

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5269796号
(P5269796)

(45) 発行日 平成25年8月21日 (2013. 8. 21)

(24) 登録日 平成25年5月17日 (2013. 5. 17)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/12 (2006. 01)	A 6 1 K 39/12 Z N A
A 6 1 K 39/295 (2006. 01)	A 6 1 K 39/295
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/14 (2006. 01)	A 6 1 P 31/14

請求項の数 12 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2009-530916 (P2009-530916)	(73) 特許権者	592055820
(86) (22) 出願日	平成19年10月2日 (2007. 10. 2)		サノフィ・パスツール
(65) 公表番号	特表2010-505801 (P2010-505801A)		S A N O F I P A S T E U R
(43) 公表日	平成22年2月25日 (2010. 2. 25)		フランス69367リヨン・セデックス0
(86) 国際出願番号	PCT/FR2007/052054		7、アヴニュ・ボン・パストゥール2番
(87) 国際公開番号	W02008/047023	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成20年4月24日 (2008. 4. 24)		弁理士 田中 光雄
審査請求日	平成22年9月7日 (2010. 9. 7)	(74) 代理人	100084146
(31) 優先権主張番号	0608660		弁理士 山崎 宏
(32) 優先日	平成18年10月4日 (2006. 10. 4)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100156100
			弁理士 西野 満
		(74) 代理人	100157956
			弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 4種の Dengue 血清型に対する免疫付与の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における 4 種の Dengue 血清型 1 ~ 4 に対する防御を誘導するためのワクチン組成物であって、

(a) (i) ワクチン第一血清型 Dengue ウイルスおよびワクチン第二血清型 Dengue ウイルスの二価用量、ならびに (i i) ワクチン第三血清型 Dengue ウイルスおよびワクチン第四血清型 Dengue ウイルスの二価用量の第一段階投与成分、および

(b) 用量 (i) および (i i) の第二段階投与成分を含むワクチン組成物であり、

2 つの段階投与成分 (a) および (b) の用量 (i) および (i i) が解剖学的に別の部位に同時に投与され、

第二段階投与成分が第一段階投与成分の投与後少なくとも 30 日以上、最長で 12 ヶ月以内に投与され、

ワクチン第一、第二、第三および第四血清型 Dengue ウイルスが、それぞれ、

血清型 1、2、3 および 4 のワクチン Dengue ウイルス；

血清型 1、3、2 および 4 のワクチン Dengue ウイルス；

血清型 1、4、2 および 3 のワクチン Dengue ウイルス；

血清型 2、3、1 および 4 のワクチン Dengue ウイルス；

血清型 2、4、1 および 3 のワクチン Dengue ウイルス；または

血清型 3、4、1 および 2 のワクチン Dengue ウイルスであり；かつ

10

20

投与される血清型 1、2、3 および 4 の各ワクチン Dengue ウイルスの用量が同一である、ワクチン組成物。

【請求項 2】

血清型 1 のワクチン Dengue ウイルスが V D V 1 株および C h i m e r i V a x (商標) D E N - 1 からなる群より選択される、請求項 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 3】

血清型 2 のワクチン Dengue ウイルスが V D V 2 株および C h i m e r i V a x (商標) D E N - 2 からなる群より選択される、請求項 1 ないし 2 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 4】

血清型 1 のワクチン Dengue ウイルスが V D V 1 株であり、血清型 2 のワクチン Dengue ウイルスが V D V 2 株である、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 5】

血清型 1 のワクチン Dengue ウイルスが C h i m e r i V a x (商標) D E N - 1 であり、血清型 2 のワクチン Dengue ウイルスが C h i m e r i V a x (商標) D E N - 2 である、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

血清型 3 のワクチン Dengue ウイルスが C h i m e r i V a x (商標) D E N - 3 である、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

血清型 4 のワクチン Dengue ウイルスが C h i m e r i V a x (商標) D E N - 4 である、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

第一および第二血清型がそれぞれ C Y D D E N - 1 および C Y D D E N - 2 であり、第三および第四血清型がそれぞれ C Y D D E N - 3 および C Y D D E N - 4 である、請求項 1 ないし 3 および 5 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

第一および第二血清型がそれぞれ C Y D D E N - 1 および C Y D D E N - 4 であり、第三および第四血清型がそれぞれ C Y D D E N - 2 および C Y D D E N - 3 である、請求項 1 に記載のワクチン組成物。

【請求項 10】

血清型 1、2、3 および 4 のワクチン Dengue ウイルスの量が 10^3 から 10^6 C C I D $_{50}$ の範囲内である、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 11】

第二段階投与成分に使用されるワクチンウイルスが第一段階投与成分に使用されるものと同一である、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 12】

第二段階投与成分が第一段階投与成分の投与後 30 日から 60 日までに投与される、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は患者における 4 種の Dengue 血清型に対する防御を誘導するための方法であって、

(a) (i) ワクチン第一血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第二血清型 Dengue ウイルス用量、ならびに (i i) ワクチン第三血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第四血清型 Dengue ウイルス用量の第一段階投与、および

(b) 用量 (i) および (i i) の第二段階投与を含む方法であり、

用量 (i) および (i i) が解剖学的に別の部位に同時に投与され、

10

20

30

40

50

第二段階投与 (b) が第一段階投与 (a) 後少なくとも 30 日以上、最長で 12 ヶ月以内に遂行される、方法に関する。

【背景技術】

【0002】

デング熱疾患は、フラビウイルス属の 4 種のウイルスによって引き起こされ、この血清型は似ているけれども抗原性の観点から区別できる (Gubler ら., 1988: 節足動物媒介性ウイルス疾患の疫学. Monath TPM 編, Boca Raton (FL): CRC Press: 223 - 60; Kautner ら., 1997, J. of Pediatrics, 131: 516 - 524; Rigau - Perez ら., 1998, Lancet; 352: 971 - 977; Vaughn ら., 1997, J. Infect Dis; 176: 322 - 30)。デング血清型に感染すると、非特異性ウイルス症候群から致命的となる重篤な出血性疾患の範囲にまで及ぶ臨床疾患が引き起こされ得る。蚊に刺された後のデング熱の潜伏期間は、およそ 4 日 (3 日から 14 日の範囲) である。デング熱は二相性発熱、頭痛、身体中の痛み、衰弱、発疹、リンパ節腫大および白血球減少症 (Kautner ら., 1997, J. of Pediatrics, 131: 516 - 524; Rigau - Perez ら., 1998, Lancet; 352: 971 - 977) によって特徴付けられる。ウイルス血症期は発熱性疾患期と同じである (Vaughn ら., 1997, J. Infect. Dis.; 176: 322 - 30)。デング熱は 7 ないし 10 日間で回復するが、通常遷延性の無力症が生じる。白血球数および血小板数の減少が一般的に生じる。

【0003】

出血性デング熱は、重篤な内出血と合併して血液量減少や低血圧症 (ショック症候群を伴うデング熱) に至る恐れがある恒常性異常および血管透過性の増加によって特徴付けられる重篤な熱性疾患である。出血性デング熱の致死率は、治療が行なわれないと 10% までにのぼるが、治療経験のあるほとんどのセンターでは、1% である (WHO technical Guide, 1986. デング出血熱: 診断, 治療および制御, p 1 - 2. 世界保健機関, ジュネーブ, スイス)。

【0004】

通常行なわれるデング熱の検査室診断はウイルスの単離および / またはデングウイルスに特異的な抗体の検出に基づくものである。

【0005】

デング熱はマラリアに次いで二番目によく見られる熱帯伝染病であり、世界人口の半分以上が流行性伝播の危険性がある地域に住んでいる。毎年、デング熱の件数は 5 千万から 1 億と見積もられ、出血性デング熱で 50 万人の患者が入院し、2 万 5 千人が命を落としている。デング熱はアジア、太平洋領域、アフリカ、ラテンアメリカ、およびカリブ海における風土病である。100 以上の熱帯国はデングウイルス感染が多く発生し、出血性デング熱はこれらの国のうち 60 カ国で報告されている (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology. 10: 100 - 103; Monath, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci.; 91: 2395 - 2400)。よく記載される因子のいくつかはデング熱に関連しているように思われる: 人口増加; 特に貧困を伴う、無計画で無制御の都市化; 飛行機旅行の増加; 蚊の効果的な制御手段の欠如ならびに衛生社会基盤および公衆衛生の悪化 (Gubler, 2002, TRENDS in Microbiology. 10: 100 - 103)。旅行者および国外居住者はデング熱について警告されることが多くなっている (Shircliffe ら., 1998, J. Roy. Coll. Phys. Lond.; 32: 235 - 237)。デング熱が風土病である熱帯に配置された米軍の間で、デング熱は熱性疾患の主要因の一つである (DeFraités ら., 1994, MMWR 1994; 43: 845 - 848)。

