs de coagulation
25 et la perfusion d'héparine.

Les mesures de prévention reposent actuellement sur le contrôle du vecteur et des mesures de protection personnelle qui sont difficiles à mettre en œuvre et coûteuses. Aucun vaccin contre la dengue n'est approuvé pour le moment. Etant donné que les quatre sérotypes de la dengue sont en circulation
30 dans le monde et comme ils ont été rapportés comme étant impliqués dans des cas de fièvre hémorragique dengue, la vaccination devrait idéalement conférer une protection contre les quatre sérotypes du virus de la dengue.

Lors de l'immunisation par un vaccin tétravalent, il peut arriver que la réponse soit induite de façon prépondérante contre seulement un ou au plus 3 serotypes. Il existe donc un besoin d'une méthode permettant de réduire les interférences entre les différents sérotypes et permettant d'induire des anticorps neutralisant contre les 4 sérotypes de la dengue.

Les inventeurs ont mis en évidence qu'il est possible de générer une réponse immune comprenant des anticorps neutralisant les 4 sérotypes, lorsque la formulation vaccinale devant induire une réponse contre les 4 serotypes est administrée après une primo-immunisation par un vaccin vivant atténué d'un serotype seulement, la deuxième immunisation étant mise en œuvre 30 jours à 12 mois après la première administration.

Les inventeurs ont en particulier montré qu'une immunisation tétravalente DEN-1,2,3,4 suivant une immunisation monovalente DEN-2 induit des réponses contre les quatre sérotypes chez tous les singes immunisés. A l'inverse, une immunisation tétravalente seule n'a permis d'induire une réponse satisfaisante que contre deux sérotypes sur 4, même après rappel.

La réponse immune générée par la méthode selon la présente invention est donc plus importante quantitativement et qualitativement (couvre tous les sérotypes).

Selon un premier objet, la présente invention concerne donc une méthode permettant d'induire une réponse en anticorps neutralisants contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant :

- (a) une première administration d'un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype,
- (b) une deuxième administration d'un vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des 4 serotypes de la dengue, et dans laquelle la deuxième administration (b) est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première administration (a).

Selon un mode de réalisation particulier de la méthode d'immunisation selon l'invention, ledit virus vaccinal utilisé lors de la première administration (a) est sélectionné dans le groupe constitué des virus vaccinaux de la dengue de sérotype 1 ou 2.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode d'immunisation selon l'invention, ledit virus vaccinal utilisé lors de la première administration (a) est sélectionné dans le groupe constitué des souches VDV1 et VDV2.

5 Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, les dits virus vaccinaux utilisés dans le vaccin tétravalent sont sélectionnés dans le groupe constitué des Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, la quantité de virus vaccinaux de la dengue de sérotypes 1, 2, 3 et 4
10 est comprise dans une gamme allant de 10^3 à 10^6 DICC₅₀.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, le vaccin monovalent comprend 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et le vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 10^3 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-4.

15 Selon un autre mode de réalisation de la méthode selon l'invention, la deuxième administration (b) est mise en œuvre 30 à 60 jours après la première administration (a).

La présente invention a également pour objet un kit d'immunisation contre le virus de la dengue comprenant un boîtier contenant au moins (a) un
20 premier récipient renfermant une composition ou vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal d'un premier sérotype de la dengue, (b) un deuxième récipient renfermant une composition ou vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des 4 sérotypes de la dengue,.

Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend au moins:

25 (a) un premier récipient contenant un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal VDV1 ou VDV2

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin tétravalent comprenant les 4 Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

Selon un mode de réalisation particulier ; le kit selon l'invention comprend
30 un vaccin monovalent comprenant 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et un vaccin tétravalent comprenant 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 10^3 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-4.

La présente invention concerne donc aussi l'utilisation de virus vaccinaux de la dengue pour la fabrication d'un vaccin monovalent et d'un vaccin tétravalent pour une immunisation contre le virus de la dengue dans laquelle le vaccin monovalent comprend un virus vaccinal de la dengue d'un premier
5 sérotype, le vaccin tétravalent comprend des virus vaccinaux des 4 sérotypes de la dengue et dans laquelle le vaccin tétravalent est administré au moins 30 jours à au plus 12 mois après l'administration du vaccin monovalent.

L'invention va être décrite plus en détails dans la description qui suit.
10

Définitions

Les « virus de la dengue » ou « DEN » sont des virus à ARN simple-brin, positif, appartenant au genre *Flavivirus* de la famille des *flaviviridae*. L'ARN génomique contient une coiffe de type I à l'extrémité 5' mais est dépourvu de
15 queue poly-A à l'extrémité 3'. L'organisation génomique est constituée des éléments suivants : région non codante (NCR) 5', protéines structurales (capside (C), pré-membrane/membrane (prM/M), enveloppe (E)) et protéines non structurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) et NCR 3'. L'ARN viral génomique est associé aux protéines de la capsidie pour former une
20 nucléocapsidie. Comme pour les autres flavivirus, le génome viral DEN code une région codante ininterrompue qui est traduite en une polyprotéine unique.

Par « virus vaccinal de la dengue » on entend dans le cadre de la présente invention, toute forme virale du virus de la dengue capable d'induire une réponse immunitaire spécifique comprenant des anticorps neutralisants, de
25 préférence toute forme virale du virus de la dengue utilisable dans le cadre d'un programme d'immunisation chez l'homme contre une infection par un virus de la dengue. Par virus vaccinaux de la dengue on entend donc les virus inactivés, les virus atténués, ou les protéines recombinantes telles que la protéine d'enveloppe du virus de la dengue.

30 Un virus vaccinal est considéré comme « inactivé » s'il ne se réplique plus sur des cellules permissives.

Un virus vaccinal est considéré comme « atténué » si après croissance à 37°C ou 39°C sur cellule hépatique Huh-7, VERO et/ou C6/36, ledit virus

vaccinal présente un titre maximal inférieur d'au moins 10 fois au titre maximal obtenu avec la souche parentale sauvage dans les mêmes conditions de culture et tel que mesuré en utilisant la même méthode de titrage. Un virus vaccinal qui présente une croissance diminuée sur au moins l'un des trois types cellulaires
5 identifiés ci-dessus est donc considéré comme « atténué » dans le cadre de la présente invention.

