

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



PCT

(43) Date de la publication internationale
24 avril 2008 (24.04.2008)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/047023 A2

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

(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.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/052054

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, 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).

(22) Date de dépôt international :
2 octobre 2007 (02.10.2007)

(25) Langue de dépôt : **français**

(26) Langue de publication : **français**

(30) Données relatives à la priorité :
0608660 4 octobre 2006 (04.10.2006) FR

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international

(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). FORRAT, Rémi; 2 rue Pierre Devaux, F-69780 Serezin Du Rhône (FR). LANG, Jean; 118 route de Saint-Priest, F-69780 Mions (FR). BARBAN, Véronique; 7 ter rue Jean-Claude Martin, F-69290 Craponne (FR).

(54) Title: IMMUNISATION METHOD 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 for inducing a protection against the 4 dengue serotypes in a patient, that comprises: (a) a first series of administrations (i) of a dose of a dengue vaccinal virus of a first serotype and a dose of a dengue vaccinal virus of a second serotype, and (ii) of a dose of a dengue vaccinal virus of a third serotype and a dose of a dengue vaccinal virus of a fourth serotype, and (b) a second series of administrations of the (i) and (ii) doses, wherein the (i) and (ii) doses are administered simultaneously at separate anatomical sites and wherein the second series is administered at least 30 days and at most 12 months after the first series.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode pour induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant : (a) une première série d'administrations (i) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype, et (ii) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype et (b) une deuxième série d'administrations des doses (i) et (ii), dans laquelle les doses (i) et (ii) sont administrées simultanément à des sites anatomiques distincts, et dans laquelle la deuxième série est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première série.

WO 2008/047023 A2

Méthode d'immunisation contre les 4 sérotypes de la Dengue

L'invention a pour objet une méthode permettant d'induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant

(a) une première série d'administrations (i) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype, et (ii) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype et

(b) une deuxième série d'administrations des doses (i) et (ii), dans laquelle les doses (i) et (ii) sont administrées simultanément à des sites anatomiques distincts, et

dans laquelle la deuxième série (b) est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première série (a).

Les maladies dengue sont causées par quatre virus du genre flavivirus de type sérologique proches mais distincts d'un point de vue antigénique (Gubler 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, 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 piqûre du moustique est d'environ 4 jours (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, une lymphadénopathie et une leucopénie (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 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 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 de 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 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 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 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 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 fébriles au sein les troupes américaines au cours de déploiements dans des zones tropicales endémiques pour la dengue (DeFraites 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 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.

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: 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 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, 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 antipyrrétiques 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 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 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.

L'utilisation de sites anatomiques différents pour l'administration de virus de la dengue a déjà été décrite dans la littérature.

Ainsi, Halstead et al. (1973, Am. J. Trop. Med. Hyg., 22 :375-381) ont montré qu'une administration de virus dengue sauvages effectuée en 2 ou 4 sites anatomiques séparés pour les 4 sérotypes différents induisait une protection contre une infection ultérieure. Cependant, les auteurs n'ont observé aucune supériorité de ce type d'immunisation séparée par rapport à une immunisation conduite en un seul site.

Les formes virales atténuées des virus dengue conduisent à des interférences chez l'homme lorsqu'elles sont administrées sous forme de vaccin tétravalent. Ce phénomène a en particulier été décrit dans les publications suivantes : Gubler D.J. Clin. Microbiol. Rev. 1998 ; 11 (3): 480-96 ; Rothman A.L. et al Vaccine 2001 ; 19 : 4694-9.

Zhou H et Deem MW. (Vaccine. 2006 Mar 24;24(14):2451-9) ont développé un modèle mathématique basé uniquement sur l'utilisation des épitopes CD8 et visant à simuler les interférences entre les épitopes CD8 des 4 sérotypes de la dengue. Selon ce modèle théorique, la meilleure façon d'éviter les interférences serait de faire une primo immunisation utilisant un épitope CD8 non dominant suivie d'un rappel par une administration à des sites anatomiques différents des mêmes épitopes CD8 de chacun des 4 sérotypes.

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 homologue comprenant des anticorps neutralisant les 4 sérotypes lorsque ces derniers sont administrés simultanément deux par deux en des sites anatomiques distincts lors d'une première série

d'administrations puis d'une deuxième série d'administrations mise en œuvre 30 jours à 12 mois après la première administration des 4 sérotypes.