【0006】

ウイルスは、ヒトと、ヒトを好んで日中刺咬する屋内に生息する蚊のネッタイシマカ (Aedes aegypti) との間を循環して維持される。ヒトへの感染は、感染した

10

20

30

40

50

ネッタイシマカが血液を摂取している間に、ウイルスが注入されることによって起こる。唾液中のウイルスは主に血管外組織に沈着している。接種後に感染した細胞の第1分類は樹状細胞であり、その後リンパ節に移動する(Wuら., 2000, Nature Med.; 7: 816 - 820)。皮膚およびリンパ節での最初の複製の後、急性の発熱期間中に、一般的に3から5日間、ウイルスは血中に現れる。

【0007】

単球およびマクロファージは、樹状細胞とともに、デングウイルスの最初の標的である。ホモタイプの再感染に対する防御は完全であり、おそらく生涯維持されるが、多種のデング熱型での交差防御は数週間から数ヶ月しか続かない(Sabin, 1952, Am. J. Trop. Med. Hyg.; 1: 30 - 50)。したがって、患者は異なる血清型に感染する可能性がある。デング熱による二度目の感染は、理論上、重篤なデング熱疾患を発症する危険要因である。しかしながら、出血性デング熱は多因性である：これらの因子は関係するウイルス株や患者の年齢、免疫状態、遺伝的素因を含む。2つの因子が出血性デング熱の発症に大きな影響を与える：高ウイルス血症を伴う急速なウイルス複製(ウイルス血症レベルに關係する疾病の重症度; Vaughnら., 2000, J. Inf. Dis.; 181: 2 - 9)および炎症メディエータの高レベル放出を伴う多大な炎症反応(RothmanおよびEnnis, 1999, Virology; 257: 1 - 6)。デング熱に対する具体的な治療はない。デング熱の治療は、ベッドでの拘束、解熱剤と鎮痛剤による熱と痛みの制御、および適切な水分摂取といった対症的なものである。出血性デング熱の治療には水分の喪失に対する均衡、凝固因子の交換およびヘパリン注入が必要である。

【0008】

予防対策としては、現在のところベクターを制御することおよび高価で実施が困難である個人的防御策を講じることに基づいている。デング熱に対するワクチンは現時点で承認されていない。4種のデング血清型が世界中で流行することを考慮し、そして、それらが出血性デング熱を発症するものであると報告されているのであるから、ワクチン接種によりデングウイルスの4種の血清型を防御することが理想とされる。

【0009】

解剖学的に別の部位にデングウイルスを投与することはすでに文献に述べられている。

【0010】

Halsteadら(1973, Am. J. Trop. Med. Hyg., 22: 375 - 381)は、野生型デングウイルスを4種の異なる血清型に対して2または4箇所の解剖学的に別の部位に投与することにより、次の感染に対する防御を誘導することについて示している。しかしながら、著者は、この種の分割したワクチン接種については、1箇所にワクチン接種することに比べて何の優位性も見出せない。

【0011】

4価のワクチンという形態で投与された場合、デングウイルスの弱毒化ウイルス形態は、ヒトの体内で干渉をもたらす。この現象は、特に下記の出版物に記載されている: Gubler D. J. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11(3): 480 - 96; Rothman A. L.ら、Vaccine 2001; 19: 4694 - 9。

【0012】

Zhou HおよびDeem MW. (Vaccine. 2006 Mar 24; 24(14): 2451 - 9)は、CD8エピトープの使用に唯一基づく数学的モデルを開発し、4種のデング血清型のCD8エピトープ間での干渉をシミュレートすることを目的とした。この理論モデルによると、干渉を避けるための最良の方法は、非優位CD8エピトープを用いた一次免疫を行い、続いて4種それぞれの血清型の同じCD8エピトープを解剖学的に別の部位に投与する追加免疫をすることである。

【0013】

したがって、各種血清型間での干渉を減らし、4種のデング血清型に対する中和抗体を

10

20

30

40

50

誘導する方法が必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明者らは、第一段階投与、次いで、4種血清型の第一段階投与後30日から12ヶ月までに遂行される第二段階投与において、4種血清型が対となって解剖学的に別の部位に投与されて、4種血清型を中和化する抗体を含む相同的な免疫応答を生じさせることが可能であることを明らかにした。

【0015】

本発明者らは、特に、DEN-1, 2の二価免疫とDEN-3, 4の二価免疫とを併用して解剖学的に別の部位の2箇所投与し、次いで同じ条件下で同じワクチン用量を追加免疫することによって、一匹の動物につき1種の血清型を除いてワクチン接種されたすべてのサルにおいて、4種の血清型に対する高い応答が誘導されることを示した。反対に、1箇所にされた4価のワクチン接種は、4種のうち2種の血清型に対してしか十分な応答の誘導を可能にしなかった。

【0016】

したがって、本発明の方法による免疫応答は量的にも質的にも優れている(すべての血清型を網羅している)。

【課題を解決するための手段】

【0017】

したがって本発明の第一の対象によれば、本発明は患者における4種の Dengue 血清型に対する相補的な防御を誘導するための方法であって、

(a) (i) ワクチン第一血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第二血清型 Dengue ウイルス用量、ならびに (ii) ワクチン第三血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第四血清型 Dengue ウイルス用量の第一段階投与、および

(b) 用量 (i) および (ii) の第二段階投与を含む方法であり、

用量 (i) および (ii) が解剖学的に別の部位に同時に投与され、

第二段階投与 (b) が第一段階投与 (a) 後少なくとも30日以上、最長で12ヶ月以内に遂行される、方法に関する。

【0018】

本発明に係る方法の別の態様によれば、ワクチン Dengue ウイルス (i) は単一の二価のワクチン用量の形態で投与される。

【0019】

本発明に係る方法の別の態様によれば、ワクチン Dengue ウイルス (ii) は単一の二価のワクチン用量の形態で投与される。

【0020】

本発明に係るワクチン接種方法の一つの具体的な実施態様によれば、該ワクチン Dengue ウイルス血清型1はVDV1株およびChimeriVaxTM DEN-1からなる群より選択される。

【0021】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、該ワクチン Dengue ウイルス血清型2はVDV2株およびChimeriVaxTM DEN-2からなる群より選択される。

【0022】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、該ワクチン Dengue ウイルス血清型1はVDV1株であり、該ワクチン Dengue ウイルス血清型2はVDV2株である。

【0023】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、該ワクチン Dengue ウイルス血清型1はChimeriVaxTM DEN-1であり、該ワクチン Dengue ウイルス血清型2はChimeriVaxTM DEN-2である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、該ワクチン Dengue ウイルス血清型 3 は ChimeriVaxTM DEN - 3 である。

【 0 0 2 5 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、該ワクチン Dengue ウイルス血清型 4 は ChimeriVaxTM DEN - 4 である。

【 0 0 2 6 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、第 1 および第 2 血清型は、それぞれ CYD DEN 1 および CYD DEN 2 であり、ならびに第 3 および第 4 血清型は、それぞれ CYD DEN 3 および CYD DEN 4 である。

10

【 0 0 2 7 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、第 1 および第 2 血清型は、それぞれ CYD DEN 1 および CYD DEN 3 であり、ならびに第 3 および第 4 血清型は、それぞれ CYD DEN 2 および CYD DEN 4 である。

【 0 0 2 8 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、ワクチン Dengue ウイルス血清型 1、2、3 および 4 の投与量は 10^3 から 10^6 CCID₅₀ の範囲内である。

【 0 0 2 9 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、第二段階投与に用いるワクチンウイルスは第一段階投与に用いたものと同じである。

