



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2000/09/22
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2001/03/29
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2002/03/20
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2000/002626
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2001/021203
(30) Priorité/Priority: 1999/09/23 (99/11888) FR

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ A61K 39/108, A61K 39/385,
A61K 39/155, A61P 31/14, A61K 9/00
(71) Demandeur/Applicant:
PIERRE FABRE MÉDICAMENT, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
CORVAIA, NATHALIE, FR;
GOESTCH, LILIANE, FR
(74) Agent: OGILVY RENAULT

(54) Titre : UTILISATION D'UNE PROTEINE DE MEMBRANE OMPA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE A UN PEPTIDE
IMMUNOGENE DU VRS POUR LA PREPARATION DE VACCINS ADMINISTRABLES PAR VOIE NASALE
(54) Title: USE OF AN OUTER MEMBRANE PROTEIN A OF AN ENTEROBACTERIUM ASSOCIATED WITH A RSV
IMMUNOGENIC PEPTIDE FOR PREPARING VACCINES FOR INTRANASAL ADMINISTRATION

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment la protéine P40 de Klebsiella pneumoniae, associée à un peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial (VRS) pour la préparation d'une composition pharmaceutique administrable par voie nasale destinée à induire une réponse immunitaire protectrice de la voie respiratoire supérieure et de la voie inférieure (poumons) d'un sujet contre l'infection par le VRS. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la préparation de vaccin destiné à la prévention et le traitement d'infection par le VRS.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
29 mars 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/21203 A1(51) Classification internationale des brevets⁷:
A61K 39/108, 39/155, 39/385, 9/00, A61P 31/14**Nathalie** [FR/FR]; 2, rue des Chênes, F-74160 Saint Julien
en Genevois (FR). **GOESTCH, Liliane** [FR/FR]; Route de
Bonneville, F-74130 Ayze (FR).(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02626(74) Mandataires: **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet
Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).(22) Date de dépôt international:
22 septembre 2000 (22.09.2000)(81) États désignés (*national*): AU, BR, CA, CN, JP, MX, US,
ZA.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).(30) Données relatives à la priorité:
99/11888 23 septembre 1999 (23.09.1999) FR

Publiée:

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): **PIERRE
FABRE MEDICAMENT** [FR/FR]; 45, place Abel Gance,
F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

— Avec rapport de recherche internationale.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): **CORVAÏA,***En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*(54) Title: USE OF AN OUTER MEMBRANE PROTEIN A OF AN ENTEROBACTERIUM ASSOCIATED WITH A RSV IM-
MUNOGENIC PEPTIDE FOR PREPARING VACCINES FOR INTRANASAL ADMINISTRATION(54) Titre: UTILISATION D'UNE PROTEINE DE MEMBRANE OMPA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE A UN PEPTIDE
IMMUNOGENE DU VRS POUR LA PREPARATION DE VACCINS ADMINISTRABLES PAR VOIE NASALE(57) Abstract: The invention concerns the use of an outer membrane protein A (OmpA) of enterobacterium, in particular protein P40
of *Klebsiella pneumoniae*, associated with an immunogenic peptide derived from the respiratory syncytial virus (RSV) for preparing
a pharmaceutical composition for intranasal administration designed to induce an immune response protecting the upper and lower
(lungs) respiratory route against RSV infection. The invention also concerns the use of said compounds for preparing a vaccine for
preventing and treating RSV infection.(57) Abrégé: L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment la protéine P40
de *Klebsiella pneumoniae*, associée à un peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial (VRS) pour la préparation d'une
composition pharmaceutique administrable par voie nasale destinée à induire une réponse immunitaire protectrice de la voie respi-
ratoire supérieure et de la voie inférieure (poumons) d'un sujet contre l'infection par le VRS. L'invention comprend l'utilisation de
ces composés pour la préparation de vaccin destiné à la prévention et le traitement d'infection par le VRS.

WO 01/21203 A1

UTILISATION D'UNE PROTEINE DE MEMBRANE OMPA D'ENTEROBACTERIE ASSOCIEE A UN PEPTIDE IMMUNOGENE DU VRS POUR LA PREPARATION DE VACCINS ADMINISTRABLES PAR VOIE NASALE.

5 L'invention concerne l'utilisation d'une protéine de membrane OmpA d'entérobactérie, notamment la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae*, associée à un peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial (VRS) pour la préparation d'une composition pharmaceutique administrable par voie nasale destinée à induire une réponse immunitaire protectrice de la voie respiratoire supérieure et de la voie
10 inférieure (poumons) d'un sujet contre l'infection par le VRS. L'invention comprend l'utilisation de ces composés pour la préparation de vaccin destiné à la prévention et le traitement d'infection par le VRS.