Les inventeurs ont en particulier montré qu'une immunisation bivalente DEN-1,2 concomitante à une immunisation bivalente DEN-3,4 réalisée au niveau de deux sites anatomiques distincts et suivie d'un rappel des mêmes doses vaccinales dans les mêmes conditions induit des réponses contre les quatre sérotypes chez tous les singes immunisés, à l'exception d'un sérotype chez un animal. A l'inverse, une immunisation tétravalente conduite en un seul site n'a permis d'induire une réponse satisfaisante que contre deux sérotypes sur 4.

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 protection homologue contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant

(a) une première série d'administrations (i) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype et (ii) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype et

(b) une deuxième série d'administrations des doses (i) et (ii),

dans laquelle les doses (i) et (ii) sont administrées simultanément à des sites anatomiques distincts, et

dans laquelle la deuxième série est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première série.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode selon l'invention, les virus vaccinaux de la dengue (i) sont administrés sous forme d'une dose vaccinale bivalente unique.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode selon l'invention, les virus vaccinaux de la dengue (ii) sont administrés sous forme d'une dose vaccinale bivalente unique.

Selon un mode de réalisation particulier de la méthode d'immunisation selon l'invention, ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 1 est sélectionné dans le groupe constitué de la souche VDV1 et d'un ChimeriVax™ DEN-1.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 est sélectionné dans le groupe constitué de la souche VDV2 et d'un ChimeriVax™ DEN-2.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 1 est la souche VDV1 et ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 est la souche VDV2.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 1 est un ChimeriVax™ DEN-1 et ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 est un ChimeriVax™ DEN-2.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 3 est un ChimeriVax™ DEN-3.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 4 est un ChimeriVax™ DEN-4.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, les premier et deuxième sérotypes sont respectivement CYD DEN-1 et CYD DEN-2 et les troisième et quatrième sérotypes sont respectivement CYD DEN-3 et CYD DEN-4.

Selon un autre mode de réalisation particulier de la méthode selon l'invention, les premier et deuxième sérotypes sont respectivement CYD DEN-1 et CYD DEN-3 et les troisième et quatrième sérotypes sont respectivement CYD DEN-2 et CYD DEN-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 est comprise dans une gamme allant de 10^3 à 10^6 DICC₅₀.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode selon l'invention, les virus vaccinaux utilisés dans la deuxième série d'administrations sont identiques à ceux utilisés dans la première série d'administration.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode selon l'invention, la deuxième série d'administrations est mise en œuvre 30 à 60 jours après la première série d'administrations.

La présente invention a également pour objet un kit d'immunisation contre le virus de la dengue comprenant un boîtier contenant au moins les virus vaccinaux de la dengue des sérotypes 1, 2, 3 et 4

- (a) sous la forme de compositions monovalentes contenues dans 4 récipients séparés, ou
- (b) sous la forme de deux compositions bivalentes contenues dans 2 récipients séparés.

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

- (a) un premier récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2, et
- (b) un deuxième récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-3 et un ChimeriVax™ DEN-4.

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

- (a) un premier récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-3, et
- (b) un deuxième récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-2 et un ChimeriVax™ DEN-4.

La présente invention a également pour objet un kit d'immunisation contre le virus de la dengue comprenant un boîtier contenant au moins les virus vaccinaux de la dengue d'un premier et d'un deuxième sérotypes,

- (a) sous la forme de 2 compositions monovalentes contenues dans 2 récipients séparés, ou
- (b) sous la forme d'une composition bivalente contenue dans 1 seul récipient.

Selon un mode de réalisation, le kit comprend au moins :

- (a) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-3, ou

- (b) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-2 et un ChimeriVax™ DEN-4, ou
- (c) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2, ou
- (d) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-3 et un ChimeriVax™ DEN-4.

La présente invention fournit également une composition ou un vaccin bivalent comprenant une quantité immunoéfficace des virus vaccinaux de la dengue d'un premier et d'un deuxième sérotypes et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition ou vaccin bivalent comprend les virus vaccinaux sélectionnés dans le groupe consistant en : ChimeriVax™ DEN-1 et ChimeriVax™ DEN-3 ; ou ChimeriVax™ DEN-2 et ChimeriVax™ DEN-4 ; ou ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2 ; ou ChimeriVax™ DEN-3 et ChimeriVax™ DEN-4.