Un virus vaccinal utilisable chez l'homme présente un rapport bénéfices/risques positif, ledit rapport permet généralement de satisfaire aux exigences réglementaires pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le
10 marché. Un virus vaccinal de la dengue utilisé dans le cadre de la présente invention est de préférence un virus atténué de telle sorte qu'il n'induit pas la maladie chez l'homme. Avantageusement, ledit virus vaccinal ne conduit qu'à des effets secondaires au plus d'intensité modérée (i.e. moyenne à faible, voire nulle) chez la majorité des sujets vaccinés tout en conservant sa capacité à
15 induire une réponse anticorps neutralisante.

On peut citer à titre d'exemples non limitatifs, de virus vaccinaux de la dengue utilisable dans le cadre de la présente invention : les virus vaccinaux inactivés, les virus vaccinaux atténués tels que les souches atténuées VDV-1, VDV-2, les souches décrites par exemple dans les demandes : WO02/66621,
20 WO0057904, WO0057908, WO0057909 ; WO0057910, WO02/0950075 et WO02/102828, ou les chimères. Les virus chimères ont la particularité de présenter les caractéristiques des virus atténués tels que définis ci-dessus. Tout virus chimères exprimant la protéine d'enveloppe d'un virus dengue et induisant une réponse immune comprenant des anticorps neutralisant le sérotype dont est
25 issue la protéine d'enveloppe peut donc être utilisé dans le cadre de la présente invention. On peut citer à titre d'exemples non limitatifs : les chimerivaxTM dengue tels que décrits par exemple dans la demande de brevet WO 98/37911, les chimères dengue/dengue tels que décrits par exemple dans les demandes de brevets WO9640933 et WO0160847. Le virus vaccinal de la
30 dengue de sérotype 1 peut être par exemple la souche vaccinale VDV1 ou un ChimerivaxTM DEN-1, en particulier un virus YF17D/DEN-1, ou encore une souche DEN-1 16007/PDK13. Le virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 peut être par exemple la souche vaccinale VDV2 ou un ChimerivaxTM DEN-2, en

particulier un virus YF17D/DEN-2, ou encore une souche DEN-2 16681/PDK53. Le virus vaccinal de la dengue de sérotype 3 peut être un Chimerivax™ DEN-3, en particulier un virus YF17D/DEN-3. Le virus vaccinal de la dengue de sérotype 4 peut être un Chimerivax™ DEN-4, en particulier un virus
5 YF17D/DEN-4.. On pourra se reporter aux demandes identifiées ici pour un descriptif précis des souches mentionnées et de leur procédé d'obtention.

« VDV » ou « vaccin dengue Vero » désigne une souche virale dengue vivante atténuée adaptée sur cellule Vero (i.e. est capable de se répliquer de façon reproductible à niveau significatif sur cellules Vero) et capable d'induire
10 une réponse humorale spécifique, y compris l'induction d'anticorps neutralisants, chez les primates et en particulier chez l'homme.

« VDV-1 » est une souche obtenue à partir d'une souche sauvage DEN-1 16007 ayant subi 11 passages sur cellules PDK (DEN-1 16007/PDK11) qui a ensuite été amplifiée sur cellules Vero à 32°C, et dont l'ARN a été purifié et
15 transfecté dans des cellules Vero. La souche VDV-1 présente 14 mutations supplémentaires par rapport à la souche vaccinale DEN-1 16007/PDK13 (13 passages sur cellules PDK–Primary Dog Kidney). La souche DEN-1 16007/PDK13, aussi appelée « LAV1 », a été décrite dans la demande de brevet EP1159968 au nom de Mahidol University et a été déposée auprès de la
20 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le numéro I-2480. La séquence complète de la souche VDV-1 est donnée à la séquence SEQ ID NO :1. Ladite souche peut être facilement reproduite à partir de ladite séquence. Un procédé de préparation et la caractérisation de la souche VDV-1 a été décrit dans la demande de brevet internationale déposée aux noms de
25 Sanofi-Pasteur et du Center for Disease Control and Prevention sous le numéro WO 2006/134433.

« VDV-2 » est une souche obtenue à partir d'une souche sauvage DEN-2 16681 ayant subi 50 passages sur cellules PDK (DEN-2 16681/PDK50), purifiée par plaque et dont l'ARN a été extrait et purifié avant d'être transfectée dans des
30 cellules Vero. La souche VDV-2 a ensuite été obtenue par purification par plaque et amplification sur cellules Vero. La souche VDV-2 présente 10 mutations supplémentaires par rapport à la souche vaccinale DEN-2 16681/PDK53 (53 passages sur cellules PDK), dont 4 mutations silencieuses.

La souche DEN-2 16681/PDK53, aussi appelée « LAV2 », a été décrite dans la demande de brevet EP1159968 au nom de Mahidol University et a été déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le numéro I-2481. La séquence complète de la souche VDV-2 est montrée
5 dans la séquence SEQ ID NO :2. La souche VDV-2 peut être facilement reproduite à partir de ladite séquence. Un procédé de préparation et la caractérisation de la souche VDV-2 a été décrit dans la demande de brevet internationale déposée aux noms de Sanofi-Pasteur et du Center for Disease Control and Prevention sous le numéro WO 2006/134433.

10 Les souches VDV 1 et 2 sont préparées par amplification sur cellules Vero. Les virus produits sont récoltés et clarifiés des débris cellulaires par filtration. L'ADN est digéré par traitement enzymatique. Les impuretés sont éliminées par ultrafiltration. Les titres infectieux peuvent être augmentés par une méthode de concentration. Après ajout d'un stabilisant, les souches sont
15 stockées sous forme lyophilisée ou congelée avant utilisation puis reconstituées extemporanément.

Par « ChimeriVax™ dengue » ou « CYD » on désigne un virus de la fièvre jaune (YF) chimère qui comprend le squelette d'un virus YF dans lequel les séquences codant pour les protéines de pré-membrane et d'enveloppe ont été
20 remplacée par celles d'un virus DEN. On appelle ainsi « CYD-1 ou CYD DEN1 » un virus YF chimère contenant les séquences prM et E d'une souche dengue sérotype 1(DEN-1). On appelle « CYD-2 ou CYD DEN2 » un virus YF chimère contenant les séquences prM et E d'une souche DEN-2. On appelle « CYD-3 ou CYD DEN3 » un virus YF chimère contenant les séquences prM et E d'une
25 souche DEN-3. On appelle « CYD-4 ou CYD DEN4 » un virus YF chimère contenant les séquences prM et E d'une souche DEN-4. La préparation de ces ChimeriVax™ dengue a été décrite en détails dans les demandes de brevet internationales WO 98/37911 et WO 03/101397 auxquelles on peut se reporter pour un descriptif précis de leur procédé de préparation. Les chimères décrits
30 dans les exemples ont été générés par utilisation des séquences prM et E issues des souches DEN 1 PU0359 (TYP1140), DEN2 PU0218, DEN3 PaH881/88 et DEN 4 1228 (TVP 980). Toute souche du virus de la dengue

pourrait être utilisée dans le cadre de la présente invention pour la construction des chimères.