Le VRS est la cause la plus fréquente d'hospitalisation des nourrissons de
15 moins d'un an pour les infections respiratoires aiguës. Les enfants atteints de laryngo-trachéo-bronchites, bronchiolites et pneumonies nécessitent des soins hospitaliers et chez les nourrissons présentant des maladies cardiaques congénitales, le taux de mortalité est supérieur à 37 %. D'autres troubles comme les dysplasies broncho-pulmonaires, les maladies rénales et l'immunodéficience sont autant de facteurs
20 responsables de mortalités élevées. Les infections au VRS peuvent également être une cause de mortalité chez les personnes âgées.

Dans les pays tempérés, l'épidémie du VRS se manifeste pendant la période hivernale de novembre à avril et la plus grande incidence de sérieuses maladies survient chez les nourrissons de 2 à 6 mois. On distingue deux types de VRS : VRS-A
25 et VRS-B par la variation antigénique de la glycoprotéine G du VRS : sous-groupe A et sous-groupe B, qui circulent concurremment. Une étude récente en France de 1982 à 1990 a montré une alternance d'un sous-groupe à l'autre sur une période de 5 ans. La souche A est souvent la cause des atteintes d'infections plus graves que la souche B.

30 Le VRS humain appartient au genre pneumovirus, membre de la famille des Paramyxoviridae. Le génome du virus est constitué d'un brin d'ARN à polarité négative, non segmenté, codant pour 10 protéines distinctes : NS1, NS2, N ; P, M, SH (ou IA), G, F, M2 (ou 22K) et L (Murphy et al., Virus Res. 32:13-36, 1994).

De nombreuses expériences publiées ont démontré que les protéines majeures
35 impliquées dans la protection sont : F, G, et N. La glycoprotéine de fusion F

synthétisée comme précurseur F0 est scindée en deux sous-unités F1 (48 kDa) et F2 (20 kDa) reliées par des ponts disulfures. La protéine F est conservée entre le VRS-A et le VRS-B (91 % homologie). A l'inverse, la glycoprotéine d'attachement G est très variable d'un sous-groupe à l'autre. Seulement une région de 13 acides aminés (aa164-aa176) est hautement conservée et en particulier la position de quatre résidus cystéines (173, 176, 182 et 186) est maintenue constante chez tous les VRS humains et bovins. Il a été démontré sur les modèles animaux que les deux glycoprotéines F et G jouent un rôle majeur dans la protection contre le VRS. Les anticorps monoclonaux dirigés contre G et F sont capables de neutraliser le virus *in vitro* et passivement administrés, ils protègent le rat des cottonniers contre l'infection par le VRS. Dans les années 60, la tentative de mise au point de vaccins classiques, c'est-à-dire le VRS inactivé par le formol, analogue à des vaccins antirougeole et antirougeoleux, a échoué. Au lieu de conférer une protection chez l'enfant vacciné, ce type de vaccin a eu pour effet de potentialiser la maladie virale naturelle.

Les traitements actuels contre l'aggravation de la maladie due au VRS chez le nourrisson sont les dégagements de l'encombrement des voies respiratoires par aspiration de mucosités et l'assistance respiratoire par ventilation. Un antiviral, la Ribavirine semble être efficace dans les cas gravement atteints. Cependant, son utilisation dans la thérapie pédiatrique est encore mal définie. L'immunisation passive avec des immunoglobulines anti-VRS est une voie alternative dans les traitements des infections graves au VRS : aucun effet secondaire indésirable n'a été observé. Néanmoins, ce type de traitement est très coûteux et difficilement extrapolable à grande échelle.

Les différentes approches de vaccination contre le VRS humain ont été entreprises : soit le vaccin protège contre l'infection du VRS chez l'animal (rongeurs, primates) mais induit une pathologie pulmonaire, soit le vaccin n'est pas assez immunogénique et ne protège pas (Connors et al., Vaccine 10:475-484, 1992). A l'état actuel, les vaccins sous-unitaires administrés par voie injectable ne peuvent conférer une protection efficace que dans les poumons et non pour la sphère ORL. On peut citer notamment la demande internationale PCT de brevet publiée sous le numéro WO 96/14415 qui décrit un vaccin anti-VRS administrable par voie sous-cutanée comprenant un fragment de la protéine G du VRS couplée à la protéine P40 de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* ainsi que la demande internationale PCT de brevet publiée sous le numéro WO 96/14416 qui décrit un vaccin anti-VRS

administrable par voie intrapéritonéale comprenant un fragment de la protéine G du VRS couplée à la protéine BB de la protéine G de *Streptococcus*.