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

Définitions

Dans le cadre de la présente invention, deux sites anatomiques sont « distincts », s'ils sont drainés par des ganglions lymphatiques différents. Par exemple, le bras droit et le bras gauche sont considérés comme des sites distincts. On peut également citer à titre d'exemples non limitatifs les sites distincts suivants: le bras droit/la cuisse droite ; le bras gauche /la cuisse gauche, le bras gauche/la cuisse droite.

On entend dans le cadre de la présente invention par « administrations simultanées » des administrations mises en œuvre le même jour (i.e. au plus 24H). Des administrations simultanées sont avantageusement réalisées à au plus 1 heure d'intervalle l'une de l'autre, classiquement à 1-5 minutes l'une de l'autre.

Dans le cadre de présente invention, les doses (i) sont administrées au niveau d'un premier site anatomique, soit sous la forme de deux doses monovalentes, soit sous la forme d'une dose bivalente unique. Les doses (ii)

sont quant à elles administrées simultanément au niveau d'un deuxième site anatomique, soit sous la forme de deux doses monovalentes, soit sous la forme d'une dose bivalente unique, les premier et deuxième sites étant des sites distincts tels que définis ci-dessus.

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 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 capside pour former une nucléocapside. 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 immune homologue spécifique, de 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.

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 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 règlementaires pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le 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'induise 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 induire une réponse anticorps neutralisante.

On peut citer à titre d'exemples non limitatifs, de virus vaccinal 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, 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 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 ChimeriVax™ 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 dengue de sérotype 1 peut être par exemple la souche vaccinale VDV1 ou un ChimeriVax™ 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 ChimeriVax™ 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 YF17D/DEN-4.. Cette souche 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-2483.

« VDV » ou « vaccin dengue Vero» désigne une souche virale dengue vivante atténuée adaptée sur cellule Vero et capable d'induire 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 transfété 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 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 ont été décrits dans la demande de brevet internationale déposée aux noms de Sanofi-Pasteur et du Center for Disease Control and Prevention sous le numéro PCT/IB 2006/001313.

« 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 transfété dans des 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 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 PCT/IB 2006/001513.

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 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 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 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 dans les exemples ont été générés par utilisation des séquences prM et E issues des souches DEN 1 PUO359 (TYP1140), DEN2 PUO218, DEN3 PaH881/88 et DEN 4 1288 (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 atténueée YF17D (Theiler M, and Smith HH (1937) J Exp. Med 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 (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 être utilisée dans le cadre de la présente invention pour la construction des chimères.

La présente invention a donc également pour objet une composition ou vaccin bivalent comprenant une quantité immunoéfficace d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Pour un descriptif des virus vaccinaux utilisables dans les vaccins selon l'invention, on peut se référer à la description qui en est donnée dans le cadre de la méthode d'immunisation selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, la composition ou vaccin bivalent selon l'invention comprend CYD DEN-1 et CYD DEN-2, ou CYD DEN-3 et CYD DEN-4, ou CYD DEN-1 et CYD DEN-3 ou CYD DEN-2 et CYD DEN-4, avantageusement les virus vaccinaux sont présents dans le vaccin à une quantité de 10^5 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 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 seul sérotype

de virus dengue. Une dose, une composition ou un vaccin est « bivalent » lorsqu'il contient deux sérotypes différents de virus dengue. Une dose, une composition ou un vaccin est « trivalent » lorsqu'il contient trois sérotypes différents de virus dengue. Une dose, une composition ou un vaccin est « tétravalent » lorsqu'il contient quatre sérotypes différents de virus 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.

Immunisation simultanée en des sites anatomiques distincts

Les inventeurs ont montré en particulier que l'administration des 4 sérotypes sous la forme de deux administrations bivalentes simultanées à des sites anatomiques distincts suivies d'un rappel 30 jours à 12 mois après la première série d'administrations permet d'obtenir une protection homologue 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, les 4 sérotypes de la dengue peuvent être administrés dans un ordre quelconque pour autant qu'ils soient administrés deux par deux (i.e. doses (i) et (ii) respectivement sous forme de deux doses monovalentes ou d'une dose bivalente unique) de façon simultanée en des sites distincts.

La méthode selon la présente invention peut donc être mise en œuvre avec les modes de réalisation décrits ci-dessous :

- (i) : sérotypes 1 et 2 ; (ii) sérotypes 3 et 4 ; ou
- (i) : sérotypes 1 et 3 ; (ii) sérotypes 2 et 4 ; ou
- (i) : sérotypes 1 et 4 ; (ii) sérotypes 2 et 3 ; ou
- (i) : sérotypes 2 et 3 ; (ii) sérotypes 1 et 4 ; ou

- (i) : sérotypes 2 et 4 ; (ii) sérotypes 1 et 3 ; ou
- (i) : sérotypes 3 et 4 ; (ii) sérotypes 1 et 2.