20

【 0 0 3 0 】

本発明に係る方法の別の具体的な実施態様によれば、第二段階投与は第一段階投与の後、30 日から 60 日以内に遂行される。

【 0 0 3 1 】

本発明の対象は、Dengue ウイルスに対するワクチン接種のためのキットであって、少なくとも Dengue ウイルス血清型 1、2、3 および 4 を、

(a) 4 つの別の容器に入った一価組成物の形態で、または

(b) 2 つの別の容器に入った 2 つの二価組成物の形態で、

収納したケースを含む。

30

【 0 0 3 2 】

一つの実施態様によれば、本発明に係るキットは、少なくとも、

(a) ChimeriVaxTM DEN - 1 および ChimeriVaxTM DEN - 2 を含む二価ワクチンが入った第一容器、および

(b) ChimeriVaxTM DEN - 3 および ChimeriVaxTM DEN - 4 を含む二価ワクチンが入った第二容器を含む。

【 0 0 3 3 】

別の実施態様によれば、本発明に係るキットは、少なくとも、

(a) ChimeriVaxTM DEN - 1 および ChimeriVaxTM DEN - 3 を含む二価ワクチンが入った第一容器、および

(b) ChimeriVaxTM DEN - 2 および ChimeriVaxTM DEN - 4 を含む二価ワクチンが入った第二容器を含む。

40

【 0 0 3 4 】

本発明の対象は、Dengue ウイルスに対するワクチン接種のためのキットであり、少なくとも ワクチン Dengue ウイルス第一および第二血清型を

(a) 2 つの別の容器に入った 2 つの一価組成物の形態で、または

(b) 一つの容器に入った二価組成物の形態で、

収納したケースを含むキットである。

【 0 0 3 5 】

一つの態様によれば、キットは少なくとも以下を含む：

(a) ChimeriVaxTM DEN - 1 および ChimeriVaxTM DEN

50

- 3を含む二価ワクチンが入った一つの容器、または
(b) ChimeriVaxTM DEN-2およびChimeriVaxTM DEN
- 4を含む二価ワクチンが入った一つの容器、または
(c) ChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN
- 2を含む二価ワクチンが入った一つの容器、または
(d) ChimeriVaxTM DEN-3およびChimeriVaxTM DEN
- 4を含む二価ワクチンが入った一つの容器。

【0036】

本発明は、免疫効果がある量のワクチン Dengue ウイルス第一および第二血清型および医薬上許容される賦形剤を含む二価組成物または二価ワクチンを提供する。

10

【0037】

具体的な実施態様によれば、二価組成物またはワクチンは以下からなる群より選択されるワクチンウイルスを含有する：ChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN-3；またはChimeriVaxTM DEN-2およびChimeriVaxTM DEN-4；またはChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN-2；またはChimeriVaxTM DEN-3およびChimeriVaxTM DEN-4。

【0038】

本発明について、以下に続く明細書にさらに詳しく記載する。

【0039】

20

定義

本発明において、2箇所の解剖学的部位が異なるリンパ節へ流入する場合、それは「別」を意味する。たとえば、右腕と左腕は別の部位であると考えられる。以下に限定されないが、別の部位であるとして列挙することができる：右腕/右大腿部；左腕/左大腿部、左腕/右大腿部。

【0040】

本発明において、「同時投与」という用語は、同日に実施される投与を意味する（すなわち、最長24時間）。同時投与は有利には最長1時間おきに、通常1-5分おきに実施される。

【0041】

30

本発明において、用量(i)は、2つの一価用量の形態か、または単一の二価用量の形態で、第一解剖学的部位に投与される。一方、用量(ii)は、2つの一価用量の形態か、または単一の二価用量の形態で、上記定義のとおり第一解剖学的部位とは別の第二解剖学的部位に、同時に投与される。

【0042】

「 Dengue ウイルス」または「DEN」は、陽性で、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する一本鎖RNAウイルスである。ゲノムRNAは5'末端にI型キャップを含み、3'末端にポリ-Aテールを欠く。ゲノム構成は以下の要素からなる：5'非コード領域(NCR)、構造タンパク質(カプシド(C)、前膜/膜(prM/M)、エンベロープ(E))および非構造タンパク質(NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5)、および3'NCR。ウイルスゲノムRNAはカプシドタンパク質と結合してヌクレオカプシドを形成する。他のフラビウイルスに関して、DENウイルスゲノムは、単一のポリタンパク質に翻訳される連続したコード領域をコードしている。

40

【0043】

本発明において、「ワクチン Dengue ウイルス」という用語は、特異的に相同的な免疫応答を誘導し得る Dengue ウイルスのウイルス形態を意味し、好ましくは Dengue ウイルス感染に対してヒトにおける予防接種として使用され得る Dengue ウイルスのウイルス形態を意味する。したがって、「ワクチン Dengue ウイルス」という用語は、不活性化ウイルス、弱毒化ウイルスまたは Dengue ウイルスエンベロープタンパク質など組み換えタンパクを意味する。

50

【 0 0 4 4 】

ワクチンウイルスが許容細胞上でもはや複製できなければ、「不活性化」されたものとみなす。

【 0 0 4 5 】

ワクチンウイルスは、H u h - 7、ベロ (V E R O) および / または C 6 / 3 6 肝細胞上で 3 7 または 3 9 で成長させた後、力価計測方法を用いて計測したとき、該ワクチンウイルスが、同じ培養条件下で野生型親株を用いて得られる最大力価より少なくとも 1 0 倍小さい最大力価となった場合、「弱毒化」されたものと考えられる。したがって、本発明では、上記に示された 3 つの細胞のうち少なくとも 1 つの細胞上で成長が抑制されたことを示すワクチンウイルスは「弱毒化」されたものとみなす。

10

【 0 0 4 6 】

ヒトに使用され得るワクチンウイルスは正の効果対リスク比を有し、該比率は一般的に製造承認を得るための規制上の要件を満たすことができる。本発明に用いられるワクチン Dengue ウイルスは好ましくはヒトに病気を誘発しないような弱毒化ウイルスである。ワクチンウイルスは、有利には、接種したヒトの大半においてせいぜい中程度 (すなわち、中から弱、またはほぼゼロ) の副作用しか引き起こさないと同時に、抗体反応の中和化を誘導する能力を保持している。

【 0 0 4 7 】

本発明に使用され得るワクチン Dengue ウイルスの限定されない例として、たとえば、弱毒化株 V D V - 1 または V D V - 2、W O 0 2 / 6 6 6 2 1、W O 0 0 5 7 9 0 4、W O 0 0 5 7 9 0 8、W O 0 0 5 7 9 0 9; W O 0 0 5 7 9 1 0、W O 0 2 / 0 9 5 0 0 7 5 および W O 0 2 / 1 0 2 8 2 8 の出願に記載された株、またはキメラなど不活性化ワクチンウイルス、弱毒化ワクチンウイルスを言及してもよい。キメラウイルスは上記に定義された弱毒化ウイルスの特徴を有しているという特殊性がある。Dengue ウイルスエンベロプタンパク質を発現し、エンベロプタンパク質が由来する血清型を中和化する抗体を有する免疫応答を誘導するキメラウイルスを本発明に使用することができる。限定されない例として、たとえば特許出願 W O 9 8 / 3 7 9 1 1 に記載される d e n g u C h i m e r i V a x ^{T M} 生成物、および、たとえば特許出願 W O 9 6 4 0 9 3 3 および W O 0 1 6 0 8 4 7 に記載される Dengue / Dengue キメラを言及してもよい。ワクチン Dengue ウイルス血清型 1 は、たとえば、V D V 1 ワクチン株または C h i m e r i V a x ^{T M} D E N - 1 であり、特に、Y F 1 7 D / D E N - 1 ウイルス、あるいは 1 6 0 0 7 / P D K 1 3 D E N - 1 株である。ワクチン Dengue ウイルス血清型 2 は、たとえば、V D V 2 ワクチン株または C h i m e r i V a x ^{T M} D E N - 2 であり、特に、Y F 1 7 D / D E N - 2 ウイルス、あるいは 1 6 6 8 1 / P D K 5 3 D E N - 2 株である。ワクチン Dengue ウイルス血清型 3 は、たとえば、V D V 2 ワクチン株または C h i m e r i V a x ^{T M} D E N - 3 であり、特に、Y F 1 7 D / D E N - 3 である。ワクチン Dengue ウイルス血清型 4 は、たとえば、C h i m e r i V a x ^{T M} D E N - 4 であり、特に、Y F 1 7 D / D E N - 4 ウイルスである。この株はマヒドール大学の特許出願 E P 1 1 5 9 9 6 8 号に記載され、そして Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) に番号 I - 2 4 8 3 のもと寄託された。

