



SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie
Office de la Propriété intellectuelle

1022878 B1

Date de délivrance : 30/09/2016

BREVET D'INVENTION

Date de priorité : 17/07/2014

Classification internationale : A61K 39/095, C07K 14/22

Numéro de dépôt : BE2015/5455

Date de dépôt : 16/07/2015

Titulaire :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

Inventeur :

BIOLCHI Alessia
53100 SIENA
Italie

BRUNELLI Brunella
53100 SIENA
Italie

GIULIANI, Marzia, Monica
53100 SIENA
Italie

MASIGNANI Vega
53100 SIENA
Italie

VACCINS ANTI-MENINGOCOCCIQUES

Cette invention concerne des vaccins anti-méningococciques qui peuvent être améliorés par incorporation de multiples allèles ou variants de fHbp, afin de couvrir plus largement la diversité connue de cette protéine, et/ou par réduction de la quantité du composant OMV dans chaque dose.

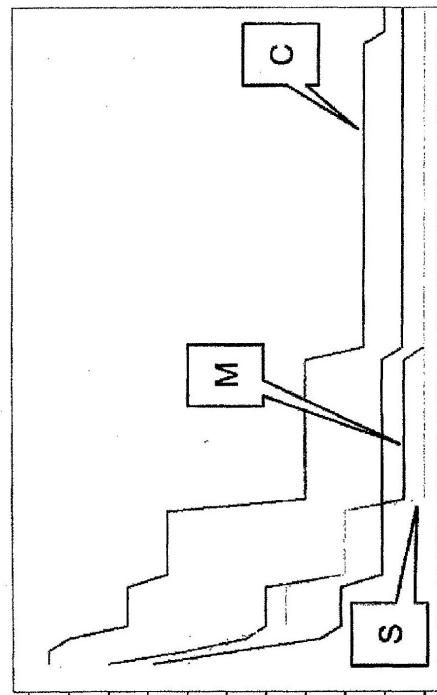


Fig. 1

VACCINS ANTI-MENINGOCOCCIQUES

DOMAINE TECHNIQUE

Cette invention relève du domaine de la vaccination anti-méningococcique.

CONTEXTE

5 *Neisseria meningitidis* est une bactérie capsulée à Gram-négatif qui colonise les voies respiratoires supérieures d'environ 10 % de la population humaine. Des vaccins conjugués sont disponibles contre les sérogroupes A, C, W135 et Y, mais le seul vaccin disponible pour se protéger contre le
10 sérogroupe B en général est le BEXSERO™ qui a été approuvé en 2013. Ce produit contient quatre composants immunogènes principaux : la protéine liant le facteur H, "fHbp" ; la protéine liant l'héparine, NHBA ; l'adhésine A de *Neisseria*, NadA ; et les vésicules de membrane externe (OMV) .
15

RESUME DE L'INVENTION

Selon un aspect, la présente invention est une composition immunogène comprenant un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, en
20 combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) des vésicules de membrane externe de méningocoques.

Selon un autre aspect, la présente invention est une composition immunogène comprenant des vésicules de membrane externe de méningocoques en combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3 ; les vésicules de membrane externe (OMV) étant présentes à une
25 concentration entre 5 et 30 µg/ml. En particulier, le polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3 est un polypeptide de fusion stabilisé et/ou ne liant pas fHbp. Plus particulièrement, le fHbp v1 porte une mutation à la position R41, par exemple une
30

mutation R41S. Plus particulièrement encore, les polypeptides fHbp v2 et v3 portent une ou plusieurs mutations stabilisantes et/ou ne liant pas le facteur H (fH) aux positions suivantes, numérotées selon les séquences pleine longueur (SEQ ID NO : 1 & 3) et également selon les séquences ΔG (SEQ ID NO : 8 & 7) :

		Stabilisantes	Ne liant pas fH	
v2	SEQ ID NO : 1	Ser-58	Leu-149	Glu-266
	SEQ ID NO : 8	Ser-32	Leu-123	Glu-240
v3	SEQ ID NO : 3	Ser-63	Leu-157	Glu-274
	SEQ ID NO : 7	Ser-32	Leu-126	Glu-243

Selon un autre aspect, la présente invention est une composition immunogène comprenant un polypeptide de fusion ayant une séquence d'acides aminés de formule NH₂-A-[-X-L]₃-B-COOH, où chaque X est un variant différent de la séquence fHbp, L est une séquence d'acides aminés lieu (**« linker »**) facultative, A est une séquence d'acides aminés N-terminale facultative, et B est une séquence d'acides aminés C-terminale facultative.

Selon un autre aspect, la présente invention est une méthode destinée à protéger un mammifère, tel qu'un sujet humain, contre une infection à méningocoques, comprenant l'administration d'une composition immunogène selon l'invention.

20 BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

La Figure 1 montre une courbe RCD, la proportion étant indiquée sur l'axe des y (de 0,0 à 1,0) et le titre SBA sur l'axe des x (de 0 à 256, par incrément de 16). La courbe du haut est celle du groupe C ; le groupe le plus rapide à atteindre 0,0 est S.

La Figure 2 est la représentation d'une mutation stabilisante et d'une mutation ne liant pas le facteur H (fH) introduites dans les polypeptides fHbp v1, v2 et v3 pour produire les protéines de fusion 731 S et 731 SNB.

30 Les Figures 3(a)-(g) montrent que les compositions comprenant la fusion 741-231 (SEQ ID NO : 10) et ¼ OMV

suscitent des GMT plus élevés que BEXSERO™ contre sept souches testées (3a=v2, 3b=v2, 3c=v3, 3d=v3, 3e=v2, 3f=v2, 3g=v3).

DESCRIPTION DETAILLEE

5 Pour améliorer le BEXSERO™, il serait avantageux d'améliorer encore sa couverture contre diverses souches méningococciques (en cas de décalages potentiels et de mutations au fur et à mesure que l'utilisation du vaccin se généralise) et également de réduire les rares occurrences de
10 fièvre qui sont parfois observées quand le vaccin est co-administré avec des vaccins infantiles classiques [1]. A ces fins, les inventeurs ont modifié le BEXSERO™ de deux façons : (i) pour inclure de multiples allèles ou variants de fHbp, et couvrir plus largement la diversité connue de cette protéine ;
15 et (ii) pour réduire la quantité du composant OMV dans chaque dose. Comme démontré dans la présente, ces deux modifications conduisent bel et bien à une amélioration du vaccin.

Par conséquent, dans un premier mode de réalisation, l'invention est une composition immunogène comprenant un
20 polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, en combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) des vésicules de membrane externe de méningocoques.

25 De plus, selon un second mode de réalisation, la présente invention est une composition immunogène comprenant des vésicules de membrane externe de méningocoques en combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) un
30 polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3 ; les vésicules de membrane externe (OMV) étant présentes à une concentration entre 5 et 30 µg/ml.

De manière similaire, en combinant ces deux modes de
35 réalisation, l'invention est une composition immunogène comprenant (i) un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, (ii) un polypeptide NHBA,

(iii) un polypeptide NadA et (iv) de 5 à 30 µg/ml de vésicules de membrane externe de méningocoques.

ProtÈine liant le facteur H (fHbp)

5 Une composition selon l'invention peut comprendre un polypeptide fHbp. Le BEXSERO™ comprend un polypeptide fHbp, ledit fHbp ayant également été connu sous les noms de "741" (SEQ ID NO : 2536 dans réf. 2 ; SEQ ID 1 dans la présente), "NMB1870", "GNA1870" [3,5], "P2086", "LP2086" ou "ORF2086" 10 [6,8]. La structure 3D de cette protéine est connue [9,10], et comporte deux tonneaux β joints par un court lieu (« linker »). De nombreuses publications ont rapporté l'efficacité protectrice de cette protéine dans les vaccins anti-méningococciques, voir p. ex. références 11,15. Cette 15 protéine est exprimée sous une forme lipidée dans de multiples souches couvrant tous les sérogroupes. Les séquences fHbp ont été regroupées en trois variants [3] (désignés v1, v2 et v3 dans la présente), et il s'est avéré de manière générale qu'un sérum dirigé contre un variant donné est bactéricide envers 20 les souches qui expriment ce variant, mais n'est pas actif envers les souches qui expriment l'un des deux autres variants, à savoir qu'il y a une protection croisée intra-variant, mais pas de protection croisée inter-variants (hormis quelques cas de réactivité croisée v2 et v3).

25 Pour accroître la réactivité croisée inter-variants, la séquence fHbp a été remaniée pour contenir certaines spécificités pour les trois variants [16]. Au lieu de suivre cette approche, cependant, l'invention utilise un polypeptide de fusion qui comprend les trois fHbp méningococciques v1, v2 30 et v3.

fHbp v1

Le fHbp pleine longueur provenant de la souche MC58 dans v1 a la séquence d'acides aminés suivante (SEQ ID NO : 1) :

MNRTAFCCSLTTALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLK
LAAQGAEKTYGNNGDSLNTGKLNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQ
IQDSEHSGKMVKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNG
KIEHLKSPELNVDLAADIKEPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAEVKTVNG
IRHIGLAAKQ

La lipoprotéine mature est dépourvue des 19 premiers acides aminés de SEQ ID NO : 1. (soulignés ; donne SEQ ID NO : 4, commençant par Cys-20). Le BEXSERO™ contient une forme "ΔG" du fHbp v1 dans laquelle la séquence pleine longueur est tronquée jusqu'au résidu 26 (à savoir, qui élimine la portion poly-glycine et commence à la place par Val-27), donnant SEQ ID NO : 7.

Un fHbp méningococcique v1 utilisé dans le cadre de l'invention comprendra une séquence d'acides aminés (i) présentant une identité de séquence d'au moins i % avec SEQ ID NO : 7, et/ou (ii) comprenant un fragment de SEQ ID NO : 7.

La valeur de i peut être choisie parmi 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou plus. Elle est de préférence de 90 (à savoir, la séquence d'acides aminés présente une identité d'au moins 90 % avec SEQ ID NO : 7) et plus préféablement de 95.

De manière générale, le fragment mentionné en (ii) comportera au moins 7 acides aminés, p. ex. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 acides aminés contigus ou plus provenant de SEQ ID NO : 7. Le fragment contiendra typiquement au moins un épitope provenant de SEQ ID NO : 7. L'identification et la cartographie des épitopes de fHbp sont établies [12 ; 17,21]. Le partage d'au moins 30 acides aminés contigus avec SEQ ID NO : 7 sera typique, et généralement une séquence d'acides aminés de fHbp v1 contiendra plusieurs (p. ex. 2, 3, 4, 5 ou plus) fragments provenant de SEQ ID NO : 7.

Dans l'ensemble, une séquence d'acides aminés de fHbp v1 peut présenter une identité de séquence d'au moins i % avec SEQ ID NO : 7 et contenir plusieurs fragments provenant de celle-ci.

Généralement, une séquence de fHbp v1 contient au moins une séquence d'acides aminés qui n'est pas présente dans SEQ ID NO : 2 et/ou au moins une séquence d'acides aminés qui n'est pas présente dans SEQ ID NO : 3.

Un polypeptide utilisé dans le cadre de l'invention et contenant une séquence v1 peut, après administration à un

mammifère hôte convenable (tel qu'une souris ou un sujet humain), susciter la production d'anticorps capables de reconnaître un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 4. Ces anticorps comprendront 5 certains anticorps qui ne reconnaissent pas un polypeptide v2 ou v3 (p. ex. qui ne reconnaîtront pas un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 5 et un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 6), bien qu'ils puissent également comprendre 10 certains anticorps ayant des réactions croisées avec des polypeptides v2 et/ou v3. Dans l'idéal, les anticorps sont bactéricides envers une souche méningococcique qui exprime un fHbp v1, p. ex. envers la souche MC58 (voir ci-dessous).

15 fHbp v2

Le fHbp pleine longueur provenant de la souche 2996 dans v2 a la séquence d'acides aminés suivante (SEQ ID NO : 2) :
MNRTAFCCCLSTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLQSVRKNEKLK
LAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEK
INNPDKIDS LINQRSPFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAEHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGK
IEHLKTPEQNVELAAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAKSATVKIGEKV
HEIGIAGKQ

La lipoprotéine mature est dépourvue des 19 premiers acides aminés de SEQ ID NO : 2 (soulignés ; donne SEQ ID 20 NO : 5) et la forme ΔG de SEQ ID NO : 2 est dépourue des 26 premiers acides aminés (SEQ ID NO : 8).

Un fHbp méningococcique v2 utilisé dans le cadre de l'invention comprendra une séquence d'acides aminés (i) présentant une identité de séquence d'au moins j % avec SEQ ID 25 NO : 8, et/ou (ii) comprenant un fragment de SEQ ID NO : 8.

La valeur de j peut être choisie parmi 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou plus. Elle est de préférence de 90 (à savoir, la séquence d'acides aminés présente une identité d'au moins 90 % avec SEQ ID NO : 8) et 30 plus préféablement de 95.

De manière générale, le fragment mentionné en (ii) comportera au moins 7 acides aminés, p. ex. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 acides aminés contigus ou plus provenant de

SEQ ID NO : 8. Le fragment contiendra typiquement au moins un épitope provenant de SEQ ID NO : 8. L'identification et la cartographie des épitopes de fHbp sont établies (voir ci-dessus). Le partage d'au moins 30 acides aminés contigus avec SEQ ID NO : 8 sera typique, et généralement une séquence d'acides aminés de fHbp v2 contiendra plusieurs (p. ex. 2, 3, 4, 5 ou plus) fragments provenant de SEQ ID NO : 8.

Dans l'ensemble, une séquence d'acides aminés de fHbp v2 peut présenter une identité de séquence d'au moins $j\%$ avec SEQ ID NO : 8 et contenir plusieurs fragments provenant de celle-ci.

Généralement, une séquence de fHbp v2 contient au moins une séquence d'acides aminés qui n'est pas présente dans SEQ ID NO : 1 et/ou au moins une séquence d'acides aminés qui n'est pas présente dans SEQ ID NO : 3.

Un polypeptide utilisé dans le cadre de l'invention et contenant une séquence v2 peut, après administration à un mammifère hôte convenable (tel qu'une souris ou un sujet humain), susciter la production d'anticorps capables de reconnaître un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 5. Ces anticorps comprendront certains anticorps qui ne reconnaissent pas un polypeptide v1 ou v3 (p. ex. qui ne reconnaîtront pas un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 4 et un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 6), bien qu'ils puissent également comprendre certains anticorps ayant des réactions croisées avec des polypeptides v1 et/ou v3. Dans l'idéal, les anticorps sont bactéricides envers une souche méningococcique qui exprime un fHbp v2, p. ex. envers la souche M2091 (voir ci-dessous).

fHbp v3

Le fHbp pleine longueur provenant de la souche M1239 dans v3 a la séquence d'acides aminés suivante (SEQ ID NO : 3) :

MNRTAFCCLSLLTALILTACSSGGGSGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSI
PQNGLTLQSAQGAETFKAGDKNSLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHS
AVVALQIEKINNPKTDSSLINQRSLFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAEGHGKAFSSDDPNGLHYSIDF
TKKQGYGRRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKTYHLALFGDRAQEIAAGSAT
VKIGEKVHEIGIAGKQ

La lipoprotéine mature est dépourvue des 19 premiers acides aminés de SEQ ID NO : 3 (soulignés ; donne SEQ ID NO : 6) et la forme ΔG de SEQ ID NO : 3 est dépourvue des 31 premiers acides aminés (SEQ ID NO : 9).

5 Un fHbp méningococcique v3 utilisé dans le cadre de l'invention comprendra une séquence d'acides aminés (i) présentant une identité de séquence d'au moins k % avec SEQ ID NO : 9, et/ou (ii) comprenant un fragment de SEQ ID NO : 9.

10 La valeur de k peut être choisie parmi 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou plus. Elle est de préférence de 90 (à savoir, la séquence d'acides aminés présente une identité d'au moins 90 % avec SEQ ID NO : 9) et plus préférablement de 95.

15 De manière générale, le fragment mentionné en (ii) comportera au moins 7 acides aminés, p. ex. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 acides aminés contigus ou plus provenant de SEQ ID NO : 9. Le fragment contiendra typiquement au moins un épitope provenant de SEQ ID NO : 9. L'identification et la 20 cartographie des épitopes de fHbp sont établies (voir ci-dessus). Le partage d'au moins 30 acides aminés contigus avec SEQ ID NO : 9 sera typique, et généralement une séquence d'acides aminés de fHbp v1 contiendra plusieurs (p. ex. 2, 3, 4, 5 ou plus) fragments provenant de SEQ ID NO : 9.

25 Dans l'ensemble, une séquence d'acides aminés de fHbp v3 peut présenter une identité de séquence d'au moins k % avec SEQ ID NO : 9 et contenir plusieurs fragments provenant de celle-ci.

30 Généralement, une séquence de fHbp v3 contient au moins une séquence d'acides aminés qui n'est pas présente dans SEQ ID NO : 1 et/ou au moins une séquence d'acides aminés qui n'est pas présente dans SEQ ID NO : 2.

35 Un polypeptide utilisé dans le cadre de l'invention et contenant une séquence v3 peut, après administration à un mammifère hôte convenable (tel qu'une souris ou l'homme), susciter la production d'anticorps capables de reconnaître un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ

ID NO : 6. Ces anticorps comprendront certains anticorps qui ne reconnaissent pas un polypeptide v1 ou v2 (p. ex. qui ne reconnaîtront pas un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 4 et un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 5), bien qu'ils puissent également comprendre certains anticorps ayant des réactions croisées avec des polypeptides v1 et/ou v2. Dans l'idéal, les anticorps sont bactéricides envers une souche méningococcique qui exprime un fHbp v3, p. ex. envers la souche M01-240355 (voir ci-dessous).