De préférence, la méthode selon la présente invention comprend l'administration des virus vaccinaux de la dengue suivants : (i) : sérotypes 1 et 2 ; (ii) sérotypes 3 et 4 ou (i) sérotypes 1 et 3 ; (ii) sérotypes 2 et 4. Les doses (i) et (ii) se présentent avantageusement sous la forme de doses bivalentes.

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

- (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-2 ; (ii) CYD DEN-3 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-3 ; (ii) CYD DEN-2 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-4 ; (ii) CYD DEN-2 et CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-2 et CYD DEN-3 ; (ii) CYD DEN-1 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-2 et CYD DEN-4 ; (ii) CYD DEN-1 et CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-3 et CYD DEN-4 ; (ii) CYD DEN-1 et CYD DEN-2
- (i) VDV-1 et CYD DEN-2 ; (ii) CYD DEN-3 et CYD DEN-4
- (i) VDV-1 et CYD DEN-3 ; (ii) CYD DEN-2 et CYD DEN-4
- (i) VDV-1 et CYD DEN-4 ; (ii) CYD DEN-2 et CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-2 et CYD DEN-3 ; (ii) VDV-1 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-2 et CYD DEN-4 ; (ii) VDV-1 et CYD DEN-3
- (i) CYD DEN-3 et CYD DEN-4 ; (ii) VDV-1 et CYD DEN-2
- (i) CYD DEN-1 et VDV-2 ; (ii) CYD DEN-3 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-3 ; (ii) VDV-2 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-4 ; (ii) VDV-2 et CYD DEN-3
- (i) VDV-2 et CYD DEN-3 ; (ii) CYD DEN-1 et CYD DEN-4
- (i) CYD DEN-3 et CYD DEN-4 ; (ii) CYD DEN-1 et VDV-2
- (i) VDV-1 et VDV-2 ; (ii) CYD DEN-3 et CYD DEN-4
- (i) VDV-1 et CYD DEN-3 ; (ii) VDV-2 et CYD DEN-4
- (i) VDV-1 et CYD DEN-4 ; (ii) VDV-2 et CYD DEN-3
- (i) VDV-2 et CYD DEN-3 ; (ii) VDV-1 et CYD DEN-4 et
- (i) VDV-2 et CYD DEN-4 ; (ii) VDV-1 et CYD DEN-3.
- (i) CYD DEN-3 et CYD DEN-4; (ii) VDV-1 et VDV-2 ;

De préférence, la méthode d'immunisation selon l'invention comprend l'administration des virus vaccinaux de la dengue suivants (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-2 ; (ii) CYD DEN-3 et CYD DEN-4 ; ou (i) CYD DEN-1 et CYD DEN-3 ; (ii) CYD DEN-2 et CYD DEN-4. Les doses (i) et (ii) se présentent avantageusement sous la forme de doses bivalentes.

La méthode d'immunisation selon la présente invention comprend une deuxième série d'administrations réalisée de 30 jours à 12 mois, avantageusement de 30 jours à 3 mois, de préférence 30 jours, 45 jours ou 60 jours après la première série des administrations (i et ii) qui comprend avantageusement l'administration des mêmes compositions que celles utilisées lors de la première série qui sont administrées avantageusement dans les mêmes conditions.

On entend par « dose de virus vaccinal » dans le cadre de la présente invention une composition comprenant une « quantité immunoéfficace » du virus vaccinal de la dengue, c'est-à-dire une quantité suffisante de virus de la dengue pour induire une réponse anticorps neutralisante homologue, qui peut être mise en évidence par exemple par le test de séronutralisation 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).

Les quantités de souche vaccinale 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 sérotype 1, 2, 3 ou 4 pour une composition monovalente ou bivalente. 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, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ ou 10⁶ DICC₅₀ en particulier dans une gamme allant de 10³ à 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 doses, monovalentes ou bivalentes, de virus vaccinaux comprennent respectivement 10^5 DICC₅₀ de CYD DEN-1, de CYD DEN-2, de CYD DEN-3 et de CYD DEN-4.