De préférence, le virus YF chimère comprend le squelette d'une souche de la fièvre jaune atténuée YF17D (Theiler M, and Smith HH (1937) J Exp. Med 5 65, p767-786.) (virus YF17D/DEN-1, YF17D/DEN-2, YF17D/DEN-3, YF17D/DEN-4). Des exemples de souches YF17D susceptibles d'être utilisées incluent YF17D204 (YF-Vax®, Sanofi-Pasteur, Swifwater, PA, USA ; Stamaril®, Sanofi-Pasteur, Marcy l'Etoile, France ; ARILVAX™, Chiron, Speke, Liverpool, UK ; FLAVIMUN®, Berna Biotech, Bern, Switzerland ; YF17D-204 France 10 (X15067,X15062) ; YF17D-204,234 US (Rice et al., 1985, Science, 229 :726-733), ou encore des souches apparentées YF17DD (Genbank numéro d'accès U17066), YF17D-213 (Genbank numéro d'accès U17067) et les souches YF17DD décrites par Galler et al. (1998, Vaccines 16(9/10) :1024-1028). Toute autre souche de virus de la fièvre jaune atténuée utilisable chez l'homme peut 15 être utilisée dans le cadre de la présente invention pour la construction des chimères.

Selon un mode de réalisation particulier, les virus vaccinaux sont, pour chaque serotype utilisé dans les différentes administrations, présents dans le vaccin à une quantité de 10^3 à 10^5 DICC₅₀.

20 Selon un mode de réalisation particulier, les virus vaccinaux VDV1 ou VDV2 sont présents dans le vaccin monovalent à raison de 10^4 DICC₅₀.

Selon un mode de réalisation particulier les Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 sont présents dans le vaccin tétravalent à raison de 10^5 DICC₅₀ et le Chimerivax™ DEN-4 est présent dans le vaccin tétravalent à raison de 10^3 25 DICC₅₀.

Chaque virus vaccinal dengue monovalent ChimeriVax™ (sérotypes 1, 2, 3 et 4) a été préparé par amplification de chaque sérotype sur cellules Vero. Plus spécifiquement, les quatre virus sont produits séparément sur des cellules 30 Vero adhérentes en milieu sans sérum. La récolte virale, clarifiée des débris cellulaires par filtration, est alors concentrée et purifiée par ultrafiltration et chromatographie pour enlever l'ADN des cellules hôtes. Après ajout d'un stabilisant, les souches vaccinales sont stockées sous forme congelée ou

lyophilisée avant utilisation puis reconstituées extemporanément. Le même procédé est appliqué pour les quatre chimères.

Une dose, une composition ou un vaccin est « monovalent » lorsqu'il contient outre un excipient pharmaceutiquement acceptable un virus vaccinal d'un seul sérotype de la dengue. Une dose, une composition ou un vaccin est « tétravalent » lorsqu'il contient des virus vaccinaux des quatre sérotypes de la dengue. Les compositions multivalentes sont obtenues par simple mélange des compositions monovalentes.

Par « patient », on désigne une personne (enfant ou adulte) susceptible d'être infectée par la dengue, en particulier une personne à risque d'infection comme par exemple une personne voyageant dans des régions où la dengue est présente ou un habitant de ces régions. Ce terme englobe donc les personnes naïves ainsi que les personnes non-naïves pour le virus de la dengue.

15

Immunisation tétravalente suivant une primo-immunisation monovalente

Selon un premier aspect, la présente invention a donc pour objet une méthode d'immunisation contre le virus de la dengue.

Les inventeurs ont en effet montré en particulier que l'administration des 4 sérotypes 30 jours à 12 mois après la première administration d'un vaccin monovalent permet d'obtenir une protection efficace contre les 4 sérotypes. La méthode selon la présente invention présente donc un intérêt tout particulier dans le cadre d'une stratégie d'immunisation contre la dengue.

Selon la présente invention, la première immunisation peut être pratiquée avec une composition ou vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal de l'un quelconque des 4 sérotypes de la dengue, la deuxième administration étant réalisée avec l'ensemble des 4 sérotypes vaccinaux. Selon un mode de réalisation particulier un virus vaccinal de dengue de sérotype 1 ou 2, de préférence de sérotype 2 est utilisé dans la première administration. De préférence, le virus vaccinal de dengue utilisé dans la première administration est un virus de dengue atténué et n'est pas constitué par un virus chimère. Selon un mode de réalisation particulier, la souche VDV1 ou VDV2, de

préférence la souche VDV2 est utilisée comme virus vaccinal dans la première administration.

Des virus vaccinaux vivants atténués sont utilisés dans la deuxième administration, de préférence des virus chimères exprimant des antigènes des
5 quatre sérotypes du virus de la dengue, en particulier des Chimerivax™ DEN1, 2, 3, et 4.

Selon des modes de réalisation particuliers, la présente invention couvre donc les schémas suivants :

- (a) VDV1 (b) CYD DEN-1, 2, 3 et 4
- 10 - (ia) VDV2 (b) CYD DEN-1, 2, 3 et 4.

On entend par « vaccin ou composition » dans le cadre de la présente invention une composition comprenant une « quantité immunoefficace » du virus vaccinal de la dengue, c'est-à-dire une quantité suffisante de virus vaccinal de la dengue pour induire une réponse immune spécifique comprenant des anticorps
15 neutralisants, qui peut être mise en évidence par exemple par le test de séroneutralisation tel que décrit ci-dessous dans l'exemple 1. Un sérum est considéré comme positif pour la présence d'anticorps neutralisants lorsque le titre d'anticorps neutralisants ainsi déterminé est supérieur ou égal à 1 :10 (unité : 1/dilution).