Polypeptide de fusion

L'invention utilise un polypeptide de fusion qui comprend les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3. Par conséquent, le polypeptide de fusion peut inclure au moins un épitope provenant de chacune des SEQ ID NO : 7, 8, et 9 et, après administration à un mammifère hôte, peut susciter la production d'anticorps capables de reconnaître les trois polypeptides, à savoir (i) un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 4, (ii) un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 5, et (iii) un polypeptide méningococcique de type sauvage constitué par SEQ ID NO : 6. Dans l'idéal, ces anticorps sont bactéricides envers une souche méningococcique qui exprime un fHbp v1, une souche méningococcique qui exprime un fHbp v2, et également une souche méningococcique qui exprime un fHbp v3 (p. ex. envers chacune des souches MC58, M2091, et M01-240355).

En référence aux définitions données ci-dessus, si applicable, pour le polypeptide de fusion, il est préférable que $i=j=k$.

En général, un polypeptide de fusion fHbp selon l'invention a une séquence d'acides aminés de formule :
 $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_3\text{-B-COOH}$

dans laquelle chaque X est un variant différent de la séquence fHbp, L est une séquence d'acides aminés linker (« linker ») facultative, A est une séquence d'acides aminés N-terminale

facultative, et B est une séquence d'acides aminés C-terminale facultative.

Les trois fragments X sont une séquence v1, v2, et v3 telle que décrite ci-dessus. Elles peuvent être présentes dans 5 un ordre quelconque dans le sens N- à C-terminal, à savoir v1-v2-v3, v1-v3-v2, v2-v1-v3, v2-v3-v1, v3-v1-v2, ou v3-v2-v1. L'ordre préféré entre tous est v2-v3-v1.

A chaque occurrence de [-X-L-], une séquence d'acides aminés lieur (« linker ») -L- peut être présente ou absente. 10 La ou les séquences d'acides aminés lieurs (« linker ») -L- seront généralement courtes (p. ex. 20 acides aminés ou moins, à savoir 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). A titre d'exemples, il y a les séquences peptidiques courtes qui facilitent le clonage, les lieurs 15 (« linker ») poly-glycine (à savoir Gly_n où n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus (SEQ ID NO : 42)), et les étiquettes histidine (à savoir His_n où n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus (SEQ ID NO : 43)). D'autres séquences d'acides aminés lieurs (« linker ») convenables s'imposeront à l'homme du 20 métier. Un lieur (« linker ») utile est GSGGGG (SEQ ID NO : 22), le dipeptide Gly-Ser étant formé à partir d'un site de restriction BamHI, facilitant ainsi le clonage et la manipulation. Un autre lieur (« linker ») utile est SEQ ID NO : 23, qui peut éventuellement être précédé par un dipeptide 25 Gly-Ser (SEQ ID NO : 24, provenant de BamHI) ou par un dipeptide Gly-Lys (SEQ ID NO : 25, provenant de HindIII).

-A- est une séquence d'acides aminés N-terminale facultative. Elle sera généralement courte (p. ex. 40 acides aminés ou moins, à savoir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). A titre d'exemples, il y a les séquences de tête (« leader ») qui dirigent le transport des protéines. Si X₁ est dépourvu de sa propre méthionine N-terminale, -A- peut fournir ledit résidu 35 méthionine dans le polypeptide traduit (p. ex. -A- est un résidu Met seul). Le résidu Met peut être à l'extrémité N-terminale d'une séquence lieur (« linker ») telle que SEQ ID

NO : 23 (à savoir SEQ ID NO : 26), ou à l'extrémité N-terminale d'une séquence courte (p. ex. SEQ ID NO : 27).

-B- est une séquence d'acides aminés C-terminale facultative. Elle sera généralement courte (p. ex. 40 acides 5 aminés ou moins, à savoir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). A titre d'exemples, il y a les séquences qui dirigent le transport des protéines, les séquences peptidiques courtes qui facilitent le 10 clonage ou la purification (p. ex. comprenant les étiquettes histidine, à savoir His_n où n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus (SEQ ID NO : 43)), ou les séquences qui améliorent la stabilité du polypeptide. D'autres séquences d'acides aminés C-terminales convenables s'imposeront à l'homme du métier. Un 15 fragment -B- convenable est SEQ ID NO : 28, dans lequel Leu-Glu en aval de l'étiquette histidine provient d'un site de restriction Xhol.

Un polypeptide de fusion convenable, utilisable avec l'invention comprend SEQ ID NO : 10. D'après la formule ci-dessus, dans SEQ ID NO : 10, -A- est SEQ ID NO : 26, X₁ est une séquence fHbp v2 (SEQ ID NO : 8), -L₁- est SEQ ID NO : 24, X₂ est une séquence fHbp v3 (SEQ ID NO : 9), -L₂- est SEQ ID NO : 22, X₃ est une séquence fHbp v1 (SEQ ID NO : 7), et L₃ et B sont absents. Les trois séquences fHbp dans SEQ ID NO : 10 25 sont soulignées ci-dessous :

MGPDSRLLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGN
GD SLNTGKLNDKVSRDFIFRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDS LINQR
SFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAELYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELA
AAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEVHEIGIAGKQGSGPD
SDRLQQRRVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSAQGAETFKAGDKDNS
LNTGKLNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNSAVVALQIEKINNPDKTDLSLINQRS
FLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAELYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAA
AELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEVHEIGIAGKQGSGGGG
VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLQSVRKNEKLKLAQGAEKTYGNQDSLNTGKLNDKV
SRDFIFRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQLDSEHSGKVMAKRQFRIGDIAGEHT
SFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNQGKIEHLKSPELNVDLAAADIKP
DGKRH AVISGSVLYNQAEGSYSLGIFGGKAQEVAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

Un polypeptide de fusion préféré, utilisable avec l'invention comprend SEQ ID NO : 29. D'après la formule ci-dessus, dans SEQ ID NO : 29, -A- est SEQ ID NO : 26, X₁ est

une séquence fHbp v2 (SEQ ID NO : 8), -L₁- est SEQ ID NO : 22, X₂ est une séquence fHbp v3 (SEQ ID NO : 9), -L₂- est SEQ ID NO : 22, X₃ est une séquence fHbp v1 (SEQ ID NO : 7), et L₃ et B sont absents. Les trois séquences fHbp dans SEQ ID NO : 29

5 sont soulignées ci-dessous :

MGPDSDRLLQQRRVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQGAEKT
YGNNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNP
DKIDSLINQRSLFLVSGLGGEHTAFNQLPDGKAELYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHG
KIEHLKTPEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATV
KIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLT
LSAQGAEKTFKAGDKDNLNTGKLKNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHS
VVALQIEKINNPDKTDSLINQRSLFLVSGLGGEHTAFNQLPGGKAELYHGKAFSSDDPNGLRH
YSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFG
DRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQGSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLT
LDQSVRKNEKLKLAQGAEKTGNGDSLNTGKLKNDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEF
QVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTA
GSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDKRHAVISGSVLYNQAE
KGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

Par conséquent, dans l'idéal l'invention utilise un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 29, mais l'invention peut également utiliser un polypeptide comprenant SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 29, mais

10 modifiée à hauteur de 10 changements d'acides aminés individuels (à savoir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substitutions, délétions et/ou insertions d'acides aminés individuelles), à condition que le polypeptide puisse susciter la production d'anticorps capables de reconnaître les trois 15 polypeptides méningococciques de type sauvage de SEQ ID NO : 4-6, comme décrit ci-dessus. En outre, SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 29 peut être modifiée au niveau du fragment -A- (p. ex. pour utiliser une alternative à SEQ ID NO : 26), de façon qu'un polypeptide utilisé avec l'invention puisse 20 comprendre SEQ ID NO : 30, éventuellement modifiée à hauteur de 10 changements d'acides aminés individuels (comme décrit ci-dessus).

Par exemple, SEQ ID NO : 30 peut être modifiée pour introduire des mutations ponctuelles qui altèrent la capacité 25 de chaque fHbp à interagir avec fH. Par exemple, SEQ ID NO : 30 peut être mutée aux résidus E240, E496, et R543, pour obtenir ainsi SEQ ID NO : 31 (portant les mutations E240X,

E496X et R543X, où X est un acide aminé quelconque autre que l'acide aminé indiqué, à savoir, E240X désigne tout acide aminé autre que E sur le résidu 240). Un mode de réalisation préféré de SEQ ID NO : 31 est SEQ ID NO : 32 (portant les 5 mutations E240A, E496A, R543S). L'invention peut utiliser SEQ ID NO : 31 (p. ex. SEQ ID NO : 32), éventuellement modifiée à hauteur de 5 changements d'acides aminés individuels (comme décrit ci-dessus), à condition que les résidus E240, E496, et R543 ne soient pas présents.

De plus, SEQ ID NO : 30 peut être modifiée pour introduire des mutations ponctuelles qui accroissent la stabilité d'un fHbp. Par exemple, SEQ ID NO : 30 peut être mutée au niveau des résidus S32, L123, S285, et L379, pour obtenir ainsi SEQ ID NO : 33 (portant les mutations S32X, L123X, S285X et L379X). Un mode de réalisation préféré de SEQ ID NO : 33 est SEQ ID NO : 34 (portant les mutations S32V, L123R, S285V, L379R). L'invention peut utiliser SEQ ID NO : 33 (p. ex. SEQ ID NO : 34), éventuellement modifiée à hauteur de 5 changements d'acides aminés individuels (comme décrit ci-dessus), à condition que les résidus S32, L123, S285, et L379 ne soient pas présents. Un de ces polypeptides est SEQ ID NO : 35, dans lequel la séquence v1 a été modifiée pour inclure une mutation comme rapporté dans réf. 22, p. ex. la mutation "R41S" (SEQ ID NO : 36). SEQ ID NO : 35 porte les 20 mutations S32X, L123X, S285X, L379X et R543X, et SEQ ID NO : 36 porte les mutations S32V, L123R, S285V, L379R et R543S. La nomenclature "R41S" est numérotée par rapport au polypeptide v1 mature (SEQ ID NO : 4), par conséquent, p. ex., elle est présente dans le polypeptide de fusion SEQ ID NO : 35 sous 25 forme de R543X et dans SEQ ID NO : 36 sous forme de R543S.

Ces diverses approches peuvent être combinées, de façon que l'invention puisse utiliser un polypeptide comprenant SEQ ID NO : 37 (p. ex. un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 38). SEQ ID NO : 37 et SEQ ID NO : 38 portent les mutations S32V, L123R, E240A, S285V, L379R, E496A et R543S. SEQ ID NO : 38 comprend en outre SEQ ID NO : 26 à son extrémité N-terminale.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention peut utiliser SEQ ID NO : 39 (portant les mutations L123X et L379X) p. ex. SEQ ID NO : 40 (portant les mutations L123R et L379R). De manière similaire, l'invention peut utiliser SEQ ID NO : 39 5 (p. ex. SEQ ID NO : 40), éventuellement modifiée à hauteur de 5 changements d'acides aminés individuels (comme décrit ci-dessus), à condition que les résidus L123 et L379 ne soient pas présents (voir p. ex. SEQ ID NO : 34, qui diffère de SEQ ID NO : 40 par incorporation de deux substitutions S/V comme 10 indiqué ci-dessus). Un de ces polypeptides est SEQ ID NO : 41, dans lequel la séquence v1 a été modifiée pour inclure la mutation "R41S", et comprend par conséquent L123R, L379R et R543S. Dans d'autres modes de réalisation, quand ces protéines de fusion sont présentes dans des compositions selon 15 l'invention, des OMV peuvent être présentes à des concentrations entre 2,5 et 12,5 µg/ml.

Les résidus acides aminés notés à des fins de mutation ci-dessus sont définis par rapport à des séquences de départ spécifiques. Les résidus acides aminés dans toute autre 20 séquence fHbp peuvent être facilement identifiés par alignement de séquences, étant p. ex. l'acide aminé qui, quand il est aligné à l'aide d'un algorithme d'alignement par paire (p. ex. l'algorithme d'alignement global de Needleman-Wunsch, décrit ci-dessous), s'aligne avec l'acide aminé mentionné dans 25 la présente. Souvent l'acide aminé sera identique, mais l'alignement l'identifiera facilement si ce n'est pas le cas.

fHbp est naturellement une lipoprotéine chez *N. meningitidis*. Elle s'est également avérée être lipidée quand elle est exprimée chez *E. coli* avec sa séquence de tête 30 (« leader ») native ou des séquences de tête (« leader ») hétérologues. Les polypeptides selon l'invention peuvent avoir un résidu cystéine N-terminal, qui peut être lipidé p. ex. comprendre un groupe palmitoyle, formant généralement une tripalmitoyl-S-glycéryl-cystéine. Dans les modes de 35 réalisation normaux, toutefois, le polypeptide de fusion selon l'invention n'est pas lipidé (typiquement parce que le

fragment -A- N-terminal ne dirige pas la lipidation) chez l'hôte d'expression..

Antigène neisserien liant l'héparine (NHBA)

Une composition selon l'invention peut comprendre un polypeptide immunogène NHBA. L'antigène NHBA a été inclus dans la séquence du génome publiée de la souche méningococcique de sérogroupe B MC58 [23] sous forme de gène NMB2132 (Numéro d'accès GenBank GI :7227388 ; SEQ ID NO : 11 dans la présente). Des séquences de l'antigène NHBA provenant de nombreuses souches ont été publiées depuis. Par exemple, on peut voir des formes alléliques de NHBA sur les Figures 5 et 15 de la référence 24, et dans l'exemple 13 et sur la figure 21 de la référence 2 (SEQ ID 3179 à 3184 dans la présente). Divers fragments immunogènes de l'antigène NHBA ont également été rapportés, y compris le fragment " ΔG " de SEQ ID NO : 12. Les antigènes NHBA préférés pour une utilisation dont fait l'invention comprennent une séquence d'acides aminés : (a) présentant une identité de 60 % ou plus (p. ex. 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 12 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins "n" acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 12, où "n" vaut 7 ou plus (p. ex. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope provenant de SEQ ID NO : 12.

Les antigènes NHBA selon l'invention les plus utiles peuvent susciter la production d'anticorps qui, après administration à un mammifère hôte convenable (tel qu'une souris ou un sujet humain), peuvent se lier à un polypeptide méningococcique constitué par la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 13. Les antigènes NHBA avantageux utilisables dans le cadre de l'invention peuvent susciter la production d'anticorps anti-méningococciques bactéricides après administration à un sujet mammifère.

Un polypeptide NHBA particulièrement préféré pour une utilisation dont fait l'invention comprend SEQ ID NO : 12,

éventuellement modifiée à hauteur de 3 changements d'acides aminés individuels (à savoir 1, 2, ou 3 substitutions, délétions et/ou insertions d'acides aminés individuelles), à condition que le polypeptide puisse susciter la production 5 d'anticorps capables de se lier à SEQ ID NO : 13, comme décrit ci-dessus.

Comme observé dans le BEXSEROM™, le polypeptide NHBA peut être utilement présent sous la forme d'un polypeptide de fusion e.g. lié par fusion à un polypeptide NMB1030. Dans ces 10 polypeptides de fusion, NMB1030 est de préférence en aval de NHBA. NMB1030 provenant de la souche MC58 a le numéro d'accès GenBank GI:7226269 (SEQ ID NO : 14 dans la présente). Une séquence NMB1030 pour une utilisation dont fait l'invention peut comprendre une séquence d'acides aminés : (a) présentant 15 une identité de 60 % ou plus (p. ex. 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 14 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins "n" acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 14, où "n" vaut 30 ou plus. Un 20 fragment NMB1030 utile est SEQ ID NO : 15.

Un de ces polypeptides de fusion NHBA-NMB1030 a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 16. Par conséquent, l'invention peut utiliser SEQ ID NO : 16, éventuellement modifiée à hauteur de 3 changements d'acides aminés 25 individuels (à savoir 1, 2, ou 3 substitutions, délétions et/ou insertions d'acides aminés individuelles), à condition que le polypeptide puisse susciter la production d'anticorps capables de se lier à SEQ ID NO : 13, comme décrit ci-dessus.

30 AdhÈsine A de Neisseria (NadA)

Une composition selon l'invention peut comprendre un polypeptide immunogène NadA. L'antigène NadA a été inclus dans la séquence du génome publiée de la souche méningococcique de sérogroupe B MC58 [23] sous forme de gène NMB1994 (Numéro 35 d'accès GenBank GI :7227256 ; SEQ ID NO : 17 dans la présente). Les séquences de l'antigène NadA...provenant de nombreuses souches ont été publiées depuis, et l'activité de

la protéine à titre d'adhésine de *Neisseria* est bien documentée. Divers fragments immunogènes de NadA ont également été rapportés. Les antigènes NadA préférés utilisables dans le cadre de l'invention comprennent une séquence d'acides 5 aminés : (a) présentant une identité de 60 % ou plus (p. ex. 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 17 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins "n" 10 acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 17, où "n" vaut 7 ou plus (p. ex. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope provenant de SEQ ID NO : 17.

Les antigènes NadA selon l'invention les plus utiles 15 peuvent susciter la production d'anticorps qui, après administration à un mammifère hôte, peuvent se lier à un polypeptide méningococcique constitué par la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 18. Les antigènes NadA avantageux utilisables dans le cadre de l'invention peuvent susciter la 20 production d'anticorps anti-méningococciques bactéricides après administration à un mammifère hôte.

Un polypeptide NadA particulièrement préféré pour une utilisation dans le cadre de l'invention comprend SEQ ID NO : 19, éventuellement modifiée à hauteur de 3 changements 25 d'acides aminés individuels (à savoir 1, 2, ou 3 substitutions, délétions et/ou insertions d'acides aminés individuelles), à condition que le polypeptide puisse susciter la production d'anticorps capables de se lier à SEQ ID NO : 18, comme décrit ci-dessus.