20

30

40

【 0 0 4 8 】

「V D V」または「ベロ Dengue ワクチン」は、ベロ細胞に適応し、霊長類および特にヒトにおいて抗体の中和化を誘導することを含めて、特異的体液性応答を誘導することができる弱毒化 Dengue ウイルス株を意味する。

【 0 0 4 9 】

「V D V - 1」は、P D K 細胞上で 1 1 回継代された野生型株 D E N - 1 1 6 0 0 7 から得られる株 (D E N - 1 1 6 0 0 7 / P D K 1 1) であり、その後ベロ細胞で 3 2 にて増幅され、その RNA を精製して、ベロ細胞にトランスフェクトした。V D V - 1 株は、ワクチン株 D E N - 1 1 6 0 0 7 / P D K 1 3 (P D K - プライマリードッグの腎臓細胞の 1 3 継代) と比較して、1 4 個の付加の変異を有する。「L A V 1」とも呼ば

50

れるDEN-1 16007/PDK13株は、マヒドール大学の特許出願EP1159968号に記載されており、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)に番号I-2480のもと寄託された。VDV-1株の完全な配列は配列番号1に記載されている。該株は該配列から容易に再現することができる。VDV-1株の調製方法および特徴づけは、サノフィ・パスツールおよびthe Center for Disease Control and Preventionの国際特許出願PCT/IB2006/001313号に記載されている。

【0050】

「VDV-2」は、PDK細胞上で50回継代された野生型株DEN-2 16681から得られる株(DEN-2 16681/PDK50)であり、ブランク精製され、そのRNAが抽出され、精製された後、ベロ細胞にトランスフェクトされた。その後VDV-2株は、ブランク精製およびベロ細胞上の増幅によって得られた。VDV-2株はワクチン株DEN-2 16681/PDK53(PDK細胞上の53回継代)と比較して10個の付加の変異があり、そのうち4つの変異はサイレントである。「LAV2」とも呼ばれるDEN-2 16681/PDK53株は、マヒドール大学の特許出願EP1159968に記載されており、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)に番号I-2481のもと寄託された。VDV-2株の完全な配列は配列番号2に示される。VDV-2株は該配列から容易に再現され得る。VDV-2の調製方法および特徴づけはサノフィ・パスツールおよびCenter for Disease Control and Preventionの国際出願PCT/IB 2006/001513に記載されている。

【0051】

VDV1および2株は、ベロ細胞上の増幅によって調製される。生成されたウイルスを採取し濾過によって細胞の残骸を精製した。DNAは酵素処理によって消化される。不純物は限外濾過によって除去される。濃縮方法を用いて感染力価を向上させることができる。安定剤の追加後、使用前まで凍結乾燥または凍結状態で株を保存し、その後即座に復元させる。

【0052】

「ChimeriVaxTM デング」または「CYD」という用語は、前膜(membrane)およびエンベロープタンパク質をコードしている配列がDENウイルスのそれと置換している黄熱(YF)ウイルスの骨格を含むキメラ黄熱(YF)ウイルスを意味する。したがって、「CYD-1またはCYD DEN1」という用語は、デング血清型1株(DEN-1)のprMおよびEの配列を含むキメラYFウイルスを表すのに用いられる。「CYD-2またはCYD DEN2」という用語は、DEN-2株のprMおよびEの配列を含むキメラYFウイルスを表すのに用いられる。「CYD-3またはCYD DEN3」という用語は、DEN-3株のprMおよびEの配列を含むキメラYFウイルスを表すのに用いられる。「CYD-4またはCYD DEN4」という用語は、DEN-4株のprMおよびEの配列を含むキメラYFウイルスを表すのに用いられる。これらChimeriVaxTM デングの調製は、国際特許出願WO98/37911およびWO03/101397に詳述されており、調製方法の明確な記載として挙げることができる。例に記載されたキメラは、DEN1 PUO359(TYP1140), DEN2 PUO218, DEN3 PaH881/88およびDEN4 1288(TVP980)株に由来のprMおよびE配列を用いて生成された。本発明において、デングウイルスのいずれの株をキメラ構築のために用いてもよい。

【0053】

好ましくは、キメラYFウイルスは、弱毒化黄熱株YF17D(Theiler M, およびSmith HH(1937)J Exp. Med 65, p767-786.)の骨格を含む(YF17D/DEN-1, YF17D/DEN-2, YF17D/DEN-3, YF17D/DEN-4ウイルス)。使用することができるYF17D株の例は、

YF17D204 (YF-Vax (登録商標), Sanofi-Pasteur, Swiftwater, PA, USA; Stamaril (登録商標), Sanofi-Pasteur, Marcy l'Etoile, France; ARI LVAXTM, Chiron, Speke, Liverpool, UK; FLAVIMUN (登録商標), Berna Biotech, Bern, Switzerland); YF17D-204 France (X15067, X15062); YF17D-204, 234 US (Riceら, 1985, Science, 229:726-733), または他の関連株 YF17DD (Genbank accession number U17066), YF17D-213 (Genbank accession number U17067) および Gallerらによって記載された YF17DD 株 (1998, Vaccines 16 (9/10): 1024-1028) を含む。ヒトに用いるために弱毒化された他の黄熱ウイルス株を、キメラ構築のために、本発明において用いることができる。

10

【0054】

したがって、本発明の対象は、また、免疫効果のある量のワクチン Dengue ウイルス第一血清型およびワクチン Dengue ウイルス第二血清型、ならびに医薬上許容される賦形剤を含む二価組成物またはワクチンである。

【0055】

本発明にしたがったワクチンに用いることができるワクチンウイルスの記載に関して、本発明に係るワクチン接種方法に言及することができる。

【0056】

20

具体的な実施態様にしたがって、本発明に係る二価組成物またはワクチンは、CYD DEN-1 および CYD DEN-2、または CYD DEN-3 および CYD DEN-4、または CYD DEN-1 および CYD DEN-3 または CYD DEN-2 および CYD DEN-4 を含み；有利には、ワクチンウイルスは 10^5 CCID₅₀ 量でワクチン中に存在する。

【0057】

各 ChimeriVaxTM 一価ワクチン Dengue ウイルス (血清型 1、2、3 および 4) はベロ細胞上で各血清型の増幅によって調製される。さらに具体的には、4つのウイルスは無血清培地上の接着ベロ細胞で別々に生成される。濾過によって細胞残屑を除去し精製したウイルス採取物は、その後宿主細胞 DNA を除去するために、限外濾過およびクロマトグラフィによって濃縮、精製される。ワクチン株は、安定剤の添加後、使用する前まで凍結または凍結乾燥された状態で保存され、その後即座に復元される。同じ方法が4つのキメラに適用される。

30

【0058】

医薬上許容される賦形剤に加えて、単一の Dengue ウイルス血清型を含有する場合、用量、組成物またはワクチンは一価である。2つの異なる Dengue ウイルス血清型を含有する場合、用量、組成物またはワクチンは二価である。3つの異なる Dengue ウイルス血清型を含有する場合、用量、組成物またはワクチンは三価である。4つの異なる Dengue ウイルス血清型を含有する場合、用量、組成物またはワクチンは四価である。多価組成物は一価組成物を単純に混合することで得られる。

40

【0059】

「患者」という語は、Dengue に感染することがある個人 (子どもまたは大人) を意味し、特に、感染の恐れのある個人、たとえば Dengue が存在する地域に旅行した個人またはそれらの地域に在住する個人を意味する。したがってこの用語は、Dengue ウイルスに対してナイーブである個人またはナイーブでない個人を含有する。

【0060】

解剖学的に別の部位にする逐次ワクチン接種

本発明者らは特に、解剖学的に別の部位に2回にわたる二価同時投与の形態で、4種の血清型を投与し、次いで、第一段階投与の後30日から12ヶ月までの間に追加免疫することにより、4種の血清型に対して効果的な相同防御を獲得できることを示している。し

50

たがって、本発明に係る方法は、デングに対するワクチン接種の方略に関して最も価値がある。

【 0 0 6 1 】

本発明によれば、4種のデング血清型は、別の部位に同時に対で投与されるならば（すなわち、各用量（i）および（ii）、2回の一価用量または1回の二価用量）、いずれの順序でも投与され得る。