Seuls les vaccins vivants à VRS atténués administrés par la voie nasale peuvent conférer la protection de la sphère ORL. Cependant, cette approche est
5 hasardeuse due à un éventuel risque de révertance de la souche atténuée.

Ainsi, il reste aujourd'hui un grand besoin de disposer d'un vaccin administrable par voie nasale permettant d'induire une réponse protectrice contre le VRS humain dans les poumons et dans la sphère ORL.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

10 Ainsi, la présente invention est relative à l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, associée à un peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial (VRS) pour la préparation d'une composition pharmaceutique administrable par voie nasale destinée à induire une réponse immunitaire protectrice de la voie respiratoire supérieure et/ou de la voie inférieure
15 (poumons) d'un sujet contre l'infection par le VRS.

De préférence, ladite réponse immunitaire induite selon l'invention protège à la fois la voie respiratoire supérieure et la voie inférieure (poumons) d'un sujet contre l'infection par le VRS.

Dans la présente invention, on entendra désigner par le terme « protéine »
20 également les peptides ou les polypeptides et par le terme « OmpA » (pour « Outer Membrane Protein »), les protéines de la membrane externe de type A.

Par fragment d'une protéine OmpA, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine OmpA qui, lorsqu'il est associé à un peptide immunogène du VRS, en
25 présence éventuellement d'un adjuvant de l'immunité, est capable de générer ou accroître une réponse immune de type anticorps dirigée contre ledit peptide immunogène, ledit fragment de la protéine OmpA comprenant au moins 10 acides aminés consécutifs, de préférence au moins 15 acides aminés consécutifs ou de manière plus préférée au moins 20 acides aminés consécutifs de la séquence d'acides
30 aminés de ladite protéine OmpA.

Par « peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial », on entend désigner en particulier tout peptide dont la séquence d'acides aminés comprend au moins 5 acides aminés consécutifs, de préférence au moins 10 ou 15 acides aminés consécutifs de la séquence d'une protéine exprimée par le VRS, ledit peptide
35 comportant dans sa séquence un déterminant antigénique ou épitope capable d'induire

une réponse immune de type anticorps (lymphocytes B dépendant) dirigée contre ledit épitope « B », notamment en présence de ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, dans un organisme préalablement immunisé avec ledit peptide immunogène.

5 De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

- 10 a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, 95 % ou 97 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou
c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 10 acides
15 aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N° 2.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement
20 statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les
25 régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988)
30 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière
35 optimale par « fenêtre de comparaison » dans laquelle la région de la séquence

d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est
5 identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention comprend l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention,
10 caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

Les procédés d'extraction de protéines de membranes bactériennes sont connus de l'homme de l'art et ne seront pas développés dans la présente description.
15 On peut citer par exemple, mais sans s'y limiter le procédé d'extraction décrit par Haeuw J.H. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'invention comprend également l'utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie ou d'un de ses fragments selon l'invention, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de
20 ses fragments, ou ledit peptide immunogène est obtenue par voie recombinante.

Les méthodes de préparation de protéines recombinantes sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description, on pourra néanmoins se référer à la méthode décrite dans les exemples. Parmi les cellules utilisables pour la production de ces protéines recombinantes, il faut
25 citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de
30 mammifère (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4:558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4:564-572).

En particulier, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est choisi parmi les peptides dérivés de la protéine G, F, M2 ou N du VRS, de préférence la protéine G.

Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit peptide immunogène est un fragment de la protéine G comprenant un épitope de type B.

Par « épitope de type B » compris dans un fragment de la protéine G du VRS, on entend désigner en particulier une séquence d'acides aminés d'au moins 5, 10 ou 15 acides aminés consécutifs d'un fragment de la protéine G capable d'induire une réponse immune de type anticorps (lymphocytes B dépendant) dirigée contre ladite séquence d'acides aminés, notamment en présence de la protéine OmpA P40 de séquence SEQ ID N° 1.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré de la présente invention, ledit peptide immunogène est choisi parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N° 11, ou de séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, 95 % ou 97 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N° 11.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est couplé ou mélangé avec ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments.

Sous un autre aspect, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, et/ou une construction nucléique codant pour ledit peptide immunogène, ladite construction nucléique étant contenue dans un vecteur d'expression ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, et/ou ledit peptide immunogène.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est couplé par liaison covalente, notamment par couplage chimique, avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, pour former une protéine hybride.