La réponse anticorps neutralisante est avantageusement durable, c'est-à-dire qu'elle peut être détectée dans le sérum au moins 6 mois, après la deuxième série des administrations (i) et (ii).

La dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et la dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype (i.e. dose(s) (i)) sont administrées simultanément sous forme de deux compositions monovalentes, ou avantageusement sous la forme d'une composition ou dose bivalente unique.

De la même manière, la dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et la dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype (i.e. dose(s) (ii)) sont administrées simultanément sous forme de deux compositions vaccinales monovalentes, ou avantageusement sous la forme d'une composition vaccinale bivalente unique.

Les virus vaccinaux sont administrés sous forme de compositions vaccinales ou doses de virus vaccinaux qui peuvent être préparées 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 la souche vaccinale administrée 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 vaccinales selon l'invention peuvent être administrées 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 vaccinales sont des compositions injectables administrées par voie sous-cutanée au niveau de la région du deltoïde gauche et du deltoïde droit.

Le volume de composition 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 série d'administrations selon l'invention. Les administrations de rappel vont être mises en œuvre avantageusement en

utilisant les mêmes compositions vaccinales (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 les 1^{ère} et 2^{ème} séries d'administrations.

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 façon générale à tout virus vaccinal de la dengue.

La présente invention a donc également pour objet l'utilisation de doses de virus vaccinal de la dengue pour la préparation d'un vaccin pour induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue comprenant :

(a) une première série d'administrations (i) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype, et (ii) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype et

(b) une deuxième série d'administrations des doses (i) et (ii),

dans laquelle les doses (i) et (ii) sont administrées simultanément à des sites anatomiques distincts, et

dans laquelle la deuxième série est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première série.

Pour un descriptif des virus vaccinaux de la dengue utilisables dans le cadre de la présente invention on peut se reporter au descriptif qui en est donné en relation avec la méthode d'immunisation selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un kit d'immunisation contre les quatre sérotypes du virus de la dengue. Le kit selon la présente invention comprend les doses telles que définies ci-dessus en relation avec la méthode d'immunisation proposée. Le kit selon l'invention comprend donc un boîtier renfermant les différents récipients contenant les doses vaccinales et

avantageusement une brochure explicative renfermant les informations utiles pour l'administration des vaccins.

Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend un boîtier contenant au moins les virus vaccinaux de la dengue des sérotypes 1, 2, 3 et 4

(a) sous la forme de compositions monovalentes contenues dans 4 récipients séparés, ou

(b) sous la forme de deux compositions bivalentes contenues dans 2 récipients séparés.

Selon un autre mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend un boîtier contenant au moins les virus vaccinaux de la dengue d'un premier et d'un deuxième sérotype,

(a) sous la forme de 2 compositions monovalentes contenues dans 2 récipients séparés, ou

(b) sous la forme d'une composition bivaleure contenue dans 1 seul récipient.

Pour un descriptif des virus vaccinaux de la dengue utilisables dans le kit selon l'invention, on peut se référer à la description des virus vaccinaux donnée ci-dessus en relation avec la méthode d'immunisation selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier, le kit selon la présente invention comprend donc au moins :

(a) un premier récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2, et

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-3 et un ChimeriVax™ DEN-4.

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

(a) un premier récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-3, et

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-2 et un ChimeriVax™ DEN-4.

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

- (a) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-3, ou
- (b) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-2 et un ChimeriVax™ DEN-4, ou
- (c) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2, ou
- (d) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-3 et un ChimeriVax™ DEN-4.

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

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.

L'invention est illustrée par les exemples suivants.

EXEMPLES

Exemple 1 : Immunisation par injection simultanée de deux compositions bivalentes en des sites anatomiques distincts 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 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 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, 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.

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 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 sérototype dans les échantillons positifs pour l'ARN NS5 YF (voir aussi 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 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 virus™ » 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.

Les mélanges réactionnels contenaient, en plus des composants du kit de quantification RT-PCR « Qiagen QauntitectTM 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, 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 ABI Prism 700TM 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)

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 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.