30

VÈsicles de membrane externe de mÈningocoques (OMV)

Les compositions selon l'invention comprennent des OMV de méningocoques, à savoir toute vésicule protéoliposomique obtenue par rupture ou boursoufflure d'une membrane externe de 35 méningocoques pour former des vésicules à partir de celle-ci qui conservent les composants protéiques de la membrane externe (p. ex. PorA, PorB, RmpM, Opa, Opc, Omp85, FetA/FrpB,

NspA, etc.), ayant un diamètre dans la plage de 50 à 200 nm. Par conséquent, le terme peut inclure les OMV (parfois appelées "blebs") ainsi que les vésicules dites "microvésicules" (MV [25]) ou "OMV natives" ("NOMV" [26]).

5 Voir également les références 27 à 33. Les vésicules de membrane externe typiques sont préparées artificiellement à partir de bactéries, et peuvent être préparées par un traitement détergent (p. ex. au désoxycholate), ou par des moyens non détergent (voir p. ex. référence 37). Les
10 techniques pour former des OMV comprennent le traitement des bactéries avec un détergent de type sel d'acide biliaire (p. ex. sels d'acide lithocholique, d'acide chenodésoxycholique, d'acide ursodésoxycholique, d'acide désoxycholique, d'acide cholique, d'acide ursocholique, etc., le désoxycholate de
15 sodium [34 & 35] étant préféré pour traiter *Neisseria*) à un pH suffisamment élevé pour ne pas précipiter le détergent [36]. D'autres techniques peuvent être utilisées essentiellement en l'absence de détergent [37,38] telles que des techniques de sonication, homogénéisation, microfluidisation, cavitation,
20 choc osmotique, broyage, presse de French, mélange, etc. Les méthodes n'utilisant pas ou peu de détergent permettent de conserver des antigènes utiles tels que NspA et fHbp [37]. Par conséquent, les OMV utilisées avec l'invention peuvent être préparées à l'aide d'un tampon d'extraction d'OMV contenant
25 environ 0,5 % de désoxycholate ou moins, p. ex. environ 0,2 %, environ 0,1 %, <0,05 % voire pas du tout.

Les vésicules connues sous les noms de MV et NOMV sont des vésicules de membrane naturelles qui se forment spontanément pendant la croissance bactérienne et sont
30 libérées dans le milieu de culture. Les MV peuvent être obtenues par culture de *Neisseria* dans un milieu de culture de type bouillon, séparation des cellules entières des MV dans le milieu de culture de type bouillon (p. ex. par filtration ou centrifugation à basse vitesse pour ne former que des culots
35 de cellules et pas de vésicules plus petites), puis collecte des MV à partir du milieu appauvri en cellules (p. ex. par filtration, précipitation différentielle ou agrégation des MV,

par centrifugation à grande vitesse pour former des culots de MV). De manière générale, les souches utilisables dans la production de MV peuvent être choisies en fonction de la quantité de MV produites en culture, les réfs 45 & 46 5 décrivant p. ex. *Neisseria* comme une bactérie à production élevée de MV.

Les vésicules peuvent être préparées à partir de bactéries qui ont été génétiquement manipulées [39,42] p. ex. pour accroître l'immunogénicité (p. ex. immunogènes hyper-10 exprimés), réduire la toxicité, inhiber la synthèse du polysaccharide capsulaire, sous-réguler l'expression de PorA, etc. Elles peuvent être préparées à partir de souches hyperproductrices de vésicules [43,46]. Des vésicules provenant de bactéries ayant des sous-types de protéines de 15 membrane externe de classe I différentes peuvent être utilisées, p. ex. six sous-types différents [47,48] obtenus à partir de deux populations de vésicules génétiquement modifiées différentes comportant chacune trois sous-types, ou neuf sous-types différents obtenus à partir de trois 20 populations de vésicules génétiquement modifiées différentes comportant chacune trois sous-types, etc. Les sous-types utiles comprennent : P1.7,16 ; P1.5-1,2-2 ; P1.19,15-1 ; P1.5-2,10 ; P1.12-1,13 ; P1.7-2,4 ; P1.22,14 ; P1.7-1,1 ; P1.18-1,3,6. En général, toutefois, il est préférable pour la 25 présente invention de préparer les OMV à partir d'une souche de méningocoque de type sauvage.

Les vésicules utilisables dans le cadre de l'invention peuvent par conséquent être préparées à partir de toute souche méningococcique de type sauvage. Les vésicules proviendront 30 généralement d'une souche de sérogroupe B, mais il est possible de les préparer à partir de sérogroupes autres que B (la référence 36 décrit p. ex. un procédé pour le sérogroupe A), tels que A, C, W135 ou Y. La souche peut être de tout sérototype (p. ex. 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), de tout 35 séro-sous-type (p. ex. P1.4), et de tout immunotype (p. ex. L1 ; L2 ; L3 ; L3,7 ; L3,7,9 ; L10 ; etc.). Les méningocoques peuvent provenir de toute lignée convenable, y compris de

lignées hyperinvasives et hypervirulentes, p. ex. de l'une quelconque des sept lignées hypervirulentes suivantes : sous-groupe I ; sous-groupe III ; sous-groupe IV-1 ; complexe ET-5 ; complexe ET-37 ; cluster A4 ; lignée 3. De manière préférée entre toutes, les OMV sont préparées à partir de la souche NZ98/254, ou autre souche de séro-sous-type P1.4 PorA. De manière avantageuse, l'invention utilise les mêmes OMV que celles utilisées dans le BEXSERO™ et MENZB™, préparées à partir de la souche NZ98/254.

De manière générale, les vésicules contiendront un LOS méningococcique (également connu sous le nom de LPS), mais l'effet pyrogène du LOS dans les OMV est bien plus faible, à quantité égale, à celui du LOS purifié, et l'adsorption des OMV sur l'hydroxyde d'aluminium réduit en outre leur pyrogénicité. Les niveaux de LOS sont exprimés en Unités Internationales (IU) d'endotoxine et peuvent être déterminés par le dosage LAL (lysat d'amœbocytes de limule). De préférence, le LOS est présent à moins de 2000 IU par µg de protéine OMV.

Quand un LOS est présent dans une vésicule, il est possible de traiter la vésicule de façon à lier ses composants LOS et protéines (conjugaison "intra-bleb" [49]).

Un procédé utile de purification d'OMV est décrit dans la référence 50 et implique l'ultrafiltration sur OMV brutes, plutôt qu'une centrifugation à grande vitesse. Le procédé peut impliquer une étape d'ultracentrifugation après l'ultra-filtration. Les OMV peuvent également être purifiées par le procédé de filtration par exclusion de taille à deux étapes décrit dans réf. 51.

De manière utile, les OMV peuvent être mises en suspension dans une solution de saccharose une fois qu'elles ont été préparées.

Combinaisons

Une composition selon l'invention peut comprendre chacun des composants suivants : (a) un polypeptide de fusion

comportant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, (b) un polypeptide NHBA, (c) un polypeptide NadA et (d) des OMV.

Dans ces combinaisons : (a) dans l'idéal le polypeptide de fusion fHbp comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 10, mais éventuellement modifiée à hauteur de 10 changements d'acides aminés individuels, comme décrit ci-dessus ; (b) dans l'idéal, le polypeptide NHBA comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 12, mais éventuellement modifiée à hauteur de 3 changements d'acides aminés individuels, comme décrit ci-dessus ; et (c) dans l'idéal, le polypeptide NadA comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 19, mais éventuellement modifiée à hauteur de 3 changements d'acides aminés individuels, comme décrit ci-dessus.

De préférence : (a) le polypeptide de fusion fHbp a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 10 ; (b) le polypeptide NHBA a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 12 et (c) le polypeptide NadA a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 19.

Mieux encore : (a) le polypeptide de fusion fHbp a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 10 ; (b) le polypeptide NHBA a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 16 et (c) le polypeptide NadA a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 19.

Les polypeptides dans les compositions selon l'invention peuvent être présents à toute concentration capable de susciter une réponse immunologique efficace chez l'hôte. La dose peut être déterminée par des essais de routine, en s'inspirant en particulier des enseignements fournis par le BEXSERO™, qui contient les polypeptides fHbp, NHBA et NadA, chacun à raison de 100 µg/ml. Par conséquent, les polypeptides fHbp, NHBA et/ou NadA peuvent chacun être présents dans une composition selon l'invention à une concentration entre 20 et 400 µg/ml, p. ex. entre 50 et 150 µg/ml, entre 80 et 120 µg/ml, ou d'environ 100 µg/ml. Les concentrations d'antigènes sont faciles à quantifier par des dosages protéiques standards.

De manière similaire, les OMV dans les compositions selon l'invention peuvent être présentes à toute concentration

capable de susciter une réponse immunologique efficace chez l'hôte. La dose peut être déterminée par des essais de routine, en s'inspirant en particulier des enseignements fournis par le BEXSERO™, qui contient des OMV à raison de 5 50 µg/ml. Par conséquent, selon le premier mode de réalisation de l'invention, les OMV peuvent être présentes dans une composition à une concentration entre 20 et 100 µg/ml, p. ex. entre 30 et 75 µg/ml, entre 40 et 60 µg/ml, ou dans l'idéal, d'environ 50 µg/ml. Dans le second mode de réalisation de 10 l'invention, toutefois, les OMV sont présentes à une plus basse concentration, à savoir entre 5 et 30 µg/ml, p. ex. entre 10 et 15 µg/ml, ou dans l'idéal d'environ 12,5 µg/ml. Dans certains modes de réalisation, les OMV sont présentes à des concentrations plus basses, entre 2,5 et 12,5 µg/ml, par 15 exemple de 2,5 µg/ml, 3,0 µg/ml, 3,5 µg/ml, 4,0 µg/ml, 4,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 5,5 µg/ml, 6,0 µg/ml, 6,5 µg/ml, 7,0 µg/ml, 7,5 µg/ml, 8,0 µg/ml, 8,5 µg/ml, 9,0 µg/ml, 9,5 µg/ml et 10 µg/ml.

Les quantités et les concentrations d'OMV dans les 20 compositions selon l'invention se définissent de la même manière que dans le BEXSERO™, à savoir en fonction de la protéine totale. Celle-ci peut être évaluée à l'aide de divers dosages, p. ex. réf. 29 décrit l'utilisation du dosage de Folin-Lowry. La protéine totale peut être dosée selon la 25 European Pharmacopoeia, Ph. Eur. Assay 2.5.33, à l'aide de l'une quelconque des sept méthodes proposées par la pharmacopée. La méthode 2 propose le test de Lowry, qui est préféré. Par conséquent, une composition selon le second mode de réalisation de l'invention contient des OMV représentant 30 une protéine totale de 5 à 30 µg/ml.

Polypeptides

Les polypeptides selon l'invention peuvent être préparés par divers moyens, p. ex. par synthèse chimique (au moins en 35 partie), digestion de polypeptides plus longs à l'aide de protéases, traduction à partir d'ARN, purification à partir d'une culture cellulaire (p. ex. à partir d'une expression

recombinée ou d'une culture de *N. meningitidis*), etc. L'expression hétérologue chez un hôte *E. coli* est une voie d'expression préférée.

Dans l'idéal, les polypeptides selon l'invention ont une longueur d'au moins 100 acides aminés, p. ex. 150aa, 175aa, 200aa, 225aa, ou plus. Par exemple, un polypeptide de fusion fHbp aura généralement une longueur d'au moins 500aa, un polypeptide NHBA aura généralement une longueur d'au moins 400aa, et un polypeptide NadA aura généralement une longueur d'au moins 250aa.

Les polypeptides sont de préférence préparés sous une forme sensiblement pure ou sensiblement isolée (à savoir sensiblement exempte de tout autre polypeptide neisserien ou polypeptide issu de la cellule hôte). En général, les polypeptides sont fournis dans un environnement non naturel, p. ex. ils sont séparés de leur environnement naturel. Dans certains modes de réalisation, le polypeptide est présent dans une composition qui est enrichie pour le polypeptide comparativement au matériau de départ. Par conséquent, un polypeptide purifié est fourni, "purifié" signifiant que le polypeptide est présent dans une composition qui est sensiblement exempte d'autres polypeptides exprimés, "sensiblement exempte" signifiant que plus de 50 % (p. ex. ≥75 %, ≥80 %, ≥90 %, ≥95 %, ou ≥99 %) du polypeptide total dans la composition est un polypeptide selon l'invention.

Les polypeptides peuvent prendre diverses formes (p. ex. natives, fusions, non glycosylées, lipidées, ponts disulfure, etc.).

Des séquences telles que SEQ ID NO : 19 ne contiennent pas de méthionine N-terminale. Si un polypeptide selon l'invention est obtenu par traduction chez un hôte biologique, alors un codon de départ est requis, qui fournira une méthionine N-terminale chez la plupart des hôtes. Par conséquent, un polypeptide selon l'invention comprendra, au moins à un stade naissant, un résidu méthionine en amont de ladite séquence SEQ ID No.

Dans certains modes de réalisation, un polypeptide dans une composition selon l'invention peut comprendre une séquence N-terminale en amont (comme approprié) de la séquence du polypeptide fHbp, NHBA ou NadA. Dans certains modes de 5 réalisation, le polypeptide comporte une méthionine unique à l'extrémité N-terminale immédiatement suivie de la séquence d'acides aminés de l'immunogène pertinent ; dans d'autres, une séquence amont plus longue peut être utilisée. Cette séquence amont peut être courte (p. ex. 40 acides aminés ou moins, à 10 savoir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). A titre d'exemples, il y a les séquences de tête (« leader ») qui dirigent le transport des protéines, ou les séquences peptidiques courtes qui facilitent 15 le clonage ou la purification (p. ex. une étiquette histidine, à savoir His_n où n = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus (SEQ ID NO : 44)).

Un polypeptide selon l'invention peut également comprendre des acides aminés en aval de l'acide aminé final de 20 la séquence d'acides aminés du fHbp, NHBA ou NadA (comme approprié). Ces extensions C-terminales peuvent être courtes (p. ex. 40 acides aminés ou moins, à savoir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). A titre d'exemples, il y a les séquences qui dirigent le transport des protéines, les séquences peptidiques courtes qui facilitent le clonage ou la purification (p. ex. une étiquette histidine, à savoir His_n où n = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou plus (SEQ ID NO : 44)) ou les séquences qui 30 améliorent la stabilité du polypeptide. D'autres séquences d'acides aminés C-terminales convenables s'imposeront à l'homme du métier.

Le terme "polypeptide" désigne des polymères de type acides aminés de longueur quelconque. Le polymère peut être 35 linéaire ou ramifié, il peut comprendre des acides aminés modifiés, et il peut être interrompu par des acides non aminés. Le terme englobe également un polymère de type acides

aminés qui a été modifié naturellement ou suite à une intervention : par exemple, formation de liaisons disulfure, glycosylation, lipidation, acétylation, phosphorylation, ou toute autre manipulation ou modification, telle que la conjugaison avec un composant de marquage. Sont également inclus dans la définition les polypeptides contenant par exemple un ou plusieurs analogues d'un acide aminé (y compris, par exemple, les acides aminés non naturels, etc.), ainsi que d'autres modifications connues dans l'état de la technique.

10 Les polypeptides peuvent se présenter sous forme de chaînes simples ou de chaînes associées.

Les polypeptides selon l'invention sont de préférence exprimés par des moyens recombinants chez un hôte hétérologue (par exemple, chez *E. coli*), puis purifiés, et combinés et formulés avec des OMV pour donner une composition selon l'invention.

Dans certains modes de réalisation, un polypeptide comprend une séquence d'acides aminés telle que décrite ci-dessus, à ceci près que jusqu'à 10 acides aminés (à savoir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) à l'extrémité N-terminale et/ou jusqu'à 10 acides aminés (à savoir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) à l'extrémité C-terminale sont délétés.

RÈponses bactéricides

25 Comme mentionné ci-dessus, les polypeptides et les compositions préférés selon l'invention peuvent susciter des réponses en anticorps qui sont bactéricides envers les méningocoques. Les réponses en anticorps bactéricides sont commodément mesurées après immunisation de souris et sont un indicateur standard de l'efficacité du vaccin (voir p. ex. note de bas de page 14 de réf. 52 ; également réf. 53). Par conséquent, les anticorps seront bactéricides envers une souche d'essai dans un dosage de l'activité bactéricide sérieuse convenable (SBA).

35 Un polypeptide de fusion fHbp peut de préférence susciter une réponse en anticorps qui est bactéricide envers une souche méningococcique qui exprime un fHbp v1, une souche

méningococcique qui exprime un fHbp v2, et également une souche méningococcique qui exprime un fHbp v3. Une souche v1 convenable pour un test SBA est MC58, qui est largement disponible (p. ex. ATCC BAA-335) et était la souche séquencée 5 dans référence 23. Une souche v2 convenable pour un test SBA est M2091 (ATCC 13091). Une souche v3 convenable pour un test SBA est M01-240355, qui est une souche de référence MLSt de *Neisseria* (id 19265 dans réf. 54) qui a été entièrement séquencée (voir EMBL ID CP002422 [55]).

10 Par conséquent, les polypeptides de fusion fHbp préférés peuvent susciter la production d'anticorps chez une souris qui sont bactéricides envers chacune des souches MC58, M2091, et M01-240355 dans un dosage de l'activité bactéricide sérique. Par exemple, une composition selon l'invention peut fournir un 15 titre bactéricide sérique $\geq 1:4$ par le dosage de Goldschneider avec comme source de complément du serum humain [56,58], et/ou fournir un titre bactéricide sérique $\geq 1:128$ avec comme source de complément du serum de bébé lapin.

20 Immunisation

Les polypeptides décrits ci-dessus peuvent être utilisés à titre de principe(s) actif(s) dans des compositions immunogènes, et par conséquent l'invention concerne une composition immunogène (p. ex. un vaccin) comprenant les 25 polypeptides décrits ci-dessus.