Dans un mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit peptide immunogène pour

faciliter le couplage chimique, de préférence, ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

Selon l'invention, il est possible d'introduire un ou plusieurs éléments de liaison, notamment des acides aminés pour faciliter les réactions de couplage entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit peptide immunogène. Le couplage covalent entre la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et ledit peptide immunogène selon l'invention peut être réalisé à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments. Les réactifs bifonctionnels permettant ce couplage seront déterminés en fonction de l'extrémité de la protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, choisie pour effectuer le couplage et de la nature dudit peptide immunogène à coupler.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la protéine hybride formée par couplage covalent entre ledit peptide immunogène et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est une protéine de fusion exprimée par une cellule transformée avec une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride.

Les protéines hybrides issues de couplage covalent entre ledit peptide immunogène et ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, peuvent être préparées par recombinaison génétique. La protéine hybride ou chimérique peut être produite par des techniques d'ADN recombinant par insertion ou addition à la séquence d'ADN codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, d'une séquence codant pour ledit peptide immunogène.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des polynucléotides hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par D.V. Goeddel (Gene expression technology, Methods in Enzymology, vol. 185, 3-187, 1990).

De préférence, l'invention est caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, et ledit peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial utilisé pour la préparation d'une composition pharmaceutique administrable par voie nasale selon l'invention, sont sous la forme d'une protéine hybride obtenue par couplage covalent, par synthèse chimique ou par fusion génétique, entre la protéine p40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, ou de séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, 95 % ou 97 %, après alignement optimal avec la séquence

SEQ ID N° 2, et le peptide immunogène dérivé du VRS de séquence SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11, ou de séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, 95 % ou 97 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, 5 SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N° 11.

Sous un autre aspect, l'invention concerne en outre l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride, notamment contenue dans un vecteur d'expression, ou dans une cellule hôte transformée contenant ladite construction 10 nucléique capable d'exprimer ladite protéine hybride.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence qu'une telle protéine OmpA, notamment la P40 de *K. pneumoniae*, associée en particulier par liaison covalente à un peptide immunogène dérivé du VRS, a la propriété surprenante de potentialiser la réponse immunitaire pour certains de ces peptides immunogènes sans 15 qu'il soit nécessaire de recourir à l'addition d'un adjuvant.

Ainsi, selon la présente invention, ladite composition pharmaceutique comprendra le cas échéant un adjuvant de l'immunité.

L'invention comprend également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant 20 d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité, notamment encapsulée dans un liposome.

De préférence, l'invention comprend l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit véhicule est un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, pour ledit peptide 25 immunogène, ou pour ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée contenant ladite construction nucléique capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit peptide immunogène, ou ladite protéine hybride.

De manière plus préférée, ladite cellule hôte transformée est une bactérie non pathogène pour les mammifères et ladite construction nucléique qu'elle contient 30 comprend en outre les éléments nécessaires à la sécrétion ou à l'expression à la surface de la membrane desdites bactéries de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, dudit peptide immunogène, ou de ladite protéine hybride.

Enfin, la présente invention concerne l'utilisation selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique notamment vaccinale, destinée à 35 prévenir ou à traiter les infections au VRS.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures dont les légendes sont ci-après.

5 **Légendes des figures :**

Figure 1 : Gel SDS PAGE 12 % dans des conditions dénaturantes de la protéine P40 recombinante (rP40) de séquence SEQ ID N° 2 (37 Kda), des marqueurs de tailles moléculaires (M) dans l'ordre décroissant (200, 116, 97.4, 66, 45, 31, 21.5 Kda), et de la protéine P40G2Na de séquence SEQ ID N° 4 (49 Kda).

10 Figures 2A à 2C : Evaluation de la réponse IgG systémique (figure 2A) et isotypage des IgG sériques chez des souris naïves (figure 2B) ou présensibilisées avec *Klebsiella pneumoniae* (figure 2C), ayant reçu 3 administrations par voie intra-nasale (i.n.) de 40 µg de protéine G2Na de séquence SEQ ID N° 9 fusionné à rP40.

15 Figures 3A et 3B : Immunogénicité des conjugués P40-G5, administrés par voie i.n. à des souris BABL/c. 10 µg d'équivalents G5 couplés à rP40 sont administrés 3 fois, à 10 jours d'intervalle, à des souris naïves (figure 3A) ou présensibilisées (figure 3B) par *Klebsiella pneumoniae*. 10 jours après la dernière immunisation les animaux sont ponctionnés et les IgG sériques dirigées contre G5 dosées par ELISA.