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-N85	sens	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 bases)
	YF N85	anti	5' CCAGGCCAACCTGTCAT (18 bases)
	YF-N85		5' Fam- CGACTGTGTGGCCGCCATC -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-TG CGATAGGAATTATCACACTCTATCTGGAGC-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-AGAAACACTTCAATGGCAAATGACGTGCAT-Tamra (29 b)
VDV1 spe	VDV1-N85	sens	5' TCG CAA CAG CCT TAA CAG C (19 b)
	VDV1-N85	anti	5' ACT ATC TCC CTC CCA TCC TTC (21 b)
	VDV1-N85		5' Fam-TTC ACA CCA CTT CCA C-M GB/NFQ (16 b)
VDV2 spec	VDV2-N85	sens	5' AAT GAC AGA CAC GAC TCC (18 b)
	VDV2-N85	anti:	5' CCC AAA ACC TAC TAT CTT CAA C (22 b)
	VDV2-N85		5' Fam-TGG AAG TCG GCA CGT GA-MGB/NFQ (17 b)

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). 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.

Dans une plaque de 96 trous, 0,120 ml de chaque sérum décomplémenté est ajouté à 0,480 ml de diluant (ISCOVE 4% SVF) par trou. 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 $2,7 \log_{10}$ DICC50/ml sont ajoutés dans chaque trou de façon à obtenir 25 DICC50/trou. La plaque est incubée à 37°C pendant 1 heure. 0.1 ml de chaque dilution est ensuite distribué dans 6 trous d'une plaque de 96 trous dans laquelle des cellules VERO ont été ensemencées 3 jours avant le début de l'expérience à une densité de 8000 cellules/trou, 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). 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. Les titres en anticorps neutralisants sont calculés en utilisant la formule de Karber telle que définie ci-dessous :

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

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)

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).

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.

Le titre moyen (GMT) est établi en calculant la moyenne géométrique des titres exprimés en valeur linéaire, les échantillons dont le titre est inférieur au seuil de détection se voient attribuer, par convention, une valeur égale à la moitié de ce seuil.

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, à une dose 10^5 DICC₅₀ pour chaque sérotype pour les vaccins CYD DEN 1 à 4.

Tableau 2 : Composition des groupes et protocole d'immunisation

Singes		
Groupe	Immunisations	
	J0	J58
1	CYD 1 2 dans un bras CYD 3 4 dans l'autre bras	CYD 1 2 dans un bras CYD 3 4 dans l'autre bras
2	CYD 1234	CYD 1234

Les résultats d'immunogénicité obtenus après une immunisation (J28) et deux immunisations (J86) sont présentés dans le tableau 3.

Les résultats de virémie sont donnés dans le tableau 4.

- 27 -

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

Groupe	ID	Singes		J0+28				J58+28			
		J0	J58	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	AP545	CYD 1 2 dans un bras	CYD 1 2 dans un bras	20	25	-	50	40	50	-	319
	AO949	CYD 3 4 dans l'autre bras	CYD 3 4 dans l'autre bras	20	-	-	20	319	20	13	100
	AP335			20	-	-	252	100	16	10	200
	AP817			20	16	32	40	319	25	32	402
	Moy géométrique			20	10	8	56	142	25	12	225
	AP676			63	-	-	126	100	-	-	40
2	AQ005	CYD 1234	CYD 1234	25	-	-	63	50	-	-	63
	AP961			50	-	-	158	80	-	80	400
	AQ163			63	-	-	40	100	-	16	252
	Moy géométrique			47	< 10	< 10	84	80	< 10	13	126

5 - : titre < 10

5

- 28 -

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

Groupe	Singe	Primoimmunisation						Rappel								
		J2	J3	J4	J6	J7	J8	J9	J10	J58	J59	J62	J63	J64	J65	J66
1 CYD1,2 + CYD3,4 2pts injection	AP545	3,17	-	-	-	3,12	3,67	4,55	4,59	-	-	-	-	-	-	-
	AO949	3,93	3,66	3,34	4,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AP335	3,36	3,06	3,34	3,83	4,05	4,41	4,24	3,64	-	-	-	-	-	-	-
	AP817	4,17	3,99	3,61	-	-	-	-	-	2,89	-	-	-	-	-	-
2 CYD 1,2,3,4 1 pt d'injection	AP676	-	-	-	-	-	-	-	3,65	-	-	-	-	-	-	-
	AQ005	3,19	-	3,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AP961	-	-	-	-	-	3,86	3,42	3,29	3,56	-	-	-	-	-	-
	AQ163	3,18	3,16	-	3,30	3,60	2,95	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-

Serotypes

CYD1	
CYD2	
CYD3	
CYD4	
CYD1+4	

Brièvement, les résultats peuvent être résumés comme suit :

- Le schéma d'administration selon la présente invention permet d'augmenter qualitativement et quantitativement la réponse anticorps neutralisante homologue qui est obtenue avec la vaccination tétravalente.