L'invention concerne également une méthode destinée à susciter une réponse en anticorps chez un mammifère, tel qu'une souris ou un sujet humain, comprenant l'administration d'une composition immunogène selon l'invention audit 30 mammifère. De préférence, la réponse en anticorps est une réponse en anticorps protecteurs et/ou bactéricides. L'invention concerne également des compositions selon l'invention pouvant être utilisées dans ces méthodes.

35 L'invention concerne également une méthode destinée à protéger un mammifère, tel qu'une souris ou un sujet humain, contre une infection à *Neisseria* (p. ex. méningococcique)

comprenant l'administration audit mammifère d'une composition immunogène selon l'invention.

L'invention concerne des compositions utilisables à titre de médicaments (p. ex. sous forme de compositions immunogènes ou de vaccins). Dans un mode de réalisation, elle concerne également l'utilisation d'un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, et un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) des vésicules de membrane externe de méningocoques, dans la fabrication d'un médicament destiné à prévenir l'infection à *Neisseria* (p. ex. méningococcique) chez un mammifère. Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne l'utilisation de vésicules de membrane externe de méningocoques et d'un ou de plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, dans la fabrication d'un médicament destiné à prévenir l'infection à *Neisseria* (p. ex. méningococcique) chez un mammifère, dans lequel la concentration de vésicules de membrane externe dans le médicament est entre 5 et 30 µg/ml.

Le mammifère est de préférence un sujet humain. Le sujet humain peut être un adulte ou, de préférence, un enfant. Quand le vaccin est à usage prophylactique, le sujet humain est de préférence un enfant (p. ex. un tout petit ou un nourrisson) ; quand le vaccin est à usage thérapeutique, le sujet humain est de préférence un adulte. Un vaccin destiné à des enfants peut également être administré à des adultes, p. ex. pour évaluer son innocuité, son dosage, son immunogénicité, etc.

Les utilisations et les méthodes sont particulièrement utiles pour prévenir/traiter des maladies comprenant, entre autres, la méningite (en particulier la méningite bactérienne, telle que la méningite à méningocoques) et la bactériémie. Par exemple, elles se prêtent à une immunisation active des individus contre une maladie à méningocoques invasive provoquée par *N. meningitidis* (par exemple de sérogroupe B).

L'efficacité du traitement thérapeutique peut être testée en surveillant l'infection à *Neisseria* après administration de la composition selon l'invention. L'efficacité du traitement prophylactique peut être testée en surveillant les réponses immunitaires dirigées contre fHbp, NHBA, NadA et PorA (comme approprié) après administration de la composition. L'immunogénicité des compositions selon l'invention peut être déterminée par administration desdites compositions à des sujets d'essai (p. ex. enfants de 12 à 16 mois, ou modèles animaux), puis détermination des paramètres standards comprenant les anticorps sériques bactéricides (SBA) et les titres ELISA (GMT). De manière générale, ces réponses immunitaires seront déterminées environ 4 semaines après l'administration de la composition, et comparées aux valeurs déterminées avant administration de la composition. Un accroissement d'au moins 4 à 8 fois des SBA est préféré. Quand plus d'une dose de la composition est administrée, plus d'une détermination post-administration peut être pratiquée.

Les compositions préférées selon l'invention peuvent conférer un titre d'anticorps à un patient qui est supérieur au critère de séroprotection de chaque composant antigénique chez un pourcentage acceptable de sujets humains. Les antigènes associés à un titre d'anticorps au-dessus duquel un hôte est considéré comme séroconverti contre l'antigène sont bien connus, et ces titres sont publiés par des organisations telles que l'OMS. De préférence, plus de 80 % d'un échantillon statistiquement significatif de sujets est séroconverti, plus préférablement plus de 90 %, mieux encore plus de 93 % et de manière préférée entre toutes de 96 à 100 %.

L'invention peut être utilisée pour conférer une immunité systémique et/ou muqueuse.

De manière générale, les compositions selon l'invention seront administrées directement au patient. L'administration directe peut être effectuée par injection parentérale (p. ex. sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, ou dans l'espace interstitiel d'un tissu), ou par voie rectale, orale, vaginale, topique, transdermique,

intranasale, oculaire, auriculaire, pulmonaire ou autre administration par voie muqueuse. L'administration intramusculaire dans la cuisse ou le haut du bras est préférée. L'injection peut se faire par l'intermédiaire d'une 5 aiguille (p. ex. une aiguille hypodermique), mais une injection sans aiguille peut être pratiquée en variante. Une dose intramusculaire typique est d'environ 0,5 ml (p. ex. comme observé dans le BEXSERO™).

La posologie peut être un schéma unidose ou multidose. 10 Les multidoses peuvent être utilisées dans un schéma de primo-vaccination et/ou un schéma de doses de rappel. Un schéma de primovaccination peut être suivi d'un schéma de doses de rappel. L'intervalle de temps convenable entre les doses de primovaccination (p. ex. entre 4 et 16 semaines), et entre la 15 primovaccination et le(s) rappel(s) peut être déterminé à chaque fois. Par exemple, le BEXSERO™ est administré en deux ou trois doses à des intervalles d'au moins 1 mois ou d'au moins 2 mois, en fonction du sujet (p. ex. nourrissons ou autres).

20 La composition immunogène selon l'invention contiendra généralement un véhicule pharmaceutiquement acceptable, qui peut être toute substance qui n'induit pas elle-même la production d'anticorps nocifs pour le patient recevant la composition, et qui peut être administrée sans toxicité indue.

25 Les véhicules pharmaceutiquement acceptables peuvent comprendre les liquides tels que l'eau, le sérum physiologique, le glycérol et l'éthanol. Des substances auxiliaires, telles que des agents de mouillage ou émulsifiants, des substances de tamponnage de pH, et autres, 30 peuvent également être présentes dans ces véhicules. Une discussion approfondie concernant les véhicules convenables figure dans réf. 59. Par exemple, le BEXSERO™ contient du chlorure de sodium, de l'histidine, du saccharose, de l'hydroxyde d'aluminium, et de l'eau pour préparations 35 injectables.

Les infections à *Neisseria* affectent diverses parties du corps, de sorte que les compositions selon l'invention peuvent

être préparées sous diverses formes. Par exemple, les compositions peuvent être préparées sous forme de préparations injectables, de type soit solution liquide, soit suspension. Des formes solides pour une mise en solution ou une mise en suspension dans des véhicules liquides avant injection peuvent également être préparées. Les compositions se prêtant à une injection par voie parentérale (p. ex. dans le muscle) sont préférées entre toutes.

La composition est de préférence stérile. Elle est de préférence apyrogène. Elle est de préférence tamponnée, p. ex. à un pH entre pH 6 et pH 8, généralement autour de pH 7. Quand une composition comprend un sel d'hydroxyde d'aluminium, il est préférable d'utiliser un tampon histidine [60]. Les compositions selon l'invention peuvent être isotoniques vis-à-vis des sujets humains.

Les compositions immunogènes comprennent une quantité immunologiquement efficace de l'immunogène, ainsi que de tout autre composant spécifié, comme nécessaire. Par "quantité immunologiquement efficace", on entend que l'administration de cette quantité à un individu, soit sous forme d'une unidose, soit dans le cadre d'une série, est efficace à des fins de traitement ou de prévention. Cette quantité varie en fonction de la santé et de la condition physique de l'individu à traiter, de son âge, du groupe taxonomique auquel appartient l'individu à traiter (p. ex. primate non humain, primate, etc.), de la capacité du système immunitaire de l'individu à synthétiser des anticorps, du degré de protection recherché, de la formulation du vaccin, de l'avis du médecin traitant sur le cas médical, et autres facteurs pertinents. Cette quantité devrait s'inscrire dans une plage relativement large qui peut être déterminée par des essais réguliers. Le traitement posologique peut être un schéma à une seule dose ou à multidose (comprenant p. ex. des doses de rappel). La composition peut être administrée conjointement à d'autres agents immunorégulateurs.

Les adjuvants qui peuvent être utilisés dans les compositions selon l'invention comprennent, entre autres, les

sels métalliques insolubles, les émulsions huile dans l'eau (p. ex. MF59 ou AS03, contenant toutes les deux du squalène), les saponines, les dérivés non toxiques du LPS (tels que le lipide A monophosphorylé ou le MPL 3-O-désacylé), les 5 oligonucléotides immunostimulateurs, les toxines bactériennes détoxifiées ADP-ribosylantes, les microparticules, les liposomes, les imidazoquinolones, ou leurs mélanges. D'autres substances capables d'agir comme des agents immunostimulateurs sont décrites dans le chapitre 7 de réf. 61.

10 L'utilisation d'un adjuvant de type hydroxyde d'aluminium et/ou phosphate d'aluminium est particulièrement préférée, et les polypeptides sont généralement adsorbés sur ces sels. Ces sels comprennent les oxyhydroxydes et les hydroxyphosphates (voir p. ex. les chapitres 8 & 9 de réf. 61). Les sels peuvent prendre toute forme convenable (p. ex. gel, forme cristalline, amorphe, etc.). Al⁺⁺⁺ devrait être présent à <1 mg/dose.

15 L'adjuvant préféré entre tous est l'hydroxyde d'aluminium, tel qu'il est utilisé dans le BEXSERO™. Les polypeptides et les OMV dans une composition selon l'invention 20 peuvent être adsorbés sur cet adjuvant, comme dans le BEXSERO™. L'hydroxyde d'aluminium peut être incorporé à raison d'environ 1 mg/ml d'Al⁺⁺⁺ (à savoir 0,5 mg par dose de 0,5 ml).

Autres composants antigéniques

25 Une composition selon l'invention peut comprendre d'autres immunogènes polypeptidiques de méningocoques en plus de fHbp, NHBA, NadA et/ou des OMV. Par exemple, elle peut comprendre un ou plusieurs des suivants : NspA, App, NhhA, HmbR, etc.

30 Une composition selon l'invention peut également comprendre un antigène "936". L'antigène 936 a été inclus dans la séquence du génome publiée de la souche méningococcique de sérogroupe B MC58 [23] sous forme de gène NMB2091 (SEQ ID NO : 20 dans la présente). Les antigènes 936 préférés pour une 35 utilisation dont fait l'invention comprennent une séquence d'acides aminés : (a) présentant une identité de 50 % ou plus (p. ex. 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %,

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 21 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins "n" acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 21, où "n" vaut 7 ou plus (p. ex. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 5 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope provenant de SEQ ID NO : 21. Les antigènes 936 les plus utiles selon l'invention peuvent susciter la production d'anticorps qui, après administration à un hôte mammifère, peuvent se lier à un 10 polypeptide méningococcique constitué par la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 20. L'antigène 936 est un bon partenaire de fusion pour fHbp (voir p. ex. références 62 & 63).

En plus des antigènes polypeptidiques méningococciques, la composition peut comprendre des antigènes pour immuniser 15 contre d'autres maladies ou infections. Par exemple, la composition peut comprendre un ou plusieurs des autres antigènes suivants :

- un antigène saccharidique de *N. meningitidis* sérogroupe A, C, W135 et/ou Y, tel que le saccharide décrit dans réf. 64 20 de sérogroupe C (voir également réf. 65) ou dans réf. 66.
- un antigène saccharidique de *Streptococcus pneumoniae* [p. ex. 67, 68, 69].
- un antigène du virus de l'hépatite A, tel qu'un virus inactivé [p. ex. 70, 71].
- 25 - un antigène du virus de l'hépatite B, tel que des antigènes de surface et/ou de cœur [p. ex. 71, 72].
- un antigène diphtérique, tel que l'anatoxine diphtérique [p. ex. chapitre 3 de réf. 73] p. ex. le mutant CRM₁₉₇ [p. ex. 74].
- 30 - un antigène tétanique, tel que l'anatoxine tétanique (p. ex. chapitre 4 de réf. 73).
- un antigène de *Bordetella pertussis*, tel que l'holotoxine pertussique (PT) et l'hémagglutinique filamentuse (FHA) de *B. pertussis*, éventuellement également en combinaison avec 35 la pertactine et/ou les agglutinogènes 2 et 3 (p. ex. réf. 75 & 76).

- un antigène saccharidique d'*Haemophilus influenzae* B [p. ex. 65].
- un ou des antigènes polio [p. ex. 77, 78] tels que l'IPV.
- des antigènes des virus de la rougeole, des oreillons et/ou 5 de la rubéole (p. ex. chapitres 9, 10 & 11 de réf. 73).
- un ou des antigènes du virus influenza (p. ex. chapitre 19 de réf. 73), tels que l'hémagglutinine et/ou les protéines de surface de type neuraminidase.
- un antigène de *Moraxella catarrhalis* [p. ex. 79].
- 10 - un antigène protéique de *Streptococcus agalactiae* (streptocoque de groupe B) [p. ex. 80, 81].
- un antigène saccharidique de *Streptococcus agalactiae* (streptocoque de groupe B).
- un antigène de *Streptococcus pyogenes* (streptocoque de 15 groupe A) [p. ex. 81, 82, 83].
- un antigène de *Staphylococcus aureus* [p. ex. 84].

La composition peut comprendre un ou plusieurs de ces autres antigènes.

20 Les antigènes protéiques toxiques peuvent être détoxifiés si nécessaire (p. ex. détoxification de la toxine pertussique par des moyens chimiques et/ou génétiques [76]).

Quand un antigène diphtérique est incorporé dans la composition, il est préférable d'inclure également des 25 antigènes tétaniques et pertussiques. De manière similaire, quand un antigène tétanique est incorporé, il est préférable d'inclure également des antigènes diphtériques et pertussiques. De manière similaire, quand un antigène pertussique est incorporé, il est préférable d'inclure 30 également des antigènes diphtériques et tétaniques. Les combinaisons DTP sont par conséquent préférées.

Les antigènes saccharidiques sont de préférence sous la forme de conjugués. Les protéines porteuses pour les conjugués sont décrites plus en détails ci-dessous.

35 Les antigènes dans la composition seront typiquement présents à une concentration d'au moins 1 µg/ml chacun. En général, la concentration de tout antigène donné sera

suffisante pour susciter une réponse immunitaire contre cet antigène.

Les compositions immunogènes selon l'invention peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques (p. ex. pour traiter 5 une infection existante) ou prophylactiques (p. ex. pour prévenir une infection future).

Comme alternative à l'utilisation d'antigènes protéiques dans les compositions immunogènes selon l'invention, un acide nucléique (qui pourrait être l'ARN, tel qu'un ARN à auto-10 réPLICATION, ou l'ADN, tel qu'un plasmide) codant pour l'antigène peut être utilisé.

Dans certains modes de réalisation, une composition selon l'invention comprend des antigènes de saccharides capsulaires conjugués provenant de 1, 2, 3 ou 4 des sérogroupes A, C, W135 15 et Y de méningocoques. Dans d'autres modes de réalisation, une composition selon l'invention comprend au moins un antigène de saccharide capsulaire pneumococcique conjugué.

Méningocoques de sérogroupes Y, W135, C et A

20 Les actuels vaccins contre le méningocoque de sérogroupe C (MENJUGATE™ [64,85], MENINGITEC™ et NEISVAC-C™) comprennent des saccharides conjugués. MENJUGATE™ et MENINGITEC™ contiennent des antigènes oligosaccharidiques conjugués à une protéine porteuse CRM₁₉₇, tandis que NEISVAC-C™ utilise le 25 polysaccharide complet (dés-O-acétylé) conjugué à une protéine porteuse de type anatoxine tétanique. Le vaccin MENACTRA™ contient des antigènes de saccharides capsulaires conjugués provenant de chacun des sérogroupes Y, W135, C et A.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir des 30 antigènes saccharidiques capsulaires provenant d'un ou de plusieurs des sérogroupes Y, W135, C et A du méningocoque, dans lesquelles les antigènes sont conjugués à une ou plusieurs protéines porteuses et/ou sont des oligosaccharides. Par exemple, la composition peut contenir un antigène 35 saccharidique capsulaire provenant du : sérogroupe C ; sérogroupes A et C ; sérogroupes A, C et W135 ; sérogroupes A,

C et Y ; sérogroupes C, W135 et Y ; ou provenant des quatre sérogroupes A, C, W135 et Y.

Une quantité typique de chaque antigène saccharidique méningococcique par dose est entre 1 et 20 µg, p. ex. environ 5 1 µg, environ 2,5 µg, environ 4 µg, environ 5 µg, ou environ 10 µg (exprimés en termes de saccharide).

Quand un mélange comprend des saccharides capsulaires provenant des deux sérogroupes A et C, le rapport (p/p) saccharide MenA:saccharide MenC peut être supérieur à 1 (p. ex. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou plus). Quand un mélange comprend des saccharides capsulaires provenant du sérogroupe Y et d'un ou des deux sérogroupes C et W135, le rapport (p/p) saccharide MenY:saccharide MenW135 peut être supérieur à 1 (p. ex. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 ou plus) et/ou le rapport (p/p) saccharide MenY:saccharide MenC peut être inférieur à 1 (p. ex. 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, ou moins). Les rapport (p/p) préférés pour les saccharides provenant des sérogroupes A:C:W135:Y sont : 1:1:1:1 ; 1:1:1:2 ; 2:1:1:1 ; 4:2:1:1 ; 8:4:2:1 ; 4:2:1:2 ; 8:4:1:2 ; 4:2:2:1 ; 2:2:1:1 ; 4:4:2:1 ; 2:2:1:2 ; 4:4:1:2 ; et 2:2:2:1. Les rapport (p/p) préférés pour les saccharides provenant des sérogroupes C:W135:Y sont : 1:1:1 ; 1:1:2 ; 1:1:1 ; 2:1:1 ; 4:2:1 ; 2:1:2 ; 4:1:2 ; 2:2:1 ; et 2:1:1. L'utilisation d'un poids essentiellement égal de chaque saccharide est préférée.

Les saccharides capsulaires peuvent être utilisés sous la forme d'oligosaccharides. Ceux-ci sont commodément formés par fragmentation du polysaccharide capsulaire purifié (p. ex. par hydrolyse), normalement suivie par la purification des fragments ayant la taille recherchée.