20 Les quantités de souche vaccinales sont exprimées communément en termes d'unité formant des plages virales (PFU) ou de dose infectant 50% de la culture tissulaire ou encore de dose infectant 50% de la culture cellulaire (DICC₅₀). Par exemple, les compositions selon l'invention peuvent contenir de 10 à 10⁶ DICC₅₀, en particulier de 10³ à 10⁵ DICC₅₀ de virus vaccinal dengue de
25 sérotype 1, 2, 3 ou 4 pour une composition monovalente ou tétravalente. Ainsi dans les compositions ou utilisation selon l'invention, les doses de virus vaccinaux de la dengue de sérotype 1, 2, 3 et 4 sont préférentiellement comprises chacune dans une gamme allant de 10 à 10⁶ DICC₅₀, tels que 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ ou 10⁶ DICC₅₀ en particulier dans une gamme allant de 10³ à
30 10⁵ DICC₅₀. Les virus vaccinaux peuvent être utilisés à des doses identiques ou différentes, qui peuvent être ajustées en fonction de la nature du virus vaccinal utilisé et de l'intensité de la réponse immunitaire obtenue.

Selon un mode de réalisation particulier de la méthode selon la présente invention, les quantités de virus vaccinaux vivants atténués dans les compositions ou vaccins monovalents et tétravalents sont de 10^3 à 10^5 DICC₅₀. Selon un mode de réalisation particulier le vaccin monovalent comprend 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2, de préférence VDV2. Selon un mode de réalisation particulier le vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ des Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4. Selon un mode de réalisation avantageux, le vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ des Chimerivax™ DEN-1, 2 et 3 et 10^3 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-4 .

Dans le cadre de la présente invention, la deuxième administration (b) est mise en œuvre 30 jours à au plus 12 mois après l'administration (a). Selon un mode de réalisation avantageux, la deuxième administration est mise en œuvre de 30 jours à 60 jours après la première administration (a).

La réponse anticorps neutralisante est avantageusement durable, c'est-à-dire qu'elle peut être détectée dans le sérum jusqu'à au moins 6 mois, après la deuxième administration.

Les virus vaccinaux sont administrés sous forme de compositions ou vaccins qui peuvent être préparés selon n'importe quelle méthode connue de l'homme du métier. Habituellement, les virus, généralement sous forme lyophilisée, sont mélangés avec un excipient pharmaceutiquement acceptable, tel que de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate, des agents mouillants ou stabilisants. Par « excipient pharmaceutiquement acceptable », on entend tout solvant, milieu de dispersion, charge etc, qui ne produit pas de réaction secondaire, par exemple allergique, chez l'humain ou l'animal. L'excipient est sélectionné en fonction de la forme pharmaceutique choisie, de la méthode et de la voie d'administration. Des excipients appropriés, ainsi que les exigences en matière de formulation pharmaceutique, sont décrites dans « Remington : The Science & Practice of Pharmacy », qui représente un ouvrage de référence dans le domaine.

De préférence, les compositions vaccinales sont préparées sous forme injectable, et peuvent correspondre à des solutions liquides, des suspensions ou des émulsions. Les compositions peuvent en particulier comprendre une

solution aqueuse tamponnée de manière à maintenir un pH compris entre environ 6 et 9 (comme déterminé avec un pH-mètre à température ambiante).

Bien qu'il ne soit pas nécessaire de rajouter un adjuvant, Les compositions peuvent néanmoins comprendre un tel composé, c'est-à-dire une substance qui augmente, stimule, ou renforce, la réponse immunitaire cellulaire ou humorale induite par le virus vaccinal administré simultanément. L'homme de l'art est à même de sélectionner parmi les adjuvants classiquement utilisés dans le domaine vaccinal, un adjuvant qui puisse être approprié dans le cadre de la présente invention.

Les compositions ou vaccins selon l'invention peuvent être administrés selon n'importe quelle voie utilisée habituellement en vaccination, par exemple la voie parentérale (notamment intradermique, sous-cutanée, ou intramusculaire), avantageusement par voie sous-cutanée. De préférence, les compositions ou vaccin sont des compositions injectables administrées par voie sous-cutanée, avantageusement au niveau de la région du deltoïde gauche ou du deltoïde droit.

Le volume de composition ou vaccin administré dépend de la voie d'administration. Pour des injections sous-cutanées, le volume est généralement compris entre 0,1 et 1,0 ml, de préférence environ 0,5 ml.

La période optimale pour l'administration de la totalité des sérotypes 1 à 4, est d'environ 1 à 3 mois avant l'exposition au virus de la dengue. Les vaccins peuvent être administrés en tant que traitement prophylactique d'une infection par un virus de la dengue chez les adultes et les enfants. Les populations ciblent incluent donc des personnes qui peuvent être naïves (i.e. non préalablement immunisés) ou non-naïves vis-à-vis du virus de la dengue.

Des administrations de rappel des virus vaccinaux de la dengue de sérotypes 1 à 4 peuvent en outre être mises en œuvre par exemple entre 6 mois et 10 ans, par exemple 6 mois, 1 ans, 3 ans, 5 ans ou 10 ans après l'administration de la deuxième administration(b) selon l'invention. Les administrations de rappel vont être mises en œuvre avantageusement en utilisant les mêmes compositions ou vaccins (i.e. les mêmes virus vaccinaux) et de préférence dans les mêmes conditions d'administrations (sites anatomiques et voies d'administration) que celles utilisées pour la 2^{ème} s administration (b).

Les phénomènes d'interférence peuvent s'expliquer par la dominance d'un ou plusieurs sérotypes par rapport à d'autres et sont donc indépendants de la technologie utilisée pour la fabrication du candidat vaccin (ex VDV ou Chimerivax™). La méthode selon la présente invention peut donc s'appliquer de
5 façon générale à tout virus vaccinal de la dengue.

La présente invention entend donc couvrir également l'utilisation de virus vaccinaux de la dengue pour la fabrication d'un vaccin monovalent et d'un vaccin tétravalent pour une immunisation contre le virus de la dengue dans
10 laquelle le vaccin monovalent comprend un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype, le vaccin tétravalent comprend des virus vaccinaux des 4 sérotypes de la dengue et dans laquelle le vaccin tétravalent est administré au moins 30 jours à au plus 12 mois après l'administration du vaccin monovalent.

Pour un descriptif des vaccins et conditions utilisables dans le cadre de
15 l'utilisation selon la présente invention on peut se reporter au descriptif qui en est donné en relation avec la méthode d'immunisation selon l'invention.

Selon un autre aspect, présente invention a pour objet un kit d'immunisation contre les quatre sérotypes du virus de la dengue. Le kit selon la présente invention comprend les compositions ou vaccins tels que définis ci-
20 dessus en relation avec la méthode d'immunisation proposée. Le kit selon l'invention comprend donc un boîtier renfermant les différents récipients contenant les compositions ou vaccins et avantageusement une brochure explicative renfermant les informations utiles pour l'administration desdites compositions ou vaccins.