- L'immunisation bivalente CYD-1,2 concomitante à une immunisation CYD-3,4 conduit à un site anatomique distinct induit après rappel des réponses homologues contre les quatre sérotypes chez tous les singes, sauf pour le serotype 3 chez un animal.

- De plus, les réponses contre les sérotypes 1 et 4 ont une tendance à être plus élevées dans le cas d'immunisations bivalentes simultanées que lors de l'immunisation tétravalente en un seul site.

- La virémie (tableau 4) est causée de manière prédominante par CYD-4, que ce soit après administration bivalente simultanée ou tétravalente. On peut donc en conclure que la séparation des sérotypes ne favorise pas l'émergence d'une virémie des sérotypes 1, 2 et 3.

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.

Exemple 2 Immunisation par injection simultanée de deux compositions bivalentes CYD-1,4 et CYD-2,3 en des sites anatomiques distincts chez le singe

La virémie et l'immunogénicité ont été testées dans le modèle singe comme dans l'exemple 1. Dans le présent exemple, les compositions bivalentes testées contiennent respectivement les virus vaccinaux les plus immunogènes (CYD-1,4) et les virus vaccinaux les moins immunogènes (CYD-2,3).

2.1 Matériels et méthodes : identiques à l'exemple 1

2.2 Evaluation des immunisations simultanées

2 groupes de 4 singes d'âge et poids équivalents ont été immunisés.
(voir tableau 5)

L'immunisation a été effectuée comme décrit dans l'exemple 1

Tableau 5 : Composition des groupes et protocole d'immunisation

Singes		
Groupe	Immunisations	
	J0	J58
1	CYD 1 4 dans un bras CYD 2 3 dans l'autre bras	CYD 1 4 dans un bras CYD 2 3 dans l'autre bras
	2	CYD 1234
		CYD 1234

Les résultats d'immunogénicité obtenus après une immunisation (J28) et deux immunisations (J86) sont présentés dans le tableau 6.

Les résultats de virémie sont similaires à ceux obtenus dans l'exemple 1, montrant une virémie induite par le sérotype 4 et pas de différences significatives entre les deux groupes

Tableau 6 : titre neutralisant SN50 (unités 1/dil)

Groupe	ID	Singes		J0+28				J58+28			
		J0	J58	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	AR465		63	10	<	100	200	25	10	126	
	AR558		13	<	<	126	401	<	20	160	
	AR559	CYD 1234	<	<	<	100	13	<	<	50	
	AR639		25	<	<	318	201	<	<	201	
	Moyenne géométrique		20	<	<	142	119	<	<	119	
	AR083	CYD 1 4 dans un bras	63	<	<	201	100	16	10	126	
2	AR506	CYD 2 3	63	25	13	638	126	100	32	201	
	AR610	dans l'autre bras	63	20	<	100	159	50	40	253	
	AR644		40	<	<	40	505	80	40	100	
	Moyenne géométrique		56	<	<	150	178	50	27	159	

< : titre < 10

Les résultats confortent ceux obtenus dans l'exemple 1 et peuvent être résumés comme suit :

- Le schéma d'administration permet d'augmenter qualitativement et quantitativement la réponse anticorps neutralisante homologue qui est obtenue avec la vaccination tétravalente.

- L'immunisation bivalente CYD-1,4 concomitante à une immunisation CYD-2,3 conduit à un site anatomique distinct induit après rappel des réponses homologues contre les quatre sérotypes chez tous les singes, ce qui n'est pas le cas dans le groupe tétravalent classique, comme vu dans l'exemple 1.

- Comparés à ceux du groupe de singes ayant reçu deux bivalents CYD-1,2 et CYD-3,4 dans l'exemple 1, les niveaux anticorps observés après immunisation bivalente CYD-1,4 concomitante à une immunisation CYD-2,3 sont supérieurs pour les sérotypes 1, 2 et 3, et inférieurs pour le sérotype 4, ce qui montre une réponse mieux équilibrée entre les 4 sérotypes, avec une dominance moindre du 4.

- La séparation des sérotypes dominants des autres dans un tel schéma d'immunisation a permis une réponse équilibrée contre les 4 sérotypes

Les 2 exemples ci-dessus 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 telle qu'évaluée par la mesure de la virémie.