La fragmentation des polysaccharides est de préférence réalisée pour obtenir un degré moyen final de polymérisation (DP) dans l'oligosaccharide inférieur à 30 (p. ex. entre 10 et 20, de préférence d'environ 10 pour le sérogroupe A ; entre 15 et 25 pour les sérogroupes W135 et Y, de préférence d'environ 15-20 ; entre 12 et 22 pour le sérogroupe C ; etc.). Le DP peut être commodément mesuré par une chromatographie d'échange d'ions ou par des dosages colorimétriques [86].

Si une hydrolyse est effectuée, l'hydrolysat sera généralement dimensionné afin d'éliminer les oligosaccharides de courte longueur [65]. Ceci peut être effectué de diverses façons, comme par une ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'échange d'ions. Les oligosaccharides ayant un degré de polymérisation inférieur ou égal à environ 6 sont de préférence éliminés du sérogroupe A, et ceux ayant un degré de polymérisation inférieur à environ 4 sont de préférence éliminés des sérogroupes W135 et Y.

Les antigènes saccharidiques MenC préférés, utilisés dans MENJUGATE™, sont décrits dans la référence 85.

Conjugaison covalente

De manière générale, les saccharides capsulaires dans les compositions selon l'invention seront conjugués à des protéines porteuses. En général, la conjugaison améliore l'immunogénicité des saccharides dans la mesure où elle les convertit d'antigènes T-indépendants en antigènes T-dépendants, permettant ainsi l'amorçage d'une mémoire immunologique. La conjugaison est particulièrement utile pour les vaccins pédiatriques et est une technique très connue.

Les protéines porteuses typiques sont des toxines bactériennes, telles que les toxines diphtériques ou tétaniques, ou les anatoxines ou mutants de celles-ci. Le mutant toxine diphtérique CRM₁₉₇ [87] est utile, and est la protéine porteuse du PREVNAR™. D'autres protéines porteuses convenables comprennent le complexe protéique de membrane externe de *N. meningitidis* [88], les peptides synthétiques [89,90], les protéines de choc thermique [91,92], les protéines pertussiques [93,94], les cytokines [95], les lymphokines [95], les hormones [95], les facteurs de croissance [95], les protéines artificielles comprenant de multiples épitopes T CD4⁺ humains provenant de divers antigènes dérivés de pathogènes [96] tels que N19 [97], la protéine D de *H. influenzae* [98,100], la pneumolysine [101] ou ses dérivés non toxiques [102], la protéine de surface pneumococcique PspA [103], les protéines absorbant le fer

[104], la toxine A ou B de *C. difficile* [105], l'exoprotéine recombinée A de *P. aeruginosa* (rEPA) [106], etc.

Toute réaction de conjugaison convenable peut être utilisée, avec tout lieuur (« linker ») convenable, là où c'est nécessaire.

Le saccharide sera typiquement activé ou fonctionnalisé avant conjugaison. L'activation peut impliquer, par exemple, des réactifs de cyanylation tels que CDAP (p. ex. tétrafluoroborate de 1-cyano-4-diméthylamino-pyridinium [107, 108, etc.]). D'autres techniques convenables utilisent des carbodiimides, des hydrazides, des esters actifs, du norborane, de l'acide p-nitrobenzoïque, du N-hydroxy-succinimide, S-NHS, EDC, TSTU, etc.

Les liaisons par l'intermédiaire d'un groupe lieuur (« linker ») peuvent être formées à l'aide de toute procédure connue, par exemple, les procédures décrites dans les références 109 et 110. Un type de liaison implique l'amination réductrice du polysaccharide, le couplage du groupe amino obtenu à une extrémité du groupe lieuur (« linker ») acide adipique, puis le couplage d'une protéine à l'autre extrémité du groupe lieuur (« linker ») acide adipique [111,112]. D'autres lieurs (« linker ») comprennent le B-propionamido [113], la nitrophényl-éthylamine [114], les halogénures halogénoacyle [115], les liaisons glycosidiques [116], l'acide 6-aminocaproïque [117], l'ADH [118], les fragments C₄ à C₁₂ [119], etc. Comme alternative à l'utilisation d'un lieuur (« linker »), la liaison directe peut être utilisée. Les liaisons directes à la protéine peuvent comprendre l'oxydation du polysaccharide, suivie de l'amination réductrice avec la protéine, comme décrit, par exemple, dans les références 120 et 121.

Un procédé impliquant l'introduction de groupes amino dans le saccharide (p. ex. par remplacement des groupes =O terminaux par -NH₂), suivie de la formation de dérivés avec un diester adipique (p. ex. N-hydroxysuccinimidodiester d'acide adipique) et réaction avec la protéine porteuse est préféré.

Une autre réaction préférée utilise l'activation de CDAP à l'aide d'une protéine porteuse D, p. ex. pour MenA ou MenC.

GÈnÈralitÈs

5 Le terme "comprenant" englobe "contenant" ainsi que "constitué par", p. ex. une composition "comprenant" X peut être exclusivement constituée par X ou peut contenir quelquechose d'autre, p. ex. X + Y. Les références à "comprenant" (ou "comprend", etc.) peuvent éventuellement être 10 remplacées par des références à "constitué par" (ou "constitué de", etc.).

Le terme "environ" en relation avec une valeur numérique x est facultatif et désigne, par exemple, $x \pm 10\%$.

15 Le terme "sensiblement" n'exclut pas "complètement", p. ex. une composition qui est "sensiblement exempte" de Y peut être complètement exempte de Y. Là où c'est nécessaire, le terme "sensiblement" peut être omis de la définition de l'invention.

20 "L'identité de séquence" est de préférence déterminée par l'algorithme d'alignement global de Needleman-Wunsch [122], en utilisant les paramètres par défaut (p. ex. avec une pénalité d'ouverture de gap = 10.0, et une pénalité d'extension de gap = 0.5, en utilisant la matrice de notation EBLOSUM62). Cet algorithme est facile à mettre en œuvre avec l'outil *needle* du 25 logiciel EMBOSS [123]. Quand l'application fait référence à une identité de séquence avec une SEQ ID particulière, l'identité doit être calculée sur toute la longueur de cette SEQ ID.

30 Après le sérogroupe, la classification des méningocoques inclut le sérotype, le séro-sous-type, puis l'immunotype, et la nomenclature standard liste le sérogroupe, le sérotype, le séro-sous-type, et l'immunotype, chacun séparé par un deux-points, p. ex. B:4:P1.15:L3,7,9. Au sein du sérogroupe B, certaines lignées provoquent la maladie souvent 35 (hyperinvasives), certaines lignées provoquent des formes plus sévères de la maladie que d'autres (hypervirulentes), et d'autres provoquent rarement la maladie. Sept lignées

hypervirulentes sont reconnues, à savoir les sous-groupes I, III et IV-1, le complexe ET-5, le complexe ET-37, le cluster A4 et la lignée 3. Elles ont été définies par électrophorèse multilocus des enzymes (MLEE), mais le typage multilocus des 5 séquences (MLST) a également été utilisé pour classifier les méningocoques. Les quatre principaux clusters hypervirulents sont les complexes ST32, ST44, ST8 et ST11.

EXEMPLES

10 **Exemple 1 :** le vaccin BEXSERO[®] (# titre de référence)

Le BEXSERO[™] est sans danger et efficace et a été autorisé pour un usage humain en Europe et ailleurs. Il contient les éléments immunogènes suivants par dose de 0,5 ml :

Immunogène	Quantité	Notes
fHbp	50 µg	Polypeptide de fusion avec NMB2091 # l'extrémité N-terminale
NHBA	50 µg	Polypeptide de fusion avec NMB1030 # l'extrémité C-terminale
NadA	50 µg	—
OMV	25 µg (protéine totale)	Souche NZ98/254 (B:4:P1.7-2,4, L1,3)

15 Ces immunogènes sont adsorbés sur un adjuvant de type hydroxyde d'aluminium (0,5 mg Al⁺⁺⁺ par dose). La composition contient également du NaCl, un tampon histidine, et du saccharose.

20 **Exemple 2 :** Polypeptides de fusion stabilisés et stabilisés non liants

Les inventeurs ont étudié deux types différents de mutations dans v2 et v3 : d'abord, ils ont identifié des résidus dans SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 qui peuvent être modifiés pour accroître la stabilité du polypeptide.

25 Deuxièmement, ils ont identifié des résidus qui réduisent la liaison au facteur H humain (fH). Les mutants polypeptidiques fHbp portant ces deux types de mutations ont des propriétés améliorées. Plus spécifiquement, les mutants fHbp qui ne lient

pas le facteur H mais qui conservent l'immunogénicité sont avantageux car les réponses en anticorps obtenues sont dirigées contre des épitopes sur ou à proximité du site de fixation du fH. Après vaccination avec des antigènes fHbp de type sauvage, ces épitopes peuvent être occultés par la liaison du facteur H. Les acides aminés présentant le plus d'intérêt, numérotés selon les séquences pleine longueur (SEQ ID NO : 1 & 3) et également selon les séquences ΔG (SEQ ID NO : 8 & 7) sont les suivants :

10

		Stabilité**	liant fH	
v2	SEQ ID NO : 1	Ser-58	Leu-149	Glu-266
	SEQ ID NO : 8	Ser-32	Leu-123	Glu-240
v3	SEQ ID NO : 3	Ser-63	Leu-157	Glu-274
	SEQ ID NO : 7	Ser-32	Leu-126	Glu-243

** Quand un seul de ces résidus est muté, la préférence va à la leucine

Les mutations concernant la stabilité et la liaison fHbp ont été combinées pour donner les formes mutantes v2 et v3 et fusionnées à une séquence v1 mutante portant la mutation R41S. Les mutants ont été fusionnés dans l'ordre v2-v3-v1 et joints les uns aux autres par des lieurs (« linker »), pour donner SNB 731 (SEQ ID NO : 38). Comparativement aux trois séquences de type sauvage, ce polypeptide de fusion inclut un total de 7 mutations ponctuelles (Figure 2).

Séparément, les mutations concernant la stabilité dans v2 et v3 ont été fusionnées avec la séquence du mutant v1 "R41S" dans l'ordre v2-v3-v1 et joints les uns aux autres par des lieurs (« linker »), pour donner 731 S (SEQ ID NO : 40). Par conséquent, comparativement aux trois séquences de type sauvage, ce polypeptide de fusion inclut un total de 5 mutations ponctuelles (Figure 2).

La capacité des formes ne liant pas fH du fHbp à susciter des titres SBA a été testée chez des souris transgéniques (Tg) :

Antigène	Titres rSBA obtenus contre des souches
-----------------	---

	prototypes		
	Var 1..1	Var 2.1.6	Var 3.42
Fusion fHbp SEQ ID NO : 10	1024*	4096	8192
Fusion fHbp SEQ ID NO : 38	16384	32768	>32768

Ces données indiquent que les formes non liantes de fHbp peuvent être plus immunogènes.

5 **Exemple 3 :** Substitution de la fusion NMB2091-fHbp

Le BEXSERO™ a été modifié par remplacement du polypeptide de fusion NMB2091-fHbp par un polypeptide "triple fusion" constitué par les variants fHbp, dans l'ordre v2-v3-v1 de l'extrémité N- à C-terminale. Ce polypeptide de fusion a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 10. De plus, le composant OMV a été omis. Les deux vaccins ont été comparés chez des souris immunisées les jours 0, 21 et 35, les sérums étant évalués les jours 34 et 49 contre un panel de 15 souches de sérogroupe B dans divers complexes clonaux, MLST, et classifications ET. Les antigènes ont été administrés à 20 µg/dose, avec l'adjuvant à 3 mg/ml.

Les proportions de souches présentant des titres SBA supérieurs à divers seuils étaient les suivantes :

Seuil	Vaccin original	Vaccin modifié
≥ 128	100 %	100 %
≥ 1024	93 %	80 %
> 4096	53 %	60 %

L'utilisation du polypeptide de fusion v2-v3-v1 peut par conséquent fournir une couverture contre une proportion plus élevée du panel (60 % contre 53 %), à un titre SBA anti-MenB élevé (>4096).

Exemple 4 : Réduction de 4 fois de la dose OMV

25 Le BEXSERO™ a été modifié par remplacement du polypeptide de fusion NMB2091-fHbp par le polypeptide fHbp "triple fusion"

v2-v3-v1 (SEQ ID NO : 10) mais également soit par
 (i) réduction de 4 fois de la dose OMV, à 12,5 µg/ml, soit par
 (ii) élimination du composant OMV. Trois compositions ont par conséquent été préparées :

5

Groupes	Immunogènes protéiques			OMV
M	NMB2091-fHbp	NHBA-NMB1030	NadA	50 µg/ml
C	fHbp-v2-v3-v1	NHBA-NMB1030	NadA	12,5 µg/ml
S	fHbp-v2-v3-v1	NHBA-NMB1030	NadA	-

Pour évaluer l'immunogénicité de ces trois vaccins, des sujets humains ont reçu trois doses à des intervalles de 1 mois (mois 0, 1, 2). Les sérums ont été prélevés aux mois 0, 1, 2 et 3, puis 6 mois après la troisième dose (mois 8), pour une évaluation contre un panel de souches pertinentes. Les titres (GMT) obtenus étaient les suivants :

	M	C	S
<i>Souche H44/76</i>			
Temps zéro	1,36	2,16	1,55
1 mois	30	52	15
2 mois	97	91	48
3 mois	102	99	59
8 mois	25	33	12
<i>Souche 5/99</i>			
Temps zéro	2,47	3,01	2,17
1 mois	70	75	56
2 mois	173	140	157
3 mois	237	236	365
8 mois	77	83	106
<i>Souche NZ98/254</i>			
Temps zéro	1,21	2,04	1,73
1 mois	9,45	29	3,19
2 mois	13	12	4,4
3 mois	16	24	6,49
8 mois	3,55	8,02	3,55
<i>Souche M14459</i>			
Temps zéro	1,86	2,48	2,16

2 mois	30	24	16
3 mois	34	31	19
<i>Souche UK364</i>			
Temps zéro	1,35	1,97	2,07
2 mois	37	72	70
3 mois	56	113	112

Des sérum de patients regroupés en pool ont été utilisés pour évaluer la couverture d'un panel de souches MenB qui expriment un fHbp v1. Un nombre similaire de souches a été couvert de manière adéquate dans chaque groupe, mais les titres (GMT) les plus élevés étaient dans le groupe C :

	M	C	S
Temps zéro	<10	<10	<10
3 mois	70	140	40
8 mois	15	50	10

Des sérum de patients individuels ont été testés contre un panel de 6 souches MenB qui expriment un fHbp v2 ou v3 (dont une souche testée deux fois). Là encore, les titres (GMT) les plus élevés étaient dans le groupe C :

	M	C	S
<i>Souche M14549 (v2)</i>			
Temps zéro	1,4	1,5	1,1
2 mois	3,8	15,0	6,2
3 mois	3,6	21,4	6,6
<i>Souche M12566 (v2)</i>			
Temps zéro	6,0	10,7	14,8
2 mois	40,4	80,0	60,1
3 mois	47,1	94,8	69,7
<i>Souche UK355 (v3)</i>			
Temps zéro	2,7	4,0	5,0
2 mois	22,1	43,7	38/4
3 mois	21,3	55,0	41,7
<i>Souche M1239 (v3)</i>			

Temps zéro	2,3	3,0	2,1
2 mois	5,0	15,7	5,9
3 mois	5,7	21,9	5,9
<i>Souche M1239 (v3)</i>			
Temps zéro	1,2	1,6	1,1
2 mois	5,9	18,4	2,8
8 mois	1,9	4,1	1,6
<i>Souche UK293 (v2)</i>			
Temps zéro	1,6	2,7	2,2
2 mois	9,2	52,0	7,0
8 mois	4,3	11,7	5,9
<i>Souche UK414 (v2)</i>			
Temps zéro	1,4	2,1	1,6
2 mois	5,1	22,6	8,3
8 mois	3,1	10,9	6,3

De plus, la proportion de sujets immunisés ayant un titre SBA supérieur à 1:8 était généralement plus élevée dans le groupe C comparativement aux groupes M et S, p. ex. 80 % ou 5 plus pour la souche M1239 après 3 doses contre 50 % ou moins dans les deux autres groupes.

Les courbes RCD (distribution cumulative inverse) des titres SBA ont également montré un meilleur profil, p. ex. la Figure 1 montre une courbe pour des sérum à 3 mois contre la 10 souche UK293, où le groupe C est nettement au-dessus des autres.

Des sérum de patients regroupés en pool ont été utilisés pour évaluer la couverture d'un panel de 26 souches MenB qui expriment un fHbp v2 ou v3. Là encore, les titres (GMT) les 15 plus élevés étaient dans le groupe C :

	M	C	S
3 mois	23	91	25
8 mois	7	43	9

Ces données montrent par conséquent que le vaccin "C", dans lequel l'immunogène fHbp a été remplacé et la dose d'OMV

a été réduite de 4 fois, n'est pas inférieur au BEXSERO™. En fait, les sérum des sujets individuels et regroupés en pool montrent tous deux de meilleurs taux de réponses sériques, des GMT plus élevés, et une couverture accrue contre les souches pour le vaccin "C", comparé au BEXSERO™.

Exemple 5 : Avidité des anticorps

L'avidité des anticorps chez les patients des groupes "C" et "S" a été comparée à l'aide d'un système opérant sous Gyrolab qui comprend une étape de lavage à l'aide d'un agent chaotrope pour détacher les anticorps de basse affinité de l'antigène, et obtenir "l'indice d'avidité" sous forme de pourcentage d'anticorps anti-v1.fHbp d'affinité élevée parmi les anticorps totaux spécifiques de v1.fHbp. Vingt sérum séparés ont été évalués 1 mois après la première dose et 1 mois après la troisième dose. De plus, les titres SBA ont été évalués contre la souche H44/76, et les corrélations entre indice d'avidité et titre SBA (\log_2) ont été déterminées.