【 0 0 6 2 】

したがって、本発明に係る方法は、以下に記載の態様で実施され得る：

- （i）血清型1および2；（ii）血清型3および4；または
- （i）血清型1および3；（ii）血清型2および4；または
- （i）血清型1および4；（ii）血清型2および3；または
- （i）血清型2および3；（ii）血清型1および4；または
- （i）血清型2および4；（ii）血清型1および3；または
- （i）血清型3および4；（ii）血清型1および2。

10

【 0 0 6 3 】

好ましくは、本発明に係る方法は以下のワクチンデングウイルスの投与を含む：（i）血清型1および2；（ii）血清型3および4または（i）血清型1および3；（ii）血清型2および4。用量（i）および（ii）は有利には二価の用量の形態である。

【 0 0 6 4 】

したがって、具体的な態様によれば、本発明は以下の方法に及ぶ：

20

- （i）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 2；（ii）CYD DEN - 3およびCYD DEN - 4
- （i）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 3；（ii）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 4
- （i）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 4；（ii）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 3
- （i）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 3；（ii）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 4
- （i）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 4；（ii）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 3
- （i）CYD DEN - 3およびCYD DEN - 4；（ii）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 2
- （i）VDV - 1およびCYD DEN - 2；（ii）CYD DEN - 3およびCYD DEN - 4
- （i）VDV - 1およびCYD DEN - 3；（ii）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 4
- （i）VDV - 1およびCYD DEN - 4；（ii）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 3
- （i）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 3；（ii）VDV - 1およびCYD DEN - 4
- （i）CYD DEN - 2およびCYD DEN - 4；（ii）VDV - 1およびCYD DEN - 3
- （i）CYD DEN - 3およびCYD DEN - 4；（ii）VDV - 1およびCYD DEN - 2
- （i）CYD DEN - 1およびVDV - 2；（ii）CYD DEN - 3およびCYD DEN - 4
- （i）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 3；（ii）VDV - 2およびCYD DEN - 4
- （i）CYD DEN - 1およびCYD DEN - 4；（ii）VDV - 2およびCYD DEN - 3

30

40

50

(i) V D V - 2 および C Y D D E N - 3 ; (i i) C Y D D E N - 1 および C Y D D E N - 4
 (i) V D V - 2 および C Y D D E N - 4 ; (i i) C Y D D E N - 1 および C Y D D E N - 3
 (i) C Y D D E N - 3 および C Y D D E N - 4 ; (i i) C Y D D E N - 1 およ
 び V D V - 2
 (i) V D V - 1 および V D V - 2 ; (i i) C Y D D E N - 3 および C Y D D E N - 4
 (i) V D V - 1 および C Y D D E N - 3 ; (i i) V D V - 2 および C Y D D E N - 4
 (i) V D V - 1 および C Y D D E N - 4 ; (i i) V D V - 2 および C Y D D E N - 3
 (i) V D V - 2 および C Y D D E N - 3 ; (i i) V D V - 1 および C Y D D E N - 4
 (i) V D V - 2 および C Y D D E N - 4 ; (i i) V D V - 1 および C Y D D E N - 3、および
 (i) C Y D D E N - 3 および C Y D D E N - 4 ; (i i) V D V - 1 および V D V - 2。

【 0 0 6 5 】

好ましくは、本発明に係るワクチン接種方法は以下のワクチンデングウイルスの投与を含む：(i) C Y D D E N - 1 および C Y D D E N - 2 ; (i i) C Y D D E N - 3 および C Y D D E N - 4 ; または (i) C Y D D E N - 1 および C Y D D E N - 3 ; (i i) C Y D D E N - 2 および C Y D D E N - 4。用量 (i) および (i i) は有利には二価用量の形態である。

【 0 0 6 6 】

本発明に係るワクチン接種方法は、第一段階投与 (i および i i) の後、30日から12ヶ月までに、有利には30日から3ヶ月までに、好ましくは30日、45日または60日経過後に実施される第二段階投与を含み、該第二段階投与は有利には第一段階で用いたものと同じ組成物の投与を含み、有利には同じ条件下で投与される。

【 0 0 6 7 】

本発明において、「ワクチンウイルス用量」という用語は、「免疫効果が得られる量の」ワクチンデングウイルス、すなわち、相同的中和抗体反応を誘導するのに十分な量のデングウイルスを含む組成物の意であり、これは、たとえば、以下の実施例1に記載されているように血清中和化試験によって実証することができる。決定された中和抗体力価が1:10 (ユニット: 1 / 希釈) と等しいかそれ以上であるとき、血清は中和抗体の存在について血清は陽性であると考えられる。

【 0 0 6 8 】

ワクチン株の量は、ウイルスプラーク形成単位 (P F U) または50%組織培養感染用量または50%細胞培養感染用量 (C C I D ₅₀) という用語で一般的に表される。たとえば、本発明に係る組成物は、一価または二価組成物としてワクチンデングウイルス血清型1、2、3または4を10から10⁶ C C I D ₅₀、特に10³から10⁵ C C I D ₅₀ 含むことができる。したがって、本発明の組成物または使用において、ワクチンデングウイルス血清型1、2、3および4用量は、10、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵または10⁶ C C I D ₅₀ など、10から10⁶ C C I D ₅₀ の範囲内が好ましく、特に10³から10⁵ C C I D ₅₀ が好ましい。ワクチンウイルスは、使用されるワクチンウイルスの性質および得られる免疫応答の強度に応じて、同一または別の用量で使用され得る。

【 0 0 6 9 】

本発明に係る方法の具体的な実施態様によれば、ワクチンウイルスの一価または二価用量はC Y D D E N - 1、C Y D D E N - 2、C Y D D E N - 3およびC Y D D E

10

20

30

40

50

N - 4 についてそれぞれ 10^5 C C I D₅₀ 含む。

【0070】

中和抗体応答は、有利には、持続的な応答である、すなわち、第二段階投与 (i) および (ii) の後少なくとも 6 ヶ月は、それが血清中で検出され得る。

【0071】

ワクチン第一血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第二血清型 Dengue ウイルス用量 (すなわち用量 (i)) は 2 つの一価組成物の形態または、有利には単一の二価組成物または用量の形態で同時に投与される。

【0072】

同様に、ワクチン第三血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第四血清型 Dengue ウイルス用量 (すなわち用量 (ii)) は 2 つの一価組成物の形態または、有利には単一の二価ワクチン組成物の形態で同時に投与される。

10

【0073】

ワクチンウイルスは当該分野における通常の知識を有する者に知られた方法によって調製され得るワクチン組成物またはワクチンウイルス用量の形態で投与される。一般的に凍結乾燥されたウイルスは、水やリン酸塩緩衝生理食塩水、湿潤剤または安定剤など、医薬上許容される賦形剤と通常混合される。「医薬上許容される賦形剤」という用語は、ヒトまたは動物において、たとえばアレルギー反応の副作用を生じない溶剤、分散媒質、充填剤などのいずれかを意味する。賦形剤は選択された医薬形態により、そして投与方法および経路により選択される。適当な賦形剤および医薬処方に関する必要性もまた、当該分野で参考資料に相当する “Remington: The Science & Practice of Pharmacy” に記載される。

20

【0074】

好ましくは、ワクチン組成物は注入可能な形態で調製され、溶液、懸濁液またはエマルジョンに対応することができる。組成物は、特に、pH をおよそ 6 ないし 9 (周囲温度で pH メーターを用いて測定される) に維持するために緩衝水溶液を含むことができる。

【0075】

組成物にアジュバントを添加する必要はないけれども、組成物はそのような化合物、すなわち、同時に投与されたワクチン株によって誘導される細胞性または体液性免疫応答を増大、刺激または強化させる物質を含むことができる。当該分野の当業者は、本発明に適するアジュバントをワクチンの分野において通常用いられるアジュバントから選択することができる。

30

【0076】

本発明に係るワクチン組成物は、たとえば非経口 (特に、皮内、皮下または筋肉内) など、有利には皮下に、ワクチン接種に通常用いられるいずれかの経路によって投与され得る。好ましくは、ワクチン組成物は、左および右三角筋部の皮下に投与される注射用組成物である。