Selon un mode de réalisation, la présente invention a donc pour objet un kit d'immunisation contre le virus de la dengue un boîtier contenant au moins (a) un premier récipient renfermant un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal d'un premier sérotype de la dengue, et (b) un deuxième récipient renfermant un vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des 4
30 sérotypes de la dengue,.

Pour un descriptif des vaccins, compositions ou virus vaccinaux de la dengue utilisables dans le kit selon l'invention, on peut se référer à la description

qui en est donnée ci-dessus en relation avec la méthode d'immunisation selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, le kit selon l'invention comprend au moins:

5 (a) un premier récipient contenant un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal VDV1 ou VDV2 et

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin tétravalent comprenant les 4 Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

10 Selon un mode de réalisation particulier, le kit selon l'invention comprend au moins un vaccin monovalent comprenant 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et un vaccin tétravalent comprenant 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 10^3 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-4.

Les kits selon l'invention peuvent contenir un exemplaire unique ou plusieurs exemplaires des récipients tels que décrits ci-dessus.

15 Si les vaccins utilisés se présentent sous forme lyophilisée, le kit comprendra avantageusement au moins un récipient supplémentaire contenant le diluant permettant de reconstituer une dose vaccinale injectable. Tout diluant pharmaceutiquement acceptable peut être utilisé pour ce faire, classiquement, de l'eau ou une solution aqueuse tamponnée au phosphate.

20

L'invention est illustrée par l'exemple suivant.

Exemple 1 : Immunisation contre les 4 sérotypes du virus de la dengue par injection successive d'une composition monovalente suivie
25 par une composition tétravalente chez le singe

La virémie et l'immunogénicité ont été testées dans un modèle singe. La virémie, en particulier, a été identifiée comme l'un des facteurs associés avec la virulence et la sévérité de la maladie chez les hommes et constitue donc un paramètre important à prendre en considération. L'immunogénicité est quant à
30 elle un paramètre clé dans le cadre de l'évaluation de la protection conférée.

1.1 Matériels et méthodes :

Les expériences chez les singes ont été menées selon les Directives européennes relatives à l'expérimentation animale. Les immunisations ont été effectuées chez des singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) originaires de Mauritanie. Les singes ont été mis en quarantaine pendant six semaines avant
5 immunisation.

Les singes ont été immunisés par voie sous-cutanée dans les bras avec 0,5 ml de composition vaccinale. Après une légère anesthésie avec de la kétamine (Imalgene, Merial), du sang a été collecté par ponction au niveau des veines inguinale ou saphène. Aux jours 0 et 28 suivant chaque immunisation,
10 5 ml de sang ont été échantillonnés pour évaluer les réponses anticorps, alors qu'entre les jours 2 et 10, 1 ml de sang était échantillonné pour évaluer la virémie. Le sang était collecté sur la glace et conservé sur la glace jusqu'à séparation du sérum. Pour ce faire, le sang a été centrifugé pendant 20 minutes à 4°C et le sérum collecté stocké à -80°C jusqu'au moment des tests.

15

Mesure de la virémie

Les virémies post vaccinales ont été suivies par RT-PCT quantitative en temps réel (qRT-PCR). Deux jeux d'amorces et de sondes localisées dans le gène NS5 de des souches DEN1 et DEN2 ont été utilisés pour quantifier l'ARN
20 de VDV-1 et VDV-2 respectivement. Un troisième jeu de 2 amorces et 1 sonde localisées dans le gène NS5 du virus YF a été utilisé pour quantifier l'ARN du CYD. Enfin, 4 jeux d'amorces et de sondes spécifiques des différents sérotypes CYD, localisées à la jonction des gènes E (DEN) / NS1 (YF) ont été utilisés pour identifier le sérotype dans les échantillons positifs pour l'ARN NS5 YF (voir aussi
25 tableau I). 7 plasmides contenant, sous le contrôle du promoteur T7, la région ciblée par chaque PCR, ont été transcrits *in vitro* pour générer une série d'ARN synthétiques qui ont été inclus comme référence interne dans chaque essai de RT-PCT. Ces ARN synthétiques ont été dosés par spectrophotométrie, la quantité d'ARN obtenue a été convertie en nombre de copies d'ARN et
30 exprimée en GEQ (équivalents génomiques).

0,140 ml de sérum de singe a été extrait à l'aide du kit d'extraction d'ARN « Nucleospin 96 virusTM » de Macherey Nagel, selon les instructions du fabricant, puis l'ARN purifié a été élué avec 0,140 ml (0,090 ml, puis 0,05 ml)

d'eau exempte de RNase. Pour éviter des cycles répétés de congélation/décongélation, une première quantification a été réalisée immédiatement après l'extraction sur 5 µl de ladite préparation d'ARN. Le volume restant a été congelé à 70°C.

5 Les mélanges réactionnels contenaient, en plus des composants du kit de quantification RT-PCR « Qiagen Qauntitect™probes » (Qiagen), 10 picomoles de chaque amorce, 4 picomoles de chaque sonde et 5 µl d'ARN, dans un volume total de 25 µl. Dans le cas des ARN à tester, 5 µl de la préparation purifiée ont été directement introduits dans le mélange réactionnel,
10 sans étape de dilution préalable. Les ARN synthétiques ont été dilués au 1/10 dans de l'eau exempte de RNase, et 7 dilutions contenant approximativement 10 à 10⁶ GEQ dans 5 µl ont été quantifiées en parallèle afin de générer la courbe étalon.

Les réactions de quantification ont été réalisées par l'appareil ABIPrism
15 700™ d'Applied Biosystem, en utilisant le programme suivant : 50°C/30 min, 95°C/15 min, puis 40 cycles de 95°C/15 sec–60°C/60 sec.

La limite de quantification de l'ARN viral dans ce test est de 2,9 à 3,3 log₁₀GEQ/ml (800 à 2000 GEQ/ml; 4 à 10 GEQ/réaction), selon les cibles PCR (déviation standard : +/-0,3 log₁₀)

20 La corrélation entre le titre infectieux et la quantification d'ARN viral a été établie parallèlement aux essais, par analyse de 0,140 ml d'échantillons de sérums de singe négatifs (DO) dans lesquels on a ajouté une quantité connue de particules infectieuses des virus ayant servi à l'immunisation (CYD ou VDV). Lesdits sérums contrôles ont été préparés à deux dilutions contenant environ
25 1 PFU et environ 100 PFU dans 5 µl (2.3 and 4.3 log₁₀PFU/ml, respectivement).