Les résultats (corrération R et p de Pearson) étaient les suivants :

1 mois après-1		1 mois après-3	
R	p	R	p
C 0,693	0,001	0,4667	0,0381
S 0,3565	0,1229	0,101	0,6718

Il existait donc une corrération significative entre le titre SBA et l'indice d'avidité dans le groupe "C" à ces deux points temporels, mais pas dans le groupe "S". Chez les sujets ayant reçu le vaccin avec 12,5 µg/ml d'OMV, l'indice d'avidité se corrèle aux titres SBA, ce qui suggère que la présence d'OMV a un effet positif sur la qualité des anticorps induits. Dans l'ensemble, chez les sujets ayant reçu des OMV, la tendance est que les titres bactéricides sont plus élevés et qu'ils se corrèlent à l'avidité des anticorps induits par la formulation vaccinale.

Un sous-panel de souches var2/3 a été sélectionné pour l'étude des sérum de sujets individuels selon les critères suivants : (i) Souches non couvertes par Bexsero dans les essais cliniques précédents, (ii) Souches appartenant à des complexes clonaux pertinents, (iii) Souches exprimant des sous-variants fHbp épidémiologiquement pertinents, (iv) Niveau d'expression de fHbp moyen, (v) Souches spécifiquement détruites par 741-231 (principe hSBA compétitif). Les résultats sont illustrés sur les Figures 3(a) à 3(g) et démontrent que 741-231 + ¼ OMV+ alun suscite des titres GMT plus élevés contre les 7 souches testées. Par conséquent, la théorie hSBA indique que les formulations contenant la fusion 741-231 ne sont pas inférieures au Bexsero. En effet, l'analyse à la fois des sérum de sujets individuels et des sérum regroupés en pool sur les souches var2/3 montre de meilleurs taux de réponses sériques, des titres GMT plus élevés, et une couverture accrue contre ces souches pour la formulation contenant 741-231 + ¼ OMV + alun.

Exemple 6 : Réduction des doses OMV et utilisation de 731 "S" et 731 "SNB"

Le BEXSEROTM a été modifié par remplacement du polypeptide de fusion NMB2091-fHbp par des polypeptides fHbp v2-v3-v1 "triple fusion" stabilisés ou stabilisés et non liants (SEQ ID NO : 40 et 38, respectivement) mais également par réduction de la dose OMV à 10 ou 2,5 µg/ml :

Groupes	Immunogènes protéiques		OMV
1	NMB2091-fHbp	NHBA-NMB1030	NadA 10 µg/ml
2	fHbp-v2-v3-v1 SNB	NHBA-NMB1030	NadA 2,5 µg/ml
3	fHbp-v2-v3-v1 S	NHBA-NMB1030	NadA 2,5 µg/ml

Pour préparer des antisérum murins, 20 µg de NadA, NHBA-NMB1030 et soit NMB2091-fHbp, soit fHbp 231S ou fHbp 231SNB avec 10 ou 2,5 µg d'OMV dérivées de la souche NZ98/254 ont été utilisés pour immuniser des souris femelles CD1 de six semaines (Charles River). Huit souris par groupe ont été

utilisées. Les antigènes ont été administrés par voie intrapéritonéale avec de l'hydroxyde d'aluminium (3 mg/ml) les jours 0, 21 et 35. Les sérum ont été recueillis 2 semaines après le prélèvement final et thermo-inactivés pendant 30 min 5 à 56 °C avant analyse.

Dosage bactéricide sérique sur des sérum d'animaux avec source de complément humain

L'activité bactéricide sérique contre des souches Nm a 10 été évaluée comme décrit précédemment. Du sérum ou plasma humain provenant d'un adulte sain (sans activité bactéricide intrinsèque lors de tests à une concentration finale de 25 ou 50 %) a été utilisé comme source de complément. Les titres bactéricides sériques ont été définis comme la dilution sérique 15 provoquant une réduction de 50 % des unités formant colonies (CFU) par ml après une incubation de 60 min des bactéries avec le mélange réactionnel, par rapport aux CFU témoins par ml au temps 0.

La dilution la plus basse testée pour chaque sérum était 20 de 1:16 (limite de détection). Les titres au-dessous de la limite de détection ont été définis à la moitié de cette limite à des fins d'analyse et le seuil positif a été fixé à un accroissement de 4 fois cette valeur (à savoir, 32). Les sérum regroupés en pool dérivés des souris immunisées avec la 25 formulation Bexsero étaient sous le seuil positif pour 14 souches sur les 34 testées, tandis que les sérum regroupés en pool dérivés de la formulation de 2^{nde} génération étaient sous la limite de détection pour 1 seule souche dans le cas de la formulation vaccinale contenant fHbp 231SNB et pour 1 seule 30 souche dans le cas de la formulation contenant fHbp 231S.

Les données hSBA rapportées dans le tableau ci-dessous ont montré un accroissement de la couverture suscité par les formulations vaccinales contenant fHbp 231S ou fHbp 231SNB comparativement au Bexsero dans le panel des 34 souches 35 testées :

Souches MenB			Résultats hSBA avec différentes formulations		
	ID	Sous-variant fHbp	Bexsero	741-231 SNB + 961c + 287-953 + ¼ OMV	741-231 S + 961c + 287-953 + ¼ OMV
Souches de référence Bexsero	NVD000007	2,23	>8192	>8192	>8192
	NVD000005	2,16	2048	4096	2048
	NVD000023	3,31	4096	4096	8192
	NVD002240	2,553	32	512	128
	NVD000025	1,1	>8192	>8192	>8192
	NVD001491	1,180	1024	1024	512
	NVD000049	1,14	4096	4096	2048
Souches MenB portant fHbp var1	NVD001706	1,1	4096	4096	4096
	NVD001889	1,4	1024	2048	2048
	NVD001402	1,4	512	1024	1024
	NVD001908	1,13	512	1024	1024
	NVD001244	1,14	2048	2048	2048
	NVD003213	1,15	2048	1024	2048
	NVD001080	1,15	512	512	512
	NVD000185	1,15	512	512	512
	NVD000758	1,256	<16	64	<16
Souches MenB portant fHbp var2	NVD002368	2,16	64	1024	512
	NVD002500	2,16	<16	512	512
	NVD000926	2,16	8192	>8192	4096
	NVD002552	2,19	16	512	1024
	NVD001277	2,19	<16	1024	2048
	NVD001057	2,19	32	1024	512

Souches MenB portant fHbp var3	NVD001342	2,19	64	2048	1024
	NVD001391	2,19	<16	512	512
	NVD001288	2,21	<16	512	512
	NVD002690	2,24	<16	256	256
	NVD001287	2,24	16	128	256
	NVD000038	3,28	<16	64	64
	NVD000084	3,30	<16	1024	2048
	NVD003212	3,31	<16	512	256
	NVD003364	3,42	<16	2048	2048
	NVD002424	3,42	<16	1024	1024
	NVD003727	3,42	<16	<16	<16

On comprendra que l'invention n'est décrite ci-dessus que par le biais d'exemples et que des modifications peuvent être apportées tout en restant dans la portée et l'esprit de l'invention.

REFERENCES

- [1] Carter (2013) BioDrugs 27:263ñ74.
- [2] WO99/57280.
- [3] Massignani et al. (2003) J Exp Med 197:789ñ799.
- [4] Welsch et al. (2004) J Immunol 172:5605ñ15.
- [5] Hou et al. (2005) J Infect Dis 192(4):580ñ90.
- [6] WO03/063766.
- [7] Fletcher et al. (2004) Infect Immun 72:2088ñ2100.
- [8] Zhu et al. (2005) Infect Immun 73(10):6838ñ45.
- [9] Cendron et al. (2011) Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 67:531ñ5.
- [10] Mascioni et al. (2009) J Biol Chem 284:8738ñ46.
- [11] Pizza et al. (2008) Vaccine 26 Suppl 8:I46ñ8.
- [12] Malito et al. (2013) PNAS USA 110:3304ñ9.
- [13] Marshall et al. (2012) Pediatr Infect Dis J 31:1061ñ8.
- [14] McNeil et al. (2013) Microbiol Mol Biol Rev 77:234ñ52.
- [15] Serruto et al. (2012) Vaccine 30 Suppl 2: B87ñ97.
- [16] Scarselli et al. (2011) Sci Transl Med 3:91ra62.
- [17] Beernink et al. (2008) Infect Immun 76:4232ñ40.
- [18] Scarselli et al. (2009) J Mol Biol 386:97ñ108.
- [19] Giuntini et al. (2012) PLoS One 7:e34272.

- [20] Vu et al. (2012) *Sci Rep* 2:341.
- [21] Faleri et al. (2013) *FASEB J* 27(13):239012.
- [22] Beernink et al. (2011) *J Immunol* 186:3606-14.
- [23] Tettelin et al. (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [24] WO00/66741.
- [25] WO02/09643.
- [26] Katial et al. (2002) *Infect Immun* 70:702-707.
- [27] WO01/52885.
- [28] Brevet européen 0301992.
- [29] Frasch et al. (2001) chapter 7 of *Methods in Molecular Medicine*, volume 66 (*Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols*, eds. Pollard & Maiden).
- [30] Bjune et al. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [31] Fukasawa et al. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [32] WO02/09746.
- [33] Rosenqvist et al. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [34] Brevet européen 0011243.
- [35] Fredriksen et al. (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [36] WO01/91788.
- [37] WO2004/019977.
- [38] Brevet US 6,558,677.
- [39] WO01/09350.
- [40] Brevet européen 0449958.
- [41] EP-A-0996712.
- [42] EP-A-0680512.
- [43] WO02/062378.
- [44] WO99/59625.
- [45] Brevet US 6,180,111.
- [46] WO01/34642.
- [47] Peeters et al. (1996) *Vaccine* 14:1008-1015.
- [48] Vermont et al. (2003) *Infect Immun* 71:1650-1655.
- [49] WO2004/014417.
- [50] WO2005/004908.
- [51] WO2011/036562.
- [52] Pizza et al. (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [53] WO2007/028408.
- [54] <http://pubmlst.org/neisseria/>
- [55] Budroni et al. (2011) *PNAS USA* 108:4494-99.
- [56] Goldschneider et al. (1969) *J. Exp. Med.* 129:1307-26.
- [57] Santos et al. (2001) *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8:616-23.
- [58] Frasch et al. (2009) *Vaccine* 27S:B112-6.
- [59] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [60] WO03/009869.
- [61] Vaccine Design (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [62] Giuliani et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:10834-9.
- [63] WO2004/032958.
- [64] Costantino et al. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- [65] Costantino et al. (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.

- [66] WO03/007985.
- [67] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331>332.
- [68] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269>285, v.
- [69] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187>207.
- [70] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187>1188.
- [71] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321>326.
- [72] Gerlich et al. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63>68 & 79>80.
- [73] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0>7216>1946>0.
- [74] Del Guidice et al. (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1>70.
- [75] Gustafsson et al. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349>355.
- [76] Rappuoli et al. (1991) *TIBTECH* 9:232>238.
- [77] Sutter et al. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287>308.
- [78] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113>118, 125>126.
- [79] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101>107.
- [80] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51>6.
- [81] WO02/34771.
- [82] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227>43, viii.
- [83] Ferretti et al. (2001) *PNAS USA* 98: 4658>4663.
- [84] Kuroda et al. (2001) *Lancet* 357(9264):1225>1240; see also pages 1218>1219.
- [85] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47>49.
- [86] Ravenscroft et al. (1999) *Vaccine* 17:2802>2816.
- [87] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002).
- [88] EP>A>0372501.
- [89] EP>A>0378881.
- [90] EP>A>0427347.
- [91] WO93/17712.
- [92] WO94/03208.
- [93] WO98/58668.
- [94] EP>A>0471177.
- [95] WO91/01146.
- [96] Falugi et al. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816>3824.
- [97] Baraldo et al. (2004) *Infect Immun* 72(8):4884>7.
- [98] EP>A>0594610.
- [99] Ruan et al. (1990) *J Immunol* 145:3379>3384.
- [100] WO00/56360.
- [101] Kuo et al. (1995) *Infect Immun* 63:2706>13.
- [102] Michon et al. (1998) *Vaccine* 16:1732>41.
- [103] WO02/091998.
- [104] WO01/72337.
- [105] WO00/61761.
- [106] WO00/33882
- [107] Lees et al. (1996) *Vaccine* 14:190>198.
- [108] WO95/08348.
- [109] Brevet US 4,882,317
- [110] Brevet US 4,695,624
- [111] Porro et al. (1985) *Mol Immunol* 22:907>919.s
- [112] EP>A>0208375

- [113] WO00/10599
- [114] Gever et al. Med. Microbiol. Immunol. 165 : 171ñ288 (1979).
- [115] Brevet US 4,057,685.
- [116] Brevets US 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [117] Brevet US 4,459,286.
- [118] Brevet US 4,965,338
- [119] Brevet US 4,663,160.
- [120] Brevet US 4,761,283
- [121] Brevet US 4,356,170
- [122] Needleman & Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443ñ453.
- [123] Rice et al. (2000) Trends Genet 16:276ñ277.

REVENDICATIONS

1. Composition immunogène comprenant un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et 5 v3, en combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) des vésicules de membrane externe de méningocoques.

10 2. Composition immunogène comprenant des vésicules de membrane externe de méningocoques en combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3 ; les 15 vésicules de membrane externe (OMV) étant présentes à une concentration entre 5 et 30 µg/ml.

20 3. Composition selon la revendication 1 ou la revendication 2, comprenant (i) un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, (ii) un polypeptide NHBA, (iii) un polypeptide NadA et (iv) des vésicules de membrane externe de méningocoques.

25 4. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle :

- le polypeptide de fusion inclut au moins un épitope provenant de chacune des SEQ ID NO : 7, 8, et 9 et, après administration à une souris, peut susciter la production d'anticorps capables de reconnaître les 30 trois polypeptides, à savoir (a) un polypeptide constitué par SEQ ID NO : 4, (b) un polypeptide constitué par SEQ ID NO : 5, et (c) un polypeptide constitué par SEQ ID NO : 6 ;
- le polypeptide NHBA peut susciter la production d'anticorps qui, après administration à une souris, peut se lier à un polypeptide constitué par la séquence 35 d'acides aminés SEQ ID NO : 13 ;

et/ou

5 □ le polypeptide NadA peut susciter la production d'anticorps qui, après administration à une souris, peut se lier à un polypeptide constitué par la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 18.

10 5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle le polypeptide de fusion fHbp a une a une séquence d'acides aminés de formule NH₂-A-[-X-L-]₃-B- COOH, dans laquelle chaque X est un variant différent de la 15 séquence fHbp, L est une séquence d'acides aminés lieu (<< linker >>) facultative, A est une séquence d'acides aminés N-terminale facultative, et B est une séquence d'acides aminés C-terminale facultative.

15

6. Composition selon la revendication 5, dans laquelle les séquences des variants fHbp sont dans l'ordre v2-v3-v1 dans le sens N-terminal à C-terminal.

20

7. Composition selon la revendication 6, dans laquelle le polypeptide de fusion comprend une séquence d'acides aminés choisie dans le groupe constitué par SEQ ID NO : 10, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, et 38.

25

8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle : (a) le polypeptide de fusion fHbp a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 10, SEQ ID NO : 36, ou SEQ ID NO : 38 ; (b) le polypeptide NHBA comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 12 ; et (c) le 30 polypeptide NadA a la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 19.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les OMV proviennent d'une souche de sérogroupe B.

35

10. Composition selon la revendication 9, dans laquelle les OMV sont préparées à partir de la souche NZ98/254.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les OMV sont présentes à une concentration entre 10 et 15 µg/ml.

5

12. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle les polypeptides fHbp, NHBA et NadA sont présents à une concentration entre 50 et 150 µg/ml.

10 13. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre un adjuvant de type hydroxyde d'aluminium.

14. Méthode de protection d'un mammifère contre une
15 infection à méningocoques, comprenant l'administration d'une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes audit mammifère.