【0077】

投与される組成物の量は投与経路に依存する。皮下注射では、その量は一般的に 0.1 から 1.0 ml の間、好ましくはおよそ 0.5 ml である。

40

【0078】

血清型 1 から 4 のすべての最適投与期間は、Dengue ウイルスへの暴露のおよそ 1 から 3 ヶ月前である。ワクチンは、大人および子どもにおいて、Dengue ウイルスの感染予防措置として投与され得る。したがって、対象集団は Dengue ウイルスに対してナイーブな (すなわち以前にワクチン接種していない) 人または Dengue ウイルスに対してナイーブでない人を含む。

【0079】

ワクチン Dengue ウイルス血清型 1 から 4 の追加免疫投与は、また、本発明に係る第二段階投与後、6 ヶ月から 10 年の間に、たとえば、6 ヶ月、1 年、3 年、5 年または 10 年の間に行なわれる。追加免疫投与は、有利には、同じワクチン組成物 (すなわち、同じワ

50

クチンウイルス)を用いて、そして好ましくは第一および二段階投与の際と同じ投与条件(解剖学的部位および投与経路)で実施される。

【0080】

干渉現象は他と比較して一つまたはそれ以上の血清型の優性によって説明することができ、したがって、ワクチン候補(たとえば、VDVまたはChimeriVax)を製造するために使われる技術とは独立したものである。したがって、本発明に係る方法は、一般的にワクチン Dengue ウイルスに適用することができる。

【0081】

それゆえ、本発明の対象は、4種の Dengue 血清型に対する防御を誘導するワクチンの調製のためにワクチン Dengue ウイルス用量を使用することであって、以下を含む：

(a)(i) ワクチン第一血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第二血清型 Dengue ウイルス用量、ならびに(ii) ワクチン第三血清型 Dengue ウイルス用量およびワクチン第四血清型 Dengue ウイルス用量の第一段階投与、および

(b) 用量(i)および(ii)の第二段階投与を含む方法であり、

用量(i)および(ii)が解剖学的に別の部位に同時に投与され、

第二段階投与が第一段階投与後少なくとも30日以上、最長で12ヶ月以内に遂行される。

【0082】

本発明に用いることのできるワクチン Dengue ウイルスの記載に関して、本発明に係るワクチン接種方法に言及することができる。

【0083】

本発明の対象は、また、4種の Dengue ウイルス血清型に対するワクチン接種のためのキットである。本発明に係るキットは、提案したワクチン接種方法に関する上記に定義された用量を含む。したがって、本発明に係るキットは、ワクチン用量、および有利にはワクチン投与に有用な情報を含む使用説明書の入った各種容器を含むケースを含む。

【0084】

一つの実施態様によると、本発明に係るキットは、少なくとも Dengue ウイルス血清型1、2、3および4を、

(a) 4つの別々の容器に入った一価組成物の形態で、または

(b) 2つの別々の容器に入った2つの二価組成物の形態で、
収納するケースを含む。

【0085】

他の実施態様によると、本発明に係るキットは、少なくともワクチン Dengue ウイルス第一および第二血清型を：

(a) 2つの別々の容器に入った2つの一価組成物の形態で、または

(b) 1つの容器に入った二価組成物の形態で
収納するケースを含む。

【0086】

本発明に係るキットに用いることのできるワクチン Dengue ウイルスの記載に関して、本発明に係るワクチン接種方法に関する上記に記載されたワクチンウイルスに言及することができる。

【0087】

したがって、具体的な実施態様によれば、本発明に係るキットは少なくとも：

(a) ChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN-2を含む二価ワクチンが入った第一容器、および

(b) ChimeriVaxTM DEN-3およびChimeriVaxTM DEN-4を含む二価ワクチンが入った第二容器を含む。

【0088】

他の実施態様によれば、本発明に係るキットは少なくとも：

- (a) ChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN-3を含む二価ワクチンが入った第一容器、および
- (b) ChimeriVaxTM DEN-2およびChimeriVaxTM DEN-4を含む二価ワクチンが入った第二容器を含む。

【0089】

他の実施態様によれば、本発明に係るキットは少なくとも：

- (a) ChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN-3を含む二価ワクチンが入った容器、または
- (b) ChimeriVaxTM DEN-2およびChimeriVaxTM DEN-4を含む二価ワクチンが入った容器、または
- (c) ChimeriVaxTM DEN-1およびChimeriVaxTM DEN-2を含む二価ワクチンが入った容器、または
- (d) ChimeriVaxTM DEN-3およびChimeriVaxTM DEN-4を含む二価ワクチンが入った容器を含む。

【0090】

本発明に係るキットは以上に記載したとおり容器について一つまたはいくつかの例を含んでもよい。

【0091】

使用されるワクチンが凍結乾燥された形態である場合、キットは、有利には、注入可能なワクチン用量を復元するための希釈剤を含む、少なくとも一つのさらなる容器を含む。通常水またはリン酸塩緩衝水溶液など、いずれの医薬上許容される希釈剤もこれを行うために用いることができる。

【0092】

本発明を以下の実施例を用いて説明する。

【実施例1】

【0093】

実施例1：2つの二価組成物を解剖学的に別の部位に同時に注射することによるサルのワクチン接種

ウイルス血症および免疫原性についてサルをモデルに試験した。特にウイルス血症は、ヒトの疾病の病原性および重症度に関連する一つの要因として認定され、したがって考慮すべき重要なパラメーターを構成する。一方で、免疫原性は与えられた防御の評価において主要なパラメーターである。

【0094】

1.1 材料および方法：

サルにおける実験は、動物実験に関する欧州指針にしたがって行われた。ワクチン接種はモータニア由来のカニクイザル (Macaca fascicularis) で実施された。サルはワクチン接種前6週間隔離された。

【0095】

サルの腕の皮下にワクチン組成物0.5mlを接種して、免疫を付与した。ケタミン (Imalgene, Merial) で浅麻酔させた後、鼠径部または伏在静脈から穿刺して血液を採取した。ワクチン接種後0日目と28日目に抗体応答反応を評価するために血液5mlを採取し、一方2日目から10日目の間、ウイルス血症を評価するために血液1mlを採取した。血液を氷上に集めて、血清が分離するまで氷上で保管した。実施するために、血液を4で20分間遠心分離し、回収した血清を試験まで-80で保管した。

【0096】

ウイルス血症の測定

ワクチン接種後のウイルス血症を定量リアルタイムRT-PCR (qRT-PCR) に

10

20

30

40

50

よりモニターした。DEN 1 および DEN 2 株の NS 5 遺伝子に位置するプライマーおよびプローブの 2 組のセットを VDV - 1 RNA および VDV - 2 RNA の定量にそれぞれ用いた。YF ウイルスの NS 5 遺伝子に位置する 2 つのプライマーおよび 1 つのプローブの 3 組目のセットを CYD RNA を定量するために用いた。最後に、YF NS 5 RNA 陽性サンプルにおける血清型を同定するために、E (DEN) / NS 1 (YF) 遺伝子の接合点に位置する各種 CYD 血清型に特異的なプライマーおよびプローブの 4 組のセットを使用した (表 1 参照)。RT - PCR アッセイの内部基準として含まれる一連の合成 RNA を産生するために、各 PCR によって標的とされた領域を含む 7 つのプラスミドを、T7 プロモーターの制御下でインビトロにおいて転写した。これらの合成 RNA を分光分析により測定し、得られた RNA 量を RNA コピー数に変換し、GEQ (ゲノム等量) として表した。

10

【0097】

Macherey Nagel “Nucleospin 96 ウイルスTM” RNA 抽出キットを用いて、使用説明書にしたがってサル血清 0.140 ml を抽出し、その後精製された RNA を、リボヌクレアーゼを含まない水 0.140 ml (0.090 ml、次いで 0.05 ml) で溶出させた。冷凍と解凍の繰り返しを避けるために、抽出後即座に、RNA 調合液 5 μ l で最初の定量をおこなった。残りは 70 で冷凍した。

【0098】

反応混合物は、“Qiagen QantitectTM プローブ” RT - PCR 定量キット (Qiagen) の成分に加えて、各プライマー 10 ピコモル、各プローブ 4 ピコモルおよび RNA 5 μ l を含んで、合計 25 μ l とした。試験される RNA の場合、精製された調合液 5 μ l を、予め希釈することなく反応混合物に直接入れた。リボヌクレアーゼを含まない水で合成 RNA を 1 / 10 に希釈し、5 μ l 中およそ 10 から 10⁶ GEQ を含む 7 つの希釈液を、検量線を書くために平行して定量した。