Dans les tests utilisés dans les exemples la corrélation entre GEQ et PFU est la suivante :Ratio GEQ/PFU de 2.7 log₁₀ (soit : 1 PFU = 500 GEQ) pour les sera positifs en YF ou CYDs. Ratio GEQ/PFU de 2.5 log₁₀ (soit : 1 PFU = 320 GEQ) pour les sera positifs en VDV1 ou VDV2.

30 Les Limites de quantification étant < 3.3 log₁₀GEQ/ml (soit : <4 PFU/ml) pour les qRT-PCR YF et CYDs et < 2.9 log₁₀GEQ/ml (soit: < 2.5 PFU/ml) pour les qRT-PCR VDV1 et VDV2.

Les amorces et sondes utilisées sont données dans le tableau 1 ci-dessous dans lequel sont listés dans l'ordre pour chaque essai les amorces sens et anti-sens et la sonde.

Tableau 1

		sequence
Y F	YF-NS5 sens	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 bases)
	YF NS5 anti	5' CCAGGCCGAACCTGTCAT (18 bases)
	YF-NS5	5' Fam- CGACTGTGTGGTCCGGCCCATC -Tamra (22 bases)
CYD1 spe	CYD1- sens	5' CAT TGC AGT TGG CCT GGT AA (20 b)
	CYD1- anti:	5' CTT TGG CAA GAG AGA GCT CAA GT (23 b)
	CYD1-	5' Fam-CCG ATC AAG GAT GCG CCA TCA-Tamra (21 b)
CYD2 spe	CYD2- sens	5' GTG GGA GTC GTG ACG CTG TA (20 b)
	CYD2- anti	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD2	5' Fam-TGG GAG TTA TGG TGG GCG CCG-Tamra (21 b)
CYD3 spe	CYD3- sens:	5' AAA ACA CTT CCA TGT CAT TTT CAT G (25b)
	CYD3- anti:	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD3-	5'Fam-TGCCGATAGGAATTATCACA CTCTATCTGGAGC-Tamra (33b)
CYD4 spe	CYD4- sens	5' CTT AGT ATT GTG GAT TGG CAC GAA (24 b)
	CYD4- anti:	5' GCG CCA ACT GTG AAA CCT AGA (21 b)
	CYD4-	5'-Fam-AGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT-Tamra (29 b)
VDV1 spe	VDV1-NS5 sens	5' TCG CAA CAG CCT TAA CAG C (19 b)
	VDV1-NS5 anti	5' ACT ATC TCC CTC CCA TCC TTC (21 b)
	VDV1-NS5	5' Fam-TTC ACA CCA CTT CCA C-MGB/NFQ (16 b)
VDV2 spec	VDV2-NS5 sens	5' AAT GAC AGA CAC GAC TCC (18 b)
	VDV2-NS5 anti:	5' CCC AAA ACC TAC TAT CTT CAA C (22 b)
	VDV2-NS5	5' Fam-TGG AAG TCG GCA CGT GA-MGB/NFQ (17 b)

5

Mesure des anticorps neutralisants (test de seroneutralisation) (SN50))

Classiquement, la mesure des anticorps Dengue est établie à l'aide du test PRNT50 (test de neutralisation par réduction à 50% du nombre de PFU).

10 Ce test étant lourd et consommateur de matériel, nous avons développé le test SN50, basé sur la réduction à 50 % du nombre d'unités mesurées en test DICC50.

15 Dans une plaque de 96 puits, 0,120 ml de chaque sérum décomplémenté est ajouté à 0,480 ml de diluant (ISCOVE 4% SVF) par puits. Des dilutions en série d'un facteur 6 sont réalisées par transfert de 0,150 ml de sérum dans 0,450 ml de diluant. 450 µl de dilution virale à 2,7 log₁₀ DICC50/ml sont ajoutés dans chaque puits de façon à obtenir 25 DICC50/puits. La plaque est incubée à 37°C pendant 1 heure. 0.1 ml de chaque dilution est ensuite distribué dans 6 puits d'une plaque de 96 puits dans laquelle des cellules VERO ont été
20 ensemencées 3 jours avant le début de l'expérience à une densité de 8000

cellules/puits, dans 0.1 ml de milieu ISCOVE 4% SVF,. Après 6 jours d'incubation à 37°C, en présence de 5% de CO₂, les cellules sont fixées à l'aide d'un mélange éthanol/acétone (70/30) à 4°C pendant 15 minutes, puis lavées à 3 reprises dans du PBS et incubées pendant 1h à 37°C en présence de 0.05 ml d'une dilution au 1/2000 d'un anticorps monoclonal anti-flavivirus (mAb 4G2-obtenu à partir d'un hybridome ATCC H-B112). Les plaques sont ensuite lavées à 2 reprises et incubées 1H à 37°C en présence de 0.05 ml d'une dilution au 1/1000 d'une IgG anti-souris conjuguée à la phosphatase alcaline. Les plages de lyse sont révélées par addition de 0.05 ml d'un substrat coloré : BCIP/NBT.

10 Les titres en anticorps neutralisants sont calculés en utilisant la formule de Karber telle que définie ci-dessous :

$$\log_{10}SN50 = d + f/N (X + N/2),$$

15 Dans laquelle:

d : représente la dilution conduisant à 100% de neutralisation (soit 6 réplicats négatifs c'est-à-dire ne présentant pas de signe d'infection)

f : représente le facteur de dilution en log₁₀ (e.g. facteur de dilution de 1:4, f = 0,6)

20 N: représente le nombre de réplicats / dilution (N=6)

X: nombre total de puits ne présentant aucun signe d'infection, à l'exception de la dilution d.

La limite de détection virale est de 10 SN50 (i .e. 1.0 log₁₀SN50).

25 Les souches virales qui ont été utilisées pour la neutralisation sont les souches DEN1 16007, DEN2 16681, DEN3 16562 or DEN4 1036.

Pour les contrôles, les dilutions virales initiales ont été re-titrées.

La corrélation entre le titre neutralisant mesuré en test SN50 et le titre neutralisant mesuré classiquement en test PRNT50 est : log₁₀PRNT50 = log₁₀SN50 + 0,2.

30

1.2 Evaluation des immunisations simultanées

2 groupes de 4 singes d'âge et poids équivalents ont été immunisés. (voir tableau 2)

L'immunisation a été effectuée par voie sous-cutanée dans le bras avec une aiguille 23G1, avec une quantité de 10^5 DICC₅₀ pour chaque sérotype CYD DEN 1 à 4 pour le vaccin tétravalent et avec une quantité de dose 10^4 DICC₅₀ pour le VDV-2 monovalent.