15. Méthode selon la revendication 14 dans laquelle ledit
20 mammifère est un sujet humain.

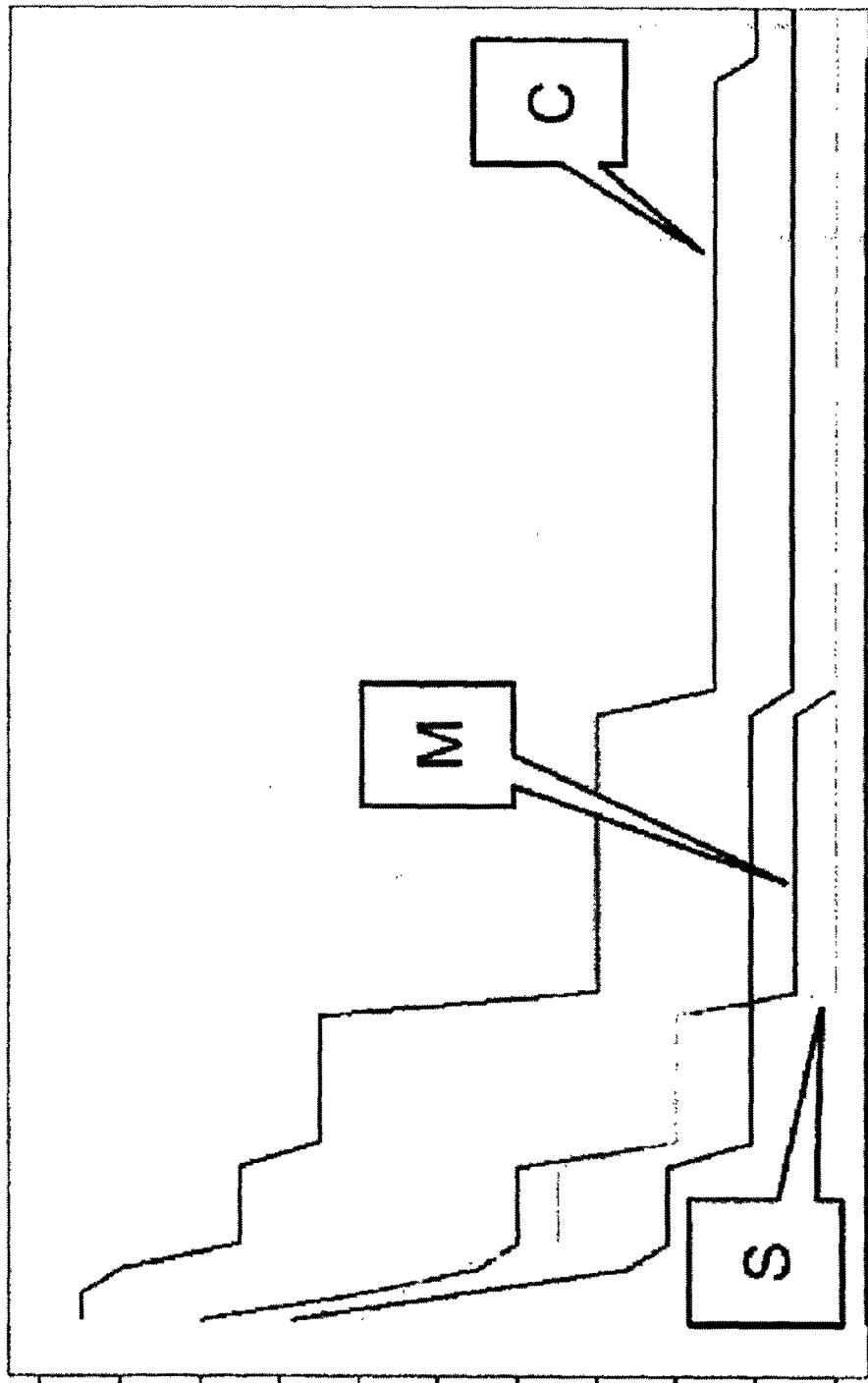


Fig. 1

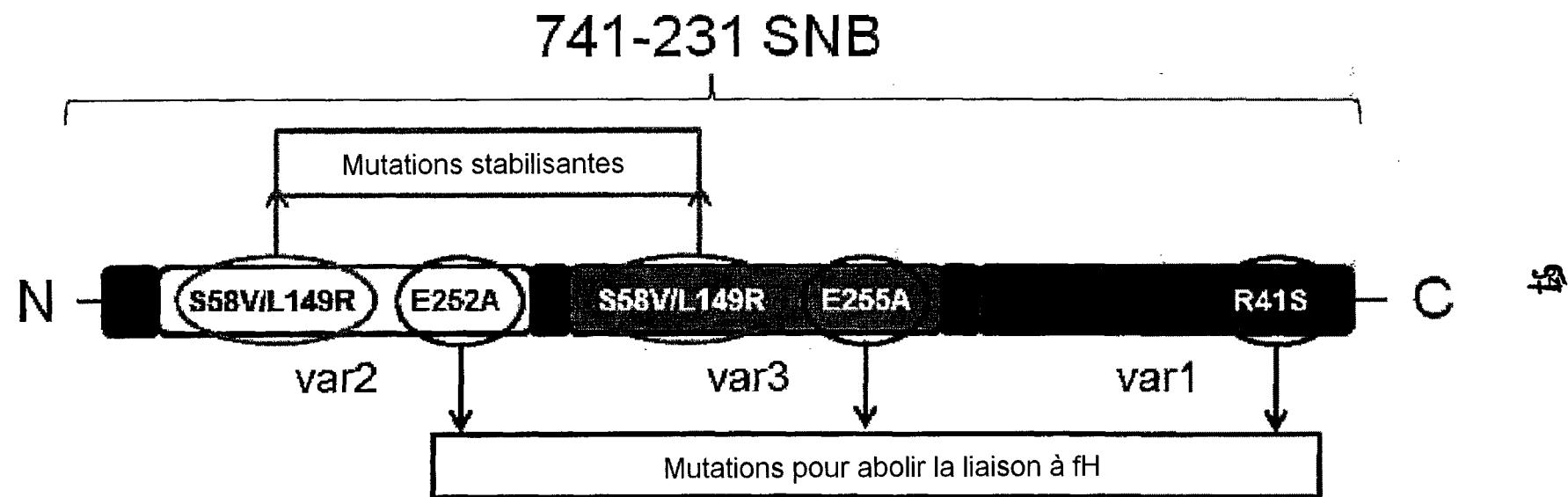


Fig. 2

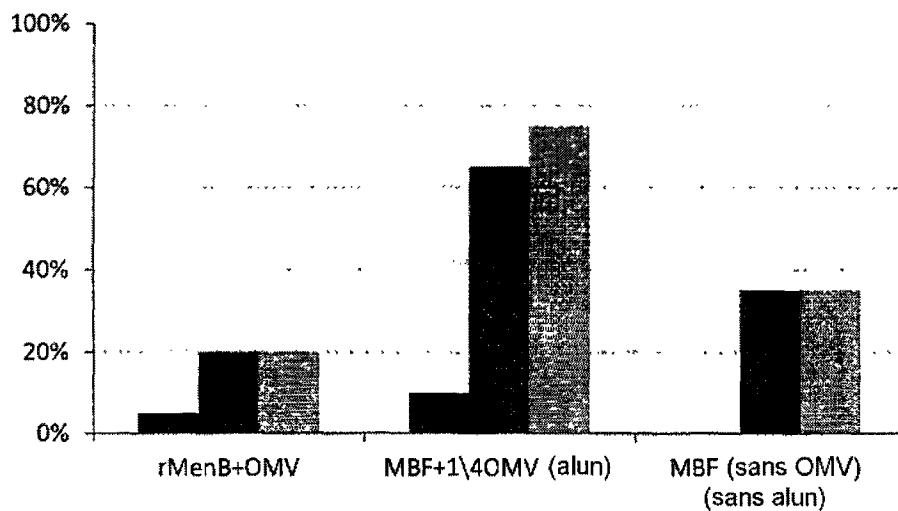
68
90

Fig. 3a

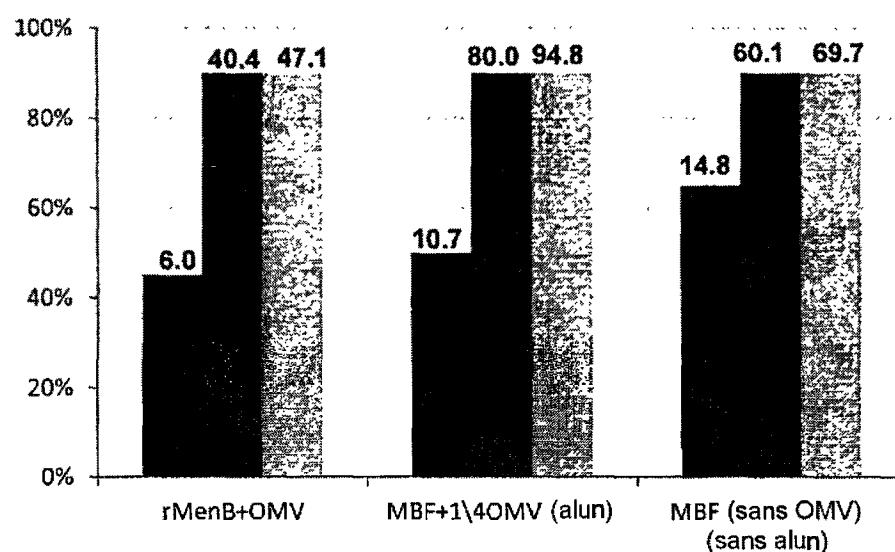


Fig. 3b

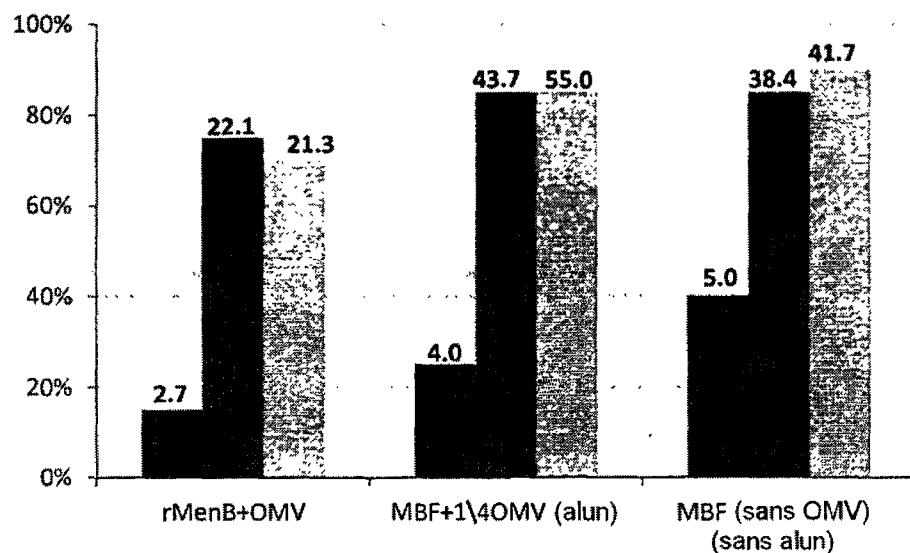


Fig. 3c

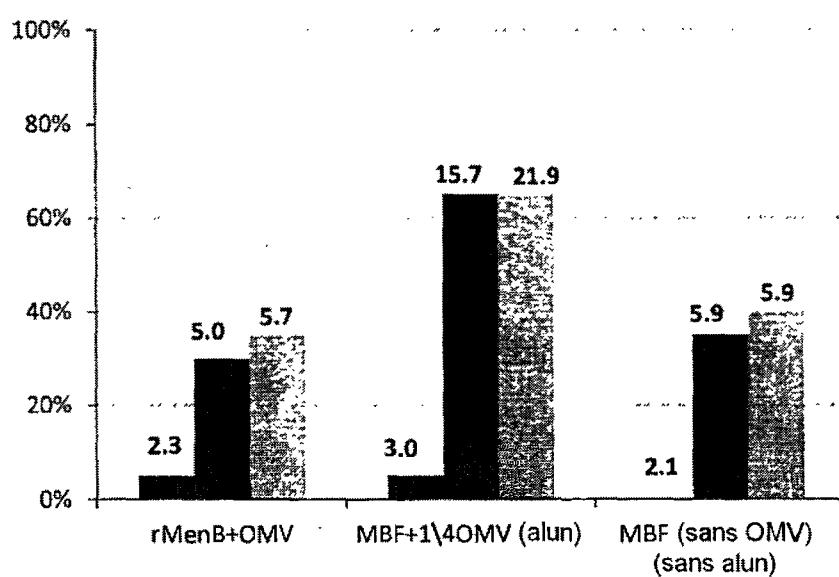


Fig. 3d

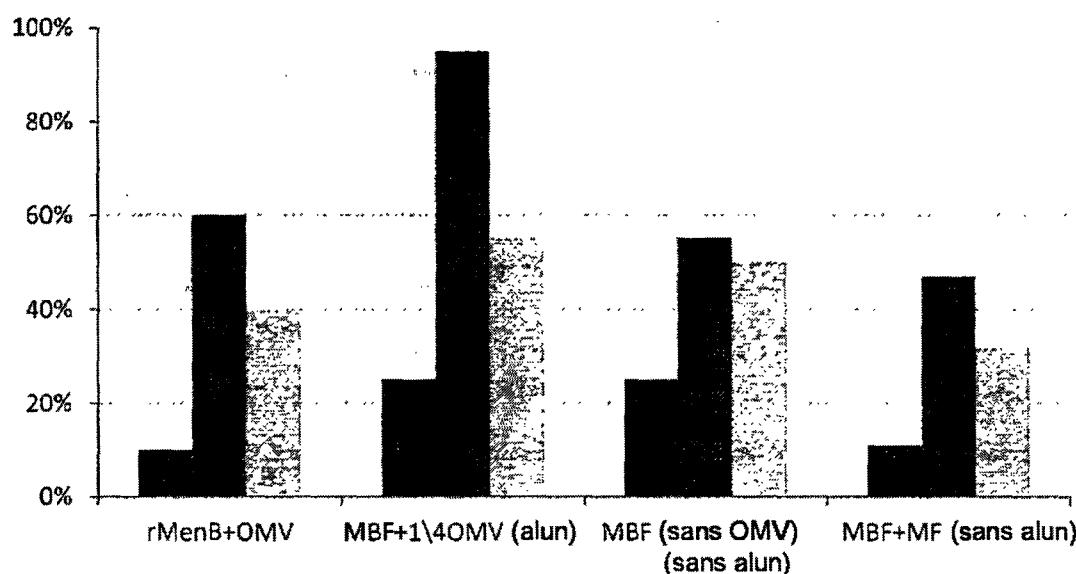


Fig. 3e

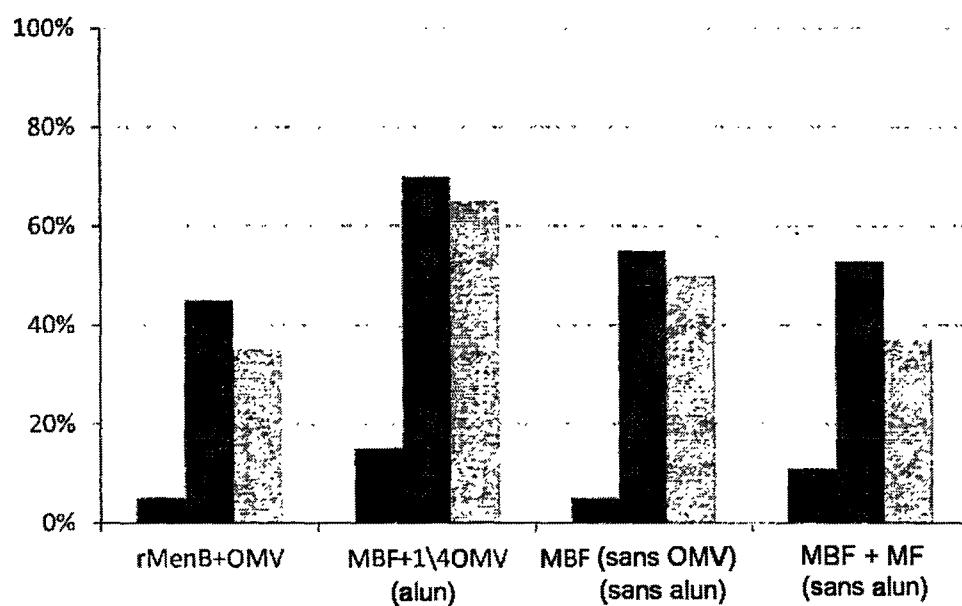


Fig. 3f

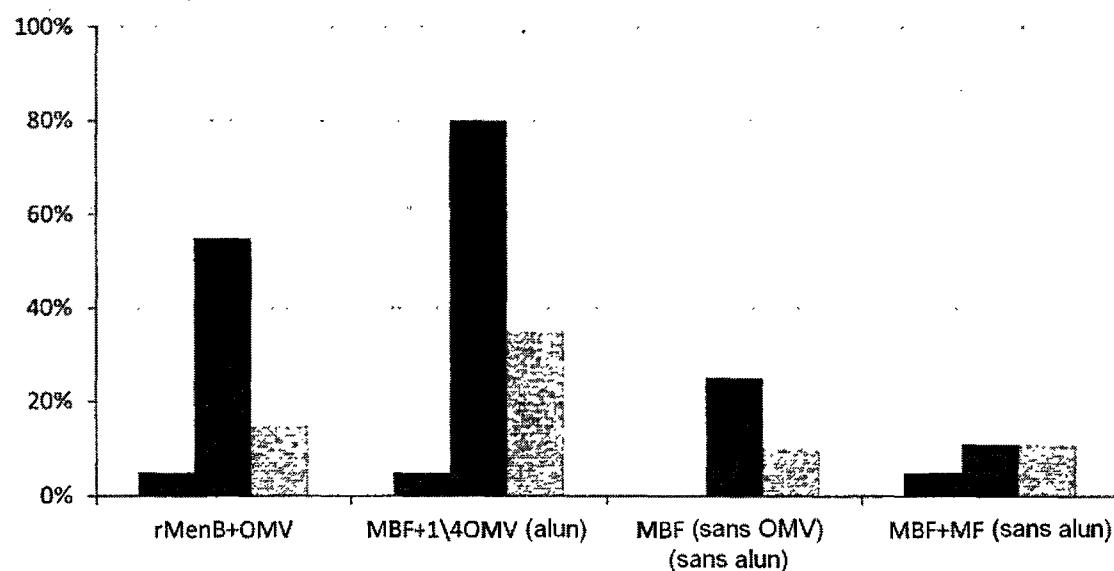


Fig. 3g



RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1984

B0 11176
BE 201505455**DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	WO 2013/186753 A1 (NOVARTIS AG [CH]; PASTEUR INSTITUT [FR]) 19 décembre 2013 (2013-12-19) * le document en entier * * voir particulièrement pages 3-6, 10-11; revendications 20-23 * -----	1-15	INV. A61K39/095 C07K14/22
Y	WO 2007/060548 A2 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; MASIGNANI VEGA [IT]; SCARSELLI MA) 31 mai 2007 (2007-05-31) * le document en entier * * voir particulièrement pages 27-28, 32-34; SEQ ID NOS 30-32, 36-38 *	1-15	
Y	WO 2004/048404 A2 (CHIRON SRL [IT]; COMANDUCCI MAURIZIO [IT]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]) 10 juin 2004 (2004-06-10) * le document en entier * * voir particulièrement résumé; pages 7-10, 22, 43-46; SEQ ID NO. 142 *	1-15	
Y	WO 2006/024954 A2 (CHIRON SRL [IT]; MASIGNANI VEGA [IT]; SCARSELLI MARIA [IT]; RAPPOLI R) 9 mars 2006 (2006-03-09) * le document en entier * * particulièrement résumé; pages 1-15, 24, 34-35, 42-55; revendications 1-32 *	1-15	A61K C07K
Y	WO 2011/110634 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; CASTADO CINDY [BE]; DEVOS NATHALIE ISA) 15 septembre 2011 (2011-09-15) * le document en entier * * particulièrement résumé; exemples 1-7, 9, 11, 13; tableaux 6 et 7; revendications 1-23, 33, 34 *	1-15	
	----- ----- -----	-/-	