REVENDICATIONS

1. Méthode permettant d'induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue chez un patient, comprenant :

(a) une première série d'administrations (i) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype et (ii) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype et

(b) une deuxième série d'administrations des doses (i) et (ii), dans laquelle les doses (i) et (ii) sont administrées simultanément à des sites anatomiques distincts, et

dans laquelle la deuxième série est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première série.

2. Méthode selon la revendication 1 dans laquelle les virus vaccinaux de la dengue (i) sont administrés sous forme d'une dose bivalente unique.

3. Méthode selon les revendications 1 ou 2, dans laquelle, les virus vaccinaux de la dengue (ii) sont administrés sous forme d'une dose vaccinale bivalente unique.

4. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 dans laquelle ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 1 est sélectionné dans le groupe constitué de la souche VDV1 et d'un ChimeriVax™ DEN-1.

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 dans laquelle ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 est sélectionné dans le groupe constitué de la souche VDV2 et d'un ChimeriVax™ DEN-2.

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans laquelle ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 1 est la souche VDV1 et ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 est la souche VDV2.

7. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 dans laquelle ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 1 est un ChimeriVax™ DEN-1 et ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 2 est un ChimeriVax™ DEN-2.

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dans laquelle ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 3 est un ChimeriVax™ DEN-3.

9. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans laquelle ledit virus vaccinal de la dengue de sérotype 4 est un ChimeriVax™ DEN-4.

10. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 7-9 dans laquelle les premier et deuxième sérotypes sont respectivement CYD DEN-1 et CYD DEN-2 et les troisième et quatrième sérotypes sont respectivement CYD DEN-3 et CYD DEN-4.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 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.

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans laquelle les virus vaccinaux utilisés dans la deuxième série d'administrations sont identiques à ceux utilisés dans la première série d'administration.

13. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 dans laquelle la deuxième série d'administrations est mise en œuvre 30 à 60 jours après la première série d'administrations.

14. Kit d'immunisation contre le virus de la dengue comprenant un boîtier contenant au moins les virus vaccinaux de la dengue des sérotypes 1, 2, 3 et 4 :

(a) sous la forme de compositions monovalentes contenues dans 4 récipients séparés, ou

(b) sous la forme de deux compositions bivalentes contenues dans 2 récipients séparés.

15. Kit selon la revendication 14 comprenant au moins :

(a) un premier récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2, et

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-3 et un ChimeriVax™ DEN-4.

16. Kit selon la revendication 14 comprenant au moins :

(a) un premier récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-3, et

(b) un deuxième récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-2 et un ChimeriVax™ DEN-4.

17. Kit d'immunisation contre le virus de la dengue comprenant un boîtier contenant au moins les virus vaccinaux de la dengue d'un premier et d'un deuxième sérotype,

(a) sous la forme de 2 compositions monovalentes contenues dans 2 récipients séparés, ou

(b) sous la forme d'une composition bivalente contenue dans 1 seul récipient.

18. Kit selon la revendication 17 comprenant au moins :

(a) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-3, ou

(b) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-2 et un ChimeriVax™ DEN-4, ou

(c) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2, ou

(d) un récipient contenant un vaccin bivalent comprenant un ChimeriVax™ DEN-3 et un ChimeriVax™ DEN-4.

19. Vaccin bivalent comprenant une quantité immunoéfficace les virus vaccinaux de la dengue d'un premier et d'un deuxième sérotype et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

20. Vaccin bivalent selon la revendication 19 comprenant les virus vaccinaux sélectionnés dans le groupe consistant en : ChimeriVax™ DEN-1 et ChimeriVax™ DEN-3 ; ou ChimeriVax™ DEN-2 et ChimeriVax™ DEN-4 ; ou ChimeriVax™ DEN-1 et un ChimeriVax™ DEN-2 ; ou ChimeriVax™ DEN-3 et ChimeriVax™ DEN-4.

21. Utilisation de doses de virus vaccinal de la dengue pour la préparation d'un vaccin pour induire une protection contre les 4 sérotypes de la dengue comprenant :

(a) une première série d'administrations (i) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un premier sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un deuxième sérotype , et (ii) d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un troisième sérotype et d'une dose d'un virus vaccinal de la dengue d'un quatrième sérotype et

(b) une deuxième série d'administrations des doses (i) et (ii),
dans laquelle les doses (i) et (ii) sont administrées simultanément à des sites anatomiques distincts, et

dans laquelle la deuxième série est mise en œuvre au moins 30 jours à au plus 12 mois après la première série.