20

【0099】

Applied Biosystem ABI Prism 700TM 装置を用いて、以下のプログラムにて定量化反応を行なった：50 / 30 分、95 / 15 分、次いで 95 / 15 秒 - 60 / 60 秒を 40 サイクル。

【0100】

試験におけるウイルス性 RNA の定量限界は PCR 対象 (標準偏差：+ / - 0.3 log₁₀) によって 2.9 から 3.3 log₁₀ GEQ / ml (800 から 2000 GEQ / ml ; 4 から 10 GEQ / 反応) である。

30

【0101】

感染力価とウイルス性 RNA 定量化との相関関係は、ワクチン接種 (CYD または VDV) に使用される既知量のウイルスの感染粒子が添加された陰性サル血清試料 (DO) 0.140 ml を分析することにより、アッセイと平行して確立した。該対照血清を、5 μ l 中およそ 1 PFU と 100 PFU (それぞれ 2.3 および 4.3 log₁₀ PFU / ml) を含む 2 つの希釈率にて調製した。

【0102】

実施例で用いる試験において、GEQ と PFU との相関関係は以下のとおりである：YF または CYD に対して陽性の血清について GEQ / PFU 比 2.7 log₁₀ (すなわち、1 PFU = 500 GEQ)。VDV 1 または VDV 2 に対して陽性の血清について GEQ / PFU 比 2.5 log₁₀ (すなわち、1 PFU = 320 GEQ)。

40

【0103】

定量限界は、qRT - PCR YF および CYD に対して < 3.3 log₁₀ GEQ / ml (すなわち、< 4 PFU / ml) ならびに qRT - PCR VDV 1 および VDV 2 に対して < 2.9 log₁₀ GEQ / ml (すなわち、< 2.5 PFU / ml)。

【0104】

使用されるプライマーおよびプローブを表 1 に示す。表中、各アッセイにつき、センスおよびアンチセンスプライマーならびにプローブが順に挙げられている。

50

【 0 1 0 5 】

【表 1】

表 1			
配列			
Y F	YF-NS5	センス	5' GCACGGATGTAACAGACTGAAGA (23 塩基)
	YF-NS5	アンチ	5' CCAGGCCGAACCTGTCAT (18 塩基)
	YF-NS5		5' Fam- CGACTGTGTGGTCCGGCCCATC-Tamra (22 塩基)
CYD1 spe	CYD1-	センス	5' CAT TGC AGT TGG CCT GGT AA (20 b)
	CYD1-	アンチ	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	センス	5' GTG GGA GTC GTG ACG CTG TA (20 b)
	CYD2-	アンチ	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-	センス	5' AAA ACA CTT CCA TGT CAT TTT CAT G (25b)
	CYD3-	アンチ	5' GTT GAT GGC GCA TCC TTG ATC (21 b)
	CYD3-		5'Fam-TGCGATAGGAATTATCACACTCTATCTGGAGC-Tamra (33b)
CYD4 spe	CYD4-	センス	5' CTT AGT ATT GTG GAT TGG CAC GAA (24 b)
	CYD4-	アンチ	5' GCG CCA ACT GTG AAA CCT AGA (21 b)
	CYD4-		5'-Fam-AGAAACACTTCAATGGCAATGACGTGCAT-Tamra (29 b)
VDV1 spe	VDV1-NS5	センス	5' TCG CAA CAG CCT TAA CAG C (19 b)
	VDV1-NS5	アンチ	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	センス	5' AAT GAC AGA CAC GAC TCC (18 b)
	VDV2-NS5	アンチ	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)

10

20

中和抗体測定（血清中和反応試験）（S N 5 0）

【 0 1 0 6 】

慣用的に、デング抗体測定はP R N T 5 0（5 0 % P F U数減少中和試験）を用いて確立される。この試験は多くの時間と労力を費やし、多くの材料を使用することから、我々はC C I D₅₀試験により測定されたユニットの数値の5 0 %減少に基づいてS N 5 0試験を開発した。

【 0 1 0 7 】

30

9 6 ウェルプレートにおいて、補体除去された血清0 . 1 2 0 m lを各ウェルの希釈液（I S C O V E 4 % F C S）0 . 4 8 0 m lに加える。血清0 . 1 5 0 m lを希釈液0 . 4 5 0 m lに入れることで6 倍連続希釈液を調製する。2 5 C C I D₅₀/ウェルを得るために各ウェルに2 . 7 l o g₁₀ C C I D₅₀/m lでのウイルス希釈液4 5 0 μ lを加える。プレートは3 7 °Cにて1 時間インキュベートする。次いで各希釈液0 . 1 m lを、実験開始3 日前に4 % F C Sを含むI S C O V E 0 . 1 m l中8 0 0 0 細胞/ウェルの密度でベロ細胞が播種されている9 6 ウェルプレート中の6 ウェルに分配する。6 日間、3 7 °Cでインキュベートした後、5 % C O₂存在中、エタノール/アセトン（7 0 / 3 0）混合液を用いて4 °C、1 5 分間細胞を固定し、次いでP B Sで3 回洗浄して、抗フラビウイルスモノクローナル抗体（m A b 4 G 2）の1 / 2 0 0 0 希釈液0 . 0 5 m l存在下で3 7 °Cにて1 時間インキュベートする。その後、プレートを2 回洗浄し、アルカリ性ホスファターゼが接合された抗マウスI g Gの1 / 1 0 0 0 希釈液0 . 0 5 m lの存在下で3 7 °Cにて1 時間インキュベートする。着色された基質（B C I P / N B T）0 . 0 5 m lを加えることで溶菌ブランクを視覚化する。中和抗体力価を以下に示されるカルバーの公式（K a r b e r f o r m u l a）を用いて算出する：

40

式

$$\log_{10} S N 5 0 = d + f / N (X + N / 2)$$

式中、

dは1 0 0 %中和（すなわち6 つの陰性複製物、すなわち感染の徴候を示さない複製物）を生じさせる希釈率であり、

50

f は \log_{10} で示される希釈係数であり（たとえば、1 : 4 の希釈係数なら、 $f = 0.6$ ）、

N は複製物 / 希釈率の数であり（ $N = 6$ ）、

X は感染の徴候を示さないウェルの合計数、ただし希釈率 d を除く、

ウイルス検出限界は 10^{SN50} （すなわち $10^{\log_{10} SN50}$ ）である。

【0108】

中和に用いられたウイルス株は DEN 1 16007、DEN 2 16681、DEN 3 16562 または DEN 4 1036 株である。

【0109】

対照について、最初のウイルス希釈を再滴定した。

10

【0110】

SN50 試験で測定される中和力価と PRNT50 試験で通常測定される中和力価との相関関係は以下である：

式

$$\log_{10} PRNT50 = \log_{10} SN50 + 0.2$$

【0111】

平均力価（GMT）は一次数値として表される力価の相乗平均を算出することによって確立され、その力価が検知閾値以下である試料は、慣例によりこの閾値の半分の値が割り当てられる。

【0112】

20

1.2 逐次免疫付与の評価

年齢および体重の等しい 1 群 4 匹のサル、計 2 群にワクチン接種した（表 2 参照）。

【0113】

CYD DEN 1 から 4 までのワクチンに対応する各血清型を 10^5 CCID₅₀ の投与量で、23G1 針を用いて腕の皮下に接種した。

【0114】

各群の組成物とワクチン接種プロトコル

【表 2】

サル		
群	ワクチン接種	
	D0	D58
1	片腕に CYD-1,2 もう一方の腕に CYD-3,4	片腕に CYD-1,2 もう一方の腕に CYD-3,4
2	CYD-1,2,3,4	CYD-1,2,3,4

30

【0115】

1 回ワクチン接種後（D28）と 2 回ワクチン接種後（D86）に得られた免疫原性の結果を表 3 に示す。

40

【0116】

ウイルス血症の結果を表 4 に示す。

【0117】

【表 3】

表 3 : SN50 中和力価 (units 1/dil)