5

Tableau 2 : Composition des groupes et protocole d'immunisation

Singes		
Groupes	Immunisations	
	J0	J56
Groupe 1	VDV 2 monovalent	ChimeriVax Dengue Tétravalent 1234
Groupe 2	ChimeriVax Dengue tétravalent 1234	ChimeriVax Dengue Tétravalent 1234

Les résultats d'immunogénicité obtenus après une immunisation (J0+28) et deux immunisations (J 56+28) sont présentés dans le tableau 3.

Les résultats de virémie sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 3 : titre neutralisant SN50 (unités 1/dil)

ID	Singes		J0+28				J56+28			
	Immunisations		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
	J0	J56								
AM762	VDV 2	CYD 1234	10	501	-	10	63	1005	63	200
AM839			-	802	-	-	80	1271	63	504
AM905			20	158	-	-	318	1010	252	506
AN011			13	1005	-	-	252	1271	319	1010
Moyenne géométrique			11	503	<10	<10	142	1131	134	477
AM496	CYD 1234	CYD 1234	50	-	16	32	100	40	80	252
AM645			-	13	31	16	-	-	-	63
AM766			-	-	32	20	-	-	-	80
AM813			25	-	-	13	63	13	20	63
Moyenne géométrique			13	<10	<10	25	38	11	14	95

- : titre < 10

Tableau 4 : analyse des virémies (unités :log10 GEQ/mL)

Groupe	Singe	Primo-immunisation										Rappel							
		J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J58	J59	J60	J61	J62	J63	J64	J65	J66
1 prime VDV 2 rappel CYD 1,2,3,4	AM762	<2,7	<2,7	<2,7	<2,7	4,77	4,89	4,84	4,47	<2,7	<3,2	<3,2	3,11	<3,2	<3,2	3,65	3,59	<3,2	
	AM839	5,11	4,51	4,19	4,19	4,56	3,69	<2,7	<2,7	<2,7	4,98	4,66	4,43	3,79	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM905	<2,7	<2,7	<2,7	<2,7	4,16	4,31	4,16	3,50	4,14	<3,2	<3,2	3,09	3,42	<3,2	<3,2	<3,2	4,08	4,22
	AN011	<2,7	<2,7	3,75	4,29	4,35	4,22	3,51	<2,7	3,28	3,55	3,42	<3,2	<3,2	3,42	3,37	4,67	5,09	4,97
2 prime CYD 1,2,3,4 rappel CYD 1,2,3,4	AM496	4,22	3,36	3,71	4,15	3,14	<3,1	3,58	<3,1	<3,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM645	4,21	3,61	2,82	3,51	3,65	3,24	<3,1	3,47	3,44	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM766	3,97	3,06	3,38	4,19	3,80	3,73	<3,1	<3,1	<3,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	
	AM813	4,81	4,60	3,17	<3,1	<3,1	<3,1	<3,1	<3,1	<3,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	

CYD1
CYD4
VDV2

Brièvement, les résultats peuvent être résumés comme suit :

5 - Le schéma d'administration selon la présente invention permet d'augmenter qualitativement et quantitativement la réponse anticorps neutralisante qui est obtenue avec un schéma comprenant deux immunisations identiques de vaccin tétravalent.

- Une immunisation CYD-1,2,3,4 pratiquée après une primo-immunisation monovalente VDV2 induit des réponses à des niveaux élevés contre les quatre sérotypes chez tous les singes, contrairement à un schéma comprenant 2 immunisations de vaccin tétravalent.

10 - La primo-immunisation conduite avec le VDV2 induit comme cela était attendu une réponse dirigée quasi-exclusivement contre le serotype 2, présentant une cross-réactivité de faible intensité contre les serotypes 1 et 4 chez certains animaux.

15 - Une virémie est observée avec le VDV2 après primo-immunisation, et est causée de manière prédominante par CYD-4 après la deuxième administration (b) (groupe 1). Aucune différence notable n'est observée avec la virémie induite après une primo-immunisation de vaccin tétravalent chez des animaux naïfs (groupe 2). On peut donc en conclure le schéma proposé par l'invention ne favorise pas l'émergence d'une virémie des sérotypes 1, 3 et 4
20 après la deuxième administration.

Les exemples montrent donc que la méthode d'immunisation selon la présente invention améliore l'immunogénicité des virus vaccinaux de la dengue sans altérer la sécurité de ces derniers.

25 Toutes les publications citées dans la présente demande sont incorporées dans leur intégralité à titre de référence.

Revendications :

1.- Utilisation de virus vaccinaux de la dengue pour la fabrication d'un vaccin monovalent et d'un vaccin tétravalent pour une immunisation contre le virus de la dengue comprenant :

5 (a) une première administration d'un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype,

(b) une deuxième administration d'un vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des 4 sérotypes de la dengue et dans laquelle le vaccin tétravalent est administré au moins 30 jours à au plus 12 mois après
10 l'administration du vaccin monovalent.

2.- Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle ledit virus vaccinal utilisé lors de la première administration (a) est sélectionné dans le groupe constitué des virus vaccinaux de la dengue de sérotype 1 ou 2.
15

3.- Utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle ledit virus vaccinal utilisé lors de la première administration (a) est sélectionné dans le groupe constitué des souches VDV1 et VDV2.

20 4.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans laquelle les virus vaccinaux utilisés dans le vaccin tétravalent sont les Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

25 5.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans laquelle la quantité de virus vaccinaux de la dengue de sérotypes 1, 2, 3 et 4 est comprise dans une gamme allant de 10^3 à 10^6 DICC₅₀.

30 6.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle le vaccin monovalent comprend 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et le vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

7.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle le vaccin monovalent comprend 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et le

vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 10^3 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-4.

8.- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans
5 laquelle la deuxième administration (b) est mise en œuvre 30 à 60 jours après la première administration (a).

9.- Kit d'immunisation contre le virus de la dengue comprenant un boîtier contenant au moins :

10 (a) un premier récipient renfermant un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal d'un premier sérotype de la dengue,

(b) un deuxième récipient renfermant un vaccin tétravalent comprenant des virus vaccinaux des 4 sérotypes de la dengue.

15 10.- Kit d'immunisation selon la revendication 9 comprenant au moins :

(a) un premier récipient contenant un vaccin monovalent comprenant un virus vaccinal VDV1 ou VDV2

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin tétravalent comprenant les 4 Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

20

11.- Kit d'immunisation selon la revendication 10 dans lequel le vaccin monovalent comprend 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et le vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 4.