2

Date d'achèvement de la recherche

12 avril 2016

Examinateur

Sirim, Pinar

CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

- X : particulièrement pertinent à lui seul
- Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie
- A : arrière-plan technologique
- O : divulgation non-écrite
- P : document interne/laire

T : théorie ou principe à la base de l'invention

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

D : cité dans la demande

L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant



europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale

BO 11176
BE 201505455

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	<p>ESPOSITO SUSANNA ET AL: "A phase II randomized controlled trial of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine, 4CMenB, in infants (II).", HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS JUL 2014, vol. 10, no. 7, 11 juillet 2014 (2014-07-11), pages 2005-2014, XP009181621, ISSN: 2164-554X * le document en entier * * voir particulièrement page 2007; table 1, table 3; Figure 2 *</p> <p>-----</p>	1-15	
Y	<p>"Assessment report Bexsero; Procedure No. EMEA/H/C/002333". , 15 novembre 2012 (2012-11-15), XP055157250, Extrait de l'Internet: URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR - Public_assessment_report/human/002333/WC500137883.pdf [extrait le 2014-12-08] * le document en entier * * voir particulièrement pages 1/102-2/102, 9/102- 10/102, 20/102, 21/102; tableau 1, page 22/102 *</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
2	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
	12 avril 2016	Sirim, Pinar	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>	



RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale

BO 11176
BE 201505455

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	Dan M Granoff ET AL: "Chapter 21 SECTION TWO: Licensed vaccines - Meningococcal vaccines" In: "Vaccines (6th Edition)", 1 janvier 2013 (2013-01-01), Elsevier, XP055150061, ISBN: 978-1-45-570090-5 pages 388-418, * le document en entier * * voir particulièrement résumé *	1-15	
A	D. M. GRANOFF ET AL: "Does Binding of Complement Factor H to the Meningococcal Vaccine Antigen, Factor H Binding Protein, Decrease Protective Serum Antibody Responses?", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 20, no. 8, 5 juin 2013 (2013-06-05), pages 1099-1107, XP055150093, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00260-13 * le document en entier * * voir particulièrement pages 415-418 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
A	PETER T. BEERNINK ET AL: "The Effect of Human Factor H on Immunogenicity of Meningococcal Native Outer Membrane Vesicle Vaccines with Over-Expressed Factor H Binding Protein", PLOS PATHOGENS, vol. 8, no. 5, 10 mai 2012 (2012-05-10), page e1002688, XP055157328, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002688 * le document en entier *	1-14	
2	Date d'achèvement de la recherche 12 avril 2016	Examinateur Sirim, Pinar	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire		& : membre de la même famille, document correspondant	



europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1984

Numéro de la demande
nationale

BO 11176
BE 201505455

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
A	KOEBERLING OLIVER ET AL: "Meningococcal outer membrane vesicle vaccines derived from mutant strains engineered to express factor H binding proteins from antigenic variant groups 1 and 2", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 16, no. 2, 1 février 2009 (2009-02-01), pages 156-162, XP009137318, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00403-08 * le document en entier * -----	1-14	
DOMAINE TECHNIQUE RECHERCHES (IPC)			
2	Date d'achèvement de la recherche 12 avril 2016	Examinateur Sirim, Pinar	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 11176
BE 201505455

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

12-04-2016

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 2013186753	A1	19-12-2013	AU 2013276083 A1 CA 2876138 A1 CN 104602704 A EP 2861247 A1 JP 2015521595 A WO 2013186753 A1		18-12-2014 19-12-2013 06-05-2015 22-04-2015 30-07-2015 19-12-2013
WO 2007060548	A2	31-05-2007	AT 521708 T AU 2006318155 A1 BR PI0619024 A2 CA 2630929 A1 CN 101356274 A CN 102816217 A CN 104497145 A CY 1112342 T1 DK 1976990 T3 EP 1976990 A2 EP 2385126 A1 EP 2385127 A1 ES 2369937 T3 JP 2009517377 A JP 2013139481 A JP 2014237721 A NZ 568577 A NZ 594944 A PT 1976990 E SI 1976990 T1 US 2011166323 A1 US 2012283413 A1 US 2013217859 A1 WO 2007060548 A2		15-09-2011 31-05-2007 20-09-2011 31-05-2007 28-01-2009 12-12-2012 08-04-2015 09-12-2015 12-12-2011 08-10-2008 09-11-2011 09-11-2011 09-12-2011 30-04-2009 18-07-2013 18-12-2014 22-12-2011 26-04-2013 24-10-2011 30-12-2011 07-07-2011 08-11-2012 22-08-2013 31-05-2007
WO 2004048404	A2	10-06-2004	AU 2003288681 A1 BR 0316501 A CA 2507009 A1 CN 1732183 A DK 1562983 T3 DK 2258716 T3 EP 1562983 A2 EP 2258716 A2 EP 2258717 A2 EP 2261239 A2 ES 2436747 T3 ES 2509915 T3 HK 1088342 A1 JP 4767540 B2		18-06-2004 04-10-2005 10-06-2004 08-02-2006 11-11-2013 20-10-2014 17-08-2005 08-12-2010 08-12-2010 15-12-2010 07-01-2014 20-10-2014 27-03-2009 07-09-2011

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 11176
BE 201505455

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

12-04-2016

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		JP 5564297 B2	30-07-2014
		JP 2006521782 A	28-09-2006
		JP 2010162038 A	29-07-2010
		JP 2013176371 A	09-09-2013
		MX PA05005442 A	26-08-2005
		NZ 540206 A	22-12-2006
		PT 1562983 E	09-12-2013
		PT 2258716 E	10-10-2014
		RU 2336091 C2	20-10-2008
		SI 1562983 T1	31-12-2013
		SI 2258716 T1	30-09-2014
		US 2006251670 A1	09-11-2006
		US 2012148617 A1	14-06-2012
		US 2012148618 A1	14-06-2012
		US 2016039887 A1	11-02-2016
		WO 2004048404 A2	10-06-2004
<hr/>			
WO 2006024954 A2 09-03-2006	AU 2005278904 A1	09-03-2006	
	BR P10514829 A	24-06-2008	
	CA 2578014 A1	09-03-2006	
	CN 101031584 A	05-09-2007	
	DK 1784419 T3	04-02-2013	
	EP 1784419 A2	16-05-2007	
	ES 2396422 T3	21-02-2013	
	HR P20130036 T1	28-02-2013	
	JP 4827196 B2	30-11-2011	
	JP 2008511306 A	17-04-2008	
	JP 2011168611 A	01-09-2011	
	NZ 553229 A	30-07-2010	
	PT 1784419 E	15-01-2013	
	RU 2375374 C2	10-12-2009	
	SI 1784419 T1	28-02-2013	
	US 2009285845 A1	19-11-2009	
	WO 2006024954 A2	09-03-2006	
<hr/>			
WO 2011110634 A1 15-09-2011	CA 2792683 A1	15-09-2011	
	CA 2792687 A1	15-09-2011	
	CA 2792689 A1	15-09-2011	
	CN 102869377 A	09-01-2013	
	CN 102869378 A	09-01-2013	
	CN 103002910 A	27-03-2013	
	EP 2544712 A1	16-01-2013	
	EP 2544713 A1	16-01-2013	
	EP 2544714 A1	16-01-2013	
	JP 2013521326 A	10-06-2013	
	JP 2013521327 A	10-06-2013	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 11176
BE 201505455

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

12-04-2016

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		JP 2013521770 A	13-06-2013
		US 2013004530 A1	03-01-2013
		US 2013011429 A1	10-01-2013
		US 2013045231 A1	21-02-2013
		WO 2011110634 A1	15-09-2011
		WO 2011110635 A1	15-09-2011
		WO 2011110636 A1	15-09-2011



OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11176	Date du dépôt(jour/mois/année) 16.07.2015	Date de priorité (jour/mois/année) 17.07.2014	Demande n° BE201505455
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/095 C07K14/22			
Déposant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- Cadre n° I Base de l'opinion
- Cadre n° II Priorité
- Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- Cadre n° VI Certains documents cités
- Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

	Examinateur Sirim, Pinar
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Cadre n° I Base de l'opinion

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

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	2, 5-8, 11
	Non : Revendications	1, 3, 4, 9, 10, 12-15
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-15
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-15
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1 Commentaires sur des méthodes de traitement

Les revendications 14 et 15 concernent une méthode de traitement chirurgical/thérapeutique du corps humain/animal. Par conséquent, son objet n'est pas brevetable. Cependant, les revendications ayant pour objet un produit, notamment des substances ou compositions destinées à être utilisées dans un premier traitement médical ou tout traitement médical suivant peuvent être acceptées.

La brevetabilité, en particulier la nouveauté et l'activité inventive, de ces revendications a été évaluée sur la base d'une revendication de produit proposée à une fin spécifique en prenant en considération les effets allégués du composé/de la composition.

2 Documents

Il est fait référence au document suivant :

- D1 WO 2013/186753 A1 (NOVARTIS AG [CH]; PASTEUR INSTITUT [FR]) 19 December 2013 (2013-12-19)
- D2 WO 2007/060548 A2 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; MASIGNANI VEGA [IT]; SCARSELLI MA) 31 May 2007 (2007-05-31)
- D3 WO 2004/048404 A2 (CHIRON SRL [IT]; COMANDUCCI MAURIZIO [IT]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]) 10 June 2004 (2004-06-10)
- D4 WO 2006/024954 A2 (CHIRON SRL [IT]; MASIGNANI VEGA [IT]; SCARSELLI MARIA [IT]; RAPPOLI R) 9 March 2006 (2006-03-09)

- D6 ESPOSITO SUSANNA ET AL: "A phase II randomized controlled trial of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine, 4CMenB, in infants (II)." HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS JUL 2014, vol. 10, no. 7, 11 July 2014 (2014-07-11), pages 2005-2014, XP9181621, ISSN: 2164-554X
- D7 "Assessment report Bexsero; Procedure No. EMEA/H/C/002333", 15 November 2012 (2012-11-15), XP055157250, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002333/WC500137883.pdf [retrieved on 2014-12-08]
- D8 Dan M Granoff ET AL: "Chapter 21 SECTION TWO: Licensed vaccines - Meningococcal vaccines" In: "Vaccines (6th Edition)", 1 January 2013 (2013-01-01), Elsevier, XP055150061, ISBN: 978-1-45-570090-5, pages 388-418

3 Objet de la demande

La présente demande concerne un vaccin modifié contre la souche de *Neisseria meningitidis* de sérogroupe B (MenB) dérivé du vaccin BEXSERO™ (le vaccine est également connu sous le nom 4CMenB ou rMenB-OMV). Ce produit contient quatre composants immunogènes principaux: la protéine liant le facteur H, "fHbp" (également connue sous le nom NMB1870, protein 741, GNA1870, P2086, LP2086 ou ORF2086); la protéine liant l'héparine, NHBA; l'adhésine A de *Neisseria*, NadA; et les vésicules de membrane externe (OMV à 50 microgramme/ml). Pour produire le vaccin modifié, BEXSERO™ a été modifié par remplacement du polypeptide de fusion NMB2091-fHbp par un polypeptide "triple fusion" constitué par les variantes de fHbp, dans l'ordre v2-v3-v1 de l'extrémité N- à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO: 10) mais également soit par (i) une réduction de 4 fois la dose d'OMV comparé au BEXSERO™ soit 12,5 microgramme/ml ou (ii) l'élimination du composant OMV.

4 Nouveauté

La revendication 1 concerne une composition immunogène comprenant un polypeptide de fusion comprenant les trois fHbp méningococciques v1, v2 et v3, en combinaison avec un ou plusieurs des composants suivants : (i) un polypeptide NHBA, (ii) un polypeptide NadA et/ou (iii) des vésicules de membrane externe de méningocoques.

Le document D1 décrit une composition vaccinale BEXSERO™ comprenant le polypeptide de fusion NMB2091-fHbp. D1 indique pages 3 et 4, que ce polypeptide de fusion peut également comprendre deux ou trois variants connus de la protéine fHbp.

Par conséquent, D1 détruit la nouveauté de l'objet de la revendication 1. Pour la même raison l'objet des revendications 3, 4, 9, et 12-15 manque également de nouveauté au vu de D1.

5 L'activité inventive

De plus, nonobstant le manque de nouveauté mentionné ci-dessus, l'objet des revendications 1-15 n'implique pas d'activité inventive, et les conditions de brevetabilité ne sont donc pas remplies. Les raisons pour lesquelles l'objet des revendications n'implique pas d'activité inventive sont les suivantes:

- 5.1 Le document D6 décrit une étude de l'activité immunitaire de plusieurs compositions de vaccin qui sont: rMenB qui contient 0, 1/4 (c'est à dire 12,5 microgramme/ml) ou 1/2 (c'est à dire 25 microgramme/ml) de la dose d'OMV comparé au 4CMenB qui contient des OMV à 50 microgramme/ml (voir tableau 1). Selon la figure 2 et le tableau 3, les immunogénicités de l'antigène fHbp et des antigènes NadA n'ont pas été affectées par la réduction de 1/4 de la concentration des vésicules.

Le document D2 décrit des polypeptides de fusion contenant plusieurs séquences polypeptidiques correspondant à l'antigène NMB1870 de Neisseria (i.e. fHbp) appartenant à des familles différentes correspondant à différents sérogroupes, et leurs utilisations pour la vaccination. Divers polypeptides "triple fusion" comprenant les trois familles de variants de fHbp avec ou sans étiquette polyhistidine en C-terminal ont été préparés, dans lesquels les trois variants sont ordonnés différemment de l'extrémité N-terminale à l'extrémité

C-terminale (voir par exemple pages 32-34). Les polypeptides de fusion définis par la séquence portant l'identifiant SEQ ID NO. 31/36 est 100% identique sur toute sa longueur à la séquence portant l'identifiant SEQ ID NO. 10 de la demande.

En plus des polypeptides de fusion comprenant des polypeptides fHbp similaires à ceux de D2, sont décrits par les documents D3 ou D4. Aux pages 27-28, il est précisé que les compositions de vaccin de l'invention "can be used in conjunction with OMVs, as NMB 1870 has been found to enhance their efficacy" and "in particular by over-expressing the polypeptides of the invention in the strains used for OMV preparation

- 5.2 La composition selon la revendication 1 diffère de la composition de vaccin 4CMenB (BEXSEROTM) de D6 en ce qu'elle contient un polypeptide de fusion comprenant trois variants v1, v2 et v3 de fHbp tandis que 4CMenB de D6 ne comprend que le variant v1 de fHbp fusionné au polypeptide NMB2091.

Au vu de cette différence, le problème technique à résoudre peut être considéré comme étant "l'approvisionnement d'un vaccin anti-MenB qui fournit une protection croisée plus étendue contre les souches de méningocoque".

Pour résoudre ce problème, la présente demande propose la composition de la revendication 1 comprenant les trois polypeptides variants v1, v2 et v3 de fHbp.

Cependant, au vu de D6 soit pris seul ou en combinaison avec l'enseignement de D2 (ou de n'importe quel autre document D3 ou D4) dans lequel il a déjà été proposé d'inclure les trois polypeptides variants de fHbp dans une seule composition vaccinale, cette solution n'implique pas d'activité inventive.

- 5.3 L'argumentation présentée pour la revendication 1 s'applique aussi à revendication 2 qui concerne une composition comprenant des OMVs à une concentration située entre 5 et 30 microgramme/ml, mais aussi à la revendication 11 qui concerne une composition comprenant des OMVs à une concentration située entre 10 et 15 microgramme/ml.
- 5.4 Les arguments étayant l'objection faite contre l'activité inventive concernant l'objet de la revendication 1 s'appliquent, mutatis mutandis, à l'objet des revendications 3 - 13 et 14-15 (à condition que ces revendications soient correctement formulées; voir point) parce qu'il ne semble pas contenir de caractéristiques supplémentaires qui, au vu de l'état de la technique, particulièrement au vu du document D6 et de l'enseignement apporté par n'importe quel document choisi parmi les documents D2 - D5 ou D8, satisfassent aux exigences de nouveauté et/ou d'activité inventive, ceci bien qu'étant combinées aux caractéristiques de l'une quelconque des revendications auxquelles lesdites revendications dépendantes sont liées.

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

Clarté, soutien de la description et suffisance de l'exposé de l'invention

Dans la partie expérimentale de la présente demande, une variante du vaccin BEXSERO™ ayant une concentration réduite d'OMV a été générée afin d'évaluer son immunogénicité par rapport au vaccin initial. Le vaccin BEXSERO™ initial contient des OMVs de la souche de *N. meningitidis* NZ98/254 (voir page 20 de la présente demande). Aussi, l'homme du métier ne peut-il tirer des conclusions concernant l'immunogénicité du vaccin de la variante BEXSERO™ de la présente demande que pour les compositions vaccinales comprenant à la fois (i) des OMVs dérivées de la souche NZ98 / 254 et (ii) au moins tous les antigènes de *Neisseria* qui sont inclus dans le vaccin BEXSERO™ initial. Par conséquent, l'objet des revendications 1 à 9 et 11 à 15, qui ne se limite pas à ces caractéristiques (i) et (ii) précises n'est pas pris en charge techniquement.

La présente demande ne décrit donc pas de façon suffisante l'objet de ces revendications 1 à 9 et 11 à 15 sur toutes leurs portées.