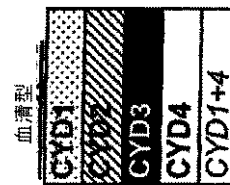
群	サル		D0+28				D58+28			
	ID	ワクチン接種	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
1	AP545	片腕に CYD 1, 2 もう一方の腕に CYD 3, 4	20	25	-	50	40	50	-	319
	A0949		20	-	-	20	319	20	13	100
	AP335		20	-	-	252	100	16	10	200
	AP817		20	16	32	40	319	25	32	402
	相乗平均		20	10	8	56	142	25	12	225
2	AP676	片腕に CYD 1234 もう一方の腕に CYD 1234	63	-	-	126	100	-	-	40
	AQ005		25	-	-	63	50	-	-	63
	AP961		50	-	-	158	80	-	80	400
	AQ163		63	-	-	40	100	-	16	252
	相乗平均		47	< 10	< 10	84	80	< 10	13	126

-: 力価 <10

【表 4】

表 4：ウイルス血症分析 (単位：log10 GEQ/ml)

群		サル	一次免疫								追加免疫							
			D2	D3	D4	D6	D7	D8	D9	D10	D58	D59	D62	D63	D64	D65	D66	
1	CYD1, 2 + CYD3, 4 2箇所注射	AP545	3.17	-	-	-	3.12	3.67	4.55	4.59	-	-	-	-	-	-	-	
		A0949	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箇所注射	AP676	-	-	-	-	-	-	3.65	-	-	-	-	-	-	-	-	
		AQ005	3.19	-	3.35	-	-	-	-	3.41	-	-	-	-	-	-	-	
		AP961	-	-	-	-	3.86	3.42	3.29	3.56	-	-	-	-	-	-	-	
		AQ163	3.18	3.16	-	3.30	3.60	2.95	3.00	-	-	-	-	-	-	-	-	



【 0 1 1 9 】

簡単に、結果を以下のようにまとめることができる：

本発明に係る投与方法により、四価のワクチン接種により得られる相同的中和抗体応答反応を、定性的かつ定量的に増加させることができる。

追加免疫後、CYD - 1, 2 二価ワクチン接種と同時に CYD - 3, 4 ワクチン接種を解剖学的に別の部位に行うことにより、一匹の動物における血清型 3 を除くすべてのサルにおいて 4 種の血清型に対する相同的な応答を誘導する。

さらに、単一部位に四価のワクチンを接種するより、同時に二価のワクチンを接種する

10

20

30

40

50

場合の方が血清型 1 および 4 に対する応答が高い傾向にある。

同時に二価投与した後であれ、四価投与した後であれ、ウイルス血症（表 4）は C Y D - 4 によって主に引き起こされる。したがって、血清型の分離は血清型 1、2 および 3 ウイルス血症の発生を促進させないと結論付けることができる。

したがって、本発明に係るワクチン接種方法はワクチン Dengue ウイルスの安全性を損なうことなしに、ワクチン Dengue ウイルスの免疫原性を向上させることを実施例は示している。

【実施例 2】

【0120】

サルにおいて、解剖学的にまったく異なる部位に 2 つの二価組成物 C Y D - 1 , 4 および C Y D - 2 , 3 を同時に注射するワクチン接種

10

実施例 1 で示したように、ウイルス血症および免疫原性についてサルをモデルとして試験した。本実施例において、試験される二価組成物は、それぞれ最も免疫原性の強いワクチンウイルス（C Y D - 1 , 4）および最も免疫原性の弱いワクチンウイルス（C Y D - 2 , 3）を含む。

【0121】

2.1 材料および方法：実施例 1 と同じ

【0122】

2.2 同時ワクチン接種の評価

年齢および体重の等しい 1 群 4 匹のサル、計 2 群を免疫付与した（表 5 参照）。

20

【0123】

ワクチン接種は実施例 1 に記載されているとおり行われる。

【0124】

群の組成およびワクチン接種プロトコル

【表 5】

群	サル	
	ワクチン接種	
	D0	D58
1	片腕に CYD 1,4 もう一方の腕に C YD 2,3	片腕に CYD 1,4 もう一方の腕に CY D 2,3
2	CYD 1234	CYD 1234

30

【0125】

1 回のワクチン接種後（D 28）および 2 回のワクチン接種後（D 86）に得られる免疫原性は表 6 に示される。

【0126】

ウイルス血症の結果は、実施例 1 の結果と同じであり、ウイルス血症が血清型 4 によって誘導されたことおよび 2 つの群の間で大きな違いはなかったことを示した。

40

【0127】

【表 6】

表 6 : SN50 中和力価 (units 1/dil)

群	ID	サル		D0+28				D58+28			
		ワクチン接種		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
		D0	D58								
1	AR465	CYD 1234	CYD 1234	63	10	<	100	200	25	10	126
	AR558			13	<	<	126	401	<	20	160
	AR559			<	<	<	100	13	<	<	50
	AR639			25	<	<	318	201	<	<	201
	相乗平均			20	<	<	142	119	<	<	119
2	AR083	片腕に CYD 1,4 もう一方の腕に CYD 2,3	片腕に CYD 1,4 もう一方の腕に CYD 2,3	63	<	<	201	100	16	10	126
	AR506			63	25	13	638	126	100	32	201
	AR610			63	20	<	100	159	50	40	253
	AR644			40	<	<	40	505	80	40	100
	相乗平均			56	<	<	150	178	50	27	159

<: 力価 < 10

【 0 1 2 8 】

この結果は実施例 1 で得られた結果を支持しており、以下のようにまとめることができる：

この投与方法により、四価ワクチン接種により得られる相同的中和抗体反応を定性的および定量的に向上させることができる。

追加免疫後、CYD - 1, 4 二価ワクチン接種と同時に CYD - 2, 3 ワクチン接種を解剖学的に別の部位に行うことにより、すべてのサルにおいて 4 種の血清型に対する相同的な応答を誘導するが、これは、実施例 1 で示したとおり、従来の四価を摂取した群にお

10

20

30

40

50

いてはそうではない。

実施例 1 で 2 つの二価 C Y D - 1 , 2 および C Y D - 3 , 4 を摂取したサルの群と比較して、二価 C Y D - 1 , 4 ワクチンと C Y D - 2 , 3 ワクチンの同時接種の後得られる抗体力価は、血清型 1、2 および 3 については高く、血清型 4 については低く、これは、血清型 4 によって優勢化されない、4 種の血清型の間でより均衡のとれた応答を示す。

このようなワクチン接種方法において、優勢な血清型を他と分けることで、4 種の血清型に対する均衡のとれた応答を可能にした。

したがって、上記 2 つの実施例は、本発明に係る免疫方法がウイルス血症を測定することによって評価されるようにワクチンデングウイルスの安全性を害することなくワクチンデングウイルスの免疫原性を向上させることを示している。

10

【配列表】

0005269796000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ブリュノ・ギィ
フランス、エフ - 6 9 0 0 5 リヨン、リュ・デ・ノイエ 1 5 ペー番
- (72)発明者 レミ・フォラ
フランス、エフ - 6 9 7 8 0 セレザン・デュ・ローヌ、リュ・ピエール・ドゥヴォー 2 番
- (72)発明者 ジャン・ラン
フランス、エフ - 6 9 7 8 0 ミヨン、ルート・ドゥ・サン・プリースト 1 1 8 番
- (72)発明者 ヴェロニク・バルバン
フランス、エフ - 6 9 2 9 0 クラボンヌ、リュ・ジャン・クロード・マルタン 7 テル番

審査官 上條 のぶよ

- (56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 4 0 1 6 8 (J P , A)
Virology , 2 0 0 2 年 , Vol.298, No.1 , p.146-159
臨床と微生物 , 2 0 0 2 年 , Vol.29, No.2 , p.25-29
ウイルス , 2 0 0 2 年 , Vol.52, No.1 , p.15-20
Journal of Virology , 2 0 0 5 年 , Vol.79, No.9 , p.5516-5528
Am. J. Trop. Med. Hyg. , 2 0 0 4 年 , Vol.70, No.1 , p.89-97
Am. J. Trop. Med. Hyg. , 1 9 7 3 年 , Vol.22, No.3 , p.375-381
Am. J. Trop. Med. Hyg. , 1 9 7 3 年 , Vol.22, No.3 , p.365-374

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 4 4
C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)