25 12.- Kit d'immunisation selon la revendication 10 dans lequel le vaccin monovalent comprend 10^4 DICC₅₀ de VDV1 ou VDV2 et le vaccin tétravalent comprend 10^5 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-1, 2, 3 et 10^3 DICC₅₀ de Chimerivax™ DEN-4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/052431

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 A61P31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GUIRAKHOO F ET AL: "CONSTRUCTION, SAFETY, AND IMMUNOGENICITY IN NONHUMAN PRIMATES OF A CHIMERIC YELLOW FEVER-DENGUE VIRUS TETRAVALENT VACCINE" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 10, August 2001 (2001-08), pages 7290-7304, XP002961663 ISSN: 0022-538X abstract; table 6 page 7302, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1, 2, 4, 5, 8, 9</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 avril 2008

Date of mailing of the international search report

21/04/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou, Gabriel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2007/052431

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BLANEY J E ET AL: "DEVELOPMENT OF A LIVE ATTENUATED DENGUE VIRUS VACCINE USING REVERSE GENETICS" VIRAL IMMUNOLOGY, MARY ANN LIEBERT, INC., NEW YORK, US, vol. 19, no. 1, April 2006 (2006-04), pages 10-32, XP008068928 ISSN: 0882-8245 abstract; figure 8 page 23, right-hand column, last paragraph - page 24, right-hand column, paragraph 1</p>	
A	<p>SABCHAREON ARUNEE ET AL: "Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: Role of serotype concentration, ratio, and multiple doses." AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 66, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 264-272, XP002441733 ISSN: 0002-9637 page 271, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 3; figures 2-4; table 3</p>	
A	<p>GUIRAKHOO F ET AL: "Viremia and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Tetravalent Yellow Fever-Dengue Chimeric Vaccine: Genetic Reconstructions, Dose Adjustment, and Antibody Responses against Wild-type Dengue Virus Isolates" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 298, no. 1, 20 June 2002 (2002-06-20), pages 146-159, XP004469478 ISSN: 0042-6822 abstract page 155, right-hand column, last paragraph - page 156, left-hand column, paragraph 2; table 8</p>	
A	<p>EP 1 159 968 A (MAHIDOL UNIVERSITY [TH]) 5 December 2001 (2001-12-05) cited in the application the whole document</p>	
A	<p>WO 03/101397 A (ACAMBIS INC [US]; GUIRAKHOO FARSHAD [US]) 11 December 2003 (2003-12-11) cited in the application the whole document</p>	
A	<p>WO 01/60847 A2 (US HEALTH [US]; KINNEY RICHARD M [US]; KINNEY CLAIRE Y H [US]; BUTRAPE) 23 August 2001 (2001-08-23) abstract; sequences 3,15</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2007/052431

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1159968	A	NONE	
WO 03101397	A	AU 2003239932 A1	19-12-2003
WO 0160847	A2	AU 3844101 A CA 2398872 A1 EP 1263965 A2 JP 2003523189 T	27-08-2001 23-08-2001 11-12-2002 05-08-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052431

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. A61K39/12 A61P31/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

 Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, Sequence Search
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GUIRAKHOO F ET AL: "CONSTRUCTION, SAFETY, AND IMMUNOGENICITY IN NONHUMAN PRIMATES OF A CHIMERIC YELLOW FEVER-DENGUE VIRUS TETRAVALENT VACCINE" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 10, août 2001 (2001-08), pages 7290-7304, XP002961663 ISSN: 0022-538X abrégé; tableau 6 page 7302, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 ----- -/--	1,2,4,5, 8,9

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

 Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 avril 2008

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/04/2008

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Loubradou, Gabriel

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052431

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.b de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
 - a. Nature de l'élément
 - un listing de la ou des séquences
 - un ou des tableaux relatifs au listing de la ou des séquences
 - b. Type de support
 - sur papier
 - sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise
 - contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée
 - déposé(s) avec la demande internationale, sous forme électronique
 - remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2. De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listing des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052431

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BLANEY J E ET AL: "DEVELOPMENT OF A LIVE ATTENUATED DENGUE VIRUS VACCINE USING REVERSE GENETICS" VIRAL IMMUNOLOGY, MARY ANN LIEBERT, INC., NEW YORK, US, vol. 19, no. 1, avril 2006 (2006-04), pages 10-32, XP008068928 ISSN: 0882-8245 abrégé; figure 8 page 23, colonne de droite, dernier alinéa - page 24, colonne de droite, alinéa 1</p>	
A	<p>SABCHAREON ARUNEE ET AL: "Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: Role of serotype concentration, ratio, and multiple doses." AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, vol. 66, no. 3, mars 2002 (2002-03), pages 264-272, XP002441733 ISSN: 0002-9637 page 271, colonne de droite, alinéa 1 - alinéa 3; figures 2-4; tableau 3</p>	
A	<p>GUIRAKHOO F ET AL: "Viremia and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Tetravalent Yellow Fever-Dengue Chimeric Vaccine: Genetic Reconstructions, Dose Adjustment, and Antibody Responses against Wild-type Dengue Virus Isolates" VIROLOGY, ACADEMIC PRESS, ORLANDO, US, vol. 298, no. 1, 20 juin 2002 (2002-06-20), pages 146-159, XP004469478 ISSN: 0042-6822 abrégé page 155, colonne de droite, dernier alinéa - page 156, colonne de gauche, alinéa 2; tableau 8</p>	
A	<p>EP 1 159 968 A (MAHIDOL UNIVERSITY [TH]) 5 décembre 2001 (2001-12-05) cité dans la demande le document en entier</p>	
A	<p>WO 03/101397 A (ACAMBIS INC [US]; GUIRAKHOO FARSHAD [US]) 11 décembre 2003 (2003-12-11) cité dans la demande le document en entier</p>	
A	<p>WO 01/60847 A2 (US HEALTH [US]; KINNEY RICHARD M [US]; KINNEY CLAIRE Y H [US]; BUTRAPE) 23 août 2001 (2001-08-23) abrégé; séquences 3,15</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052431

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1159968	A	05-12-2001	AUCUN	
WO 03101397	A	11-12-2003	AU 2003239932 A1	19-12-2003
WO 0160847	A2	23-08-2001	AU 3844101 A	27-08-2001
			CA 2398872 A1	23-08-2001
			EP 1263965 A2	11-12-2002
			JP 2003523189 T	05-08-2003