20 Figures 4A et 4B : Etude de la protection des voies supérieures (figure 4A) et inférieures (figure 4B) après immunisation de souris BALB/c avec la protéine de fusion P40G2Na.

Figures 5A et 5B : Etude de la protection des voies inférieures (figure 5A) et supérieures (figure 5B) après immunisation de souris BABL/c avec le conjugué P40-G5.

25

Exemple 1 : Clonage de l'ADN codant pour la protéine OmpA P40 de *Klebsiella pneumoniae*

L'ADN codant pour la protéine P40 a été obtenu par amplification par PCR à partir de l'ADN génomique de *Klebsiella pneumoniae* IP 1145 (Nguyen et al., Gene 30 210:93-101, 1998). Le fragment de gène codant pour la P40 est inséré dans divers vecteurs d'expression, en particulier un vecteur sous le contrôle du promoteur de l'opéron Trp : pvaLP40 (5, 7 Kpb). La séquence nucléotidique et la séquence peptidique de la protéine P40 sont représentées respectivement par les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2. Une souche productrice *E. coli* K12, a été transformée 35 par un vecteur d'expression pvaLP40 (5, 7 Kpb). La protéine rP40 est produite sous

forme de corps d'inclusion avec un rendement important (> 10 %, g de protéines/g de biomasse sèche). Cet exemple n'est qu'une illustration de l'expression de la protéine rP40, mais elle peut être étendue à d'autres souches bactériennes ainsi que d'autres vecteurs d'expression.

5 **Exemple 2** : Clonage de l'ADN codant pour la protéine P40G2Na

L'ADN codant pour le fragment G2Na de séquence SEQ ID N° 9 de la protéine G du VRS-A (correspondant à la séquence d'acides aminés aa 130 - aa 230 de la séquence de la protéine G du VRS-A), a été obtenu par assemblage d'oligonucléotides de synthèse sur supports solides (Billes magnétiques Dynal, Oslo) comme décrit par
10 Nguyen et al. (M. Uhlen, E. Hornes, and O. Olsvik (eds.), Advances in biomagnetic separation. Eaton Publishing Co., Natick, p. 73-78, 1994), les oligonucléotides ont été conçus et optimisés avec le codon usuel de *Escherichia coli*. L'ADN G2Na a été cloné dans le vecteur pvaLP40 décrit dans l'exemple 1, le vecteur d'expression résultant est nommé pvaLP40G2Na (6 Kpb). La séquence nucléotidique et la séquence peptidique
15 de P40G2Na sont représentées respectivement par les séquences SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4. La souche *E. coli* K12, transformée par ce vecteur, dans des conditions de culture décrites ci-dessus, produit sous forme de corps d'inclusion, la protéine P40G2Na (49 Kda) en quantité abondante (> 5 %, g de protéines/g de biomasse sèche).

20 Le clonage de l'ADN codant pour le fragment G2Nb de séquence SEQ ID N° 11 de la protéine G du VRS-B (correspondant à la séquence d'acides aminés aa 130 - aa 230 de la séquence de la protéine G du VRS-A) ainsi que la protéine de fusion P40G2Nb peuvent être obtenus en utilisant les techniques décrites pour G2Na et P40G2Na.

25 **Exemple 3** : Procédé de fermentation de la protéine rP40 et de la protéine de fusion P40G2Na

La description du procédé de fermentation suivant est applicable à l'expression de la protéine rP40 et à celle de la protéine P40G2Na. Les conditions de culture sont données à titre d'exemple et pourront être optimisées pour obtenir un meilleur
30 rendement en protéines exprimées.

L'inoculation est réalisée avec la souche *E. coli* recombinante décrite ci-dessus dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) renfermant de l'Ampicilline (100 µg/ml, Sigma) et de la Tétracycline (8 µg/ml, Sigma), qui est incubée pendant une nuit à 37°C. Puis 2 litres de milieu de culture dans un
35 fermenteur (Biolafitte, France) sontensemencés au moyen de 200 ml de la culture

précédemment obtenue. De manière assez classique, le milieu de culture peut être composé d'agents chimiques, supplémentés par les vitamines, des extraits de levure, connus pour avoir une croissance à densité élevée de cellules bactériennes, telle que décrit par Nguyen et al. (Gene 210:93-101, 1998).

5 Les paramètres contrôlés durant la fermentation sont : le pH, l'agitation, la température, le taux d'oxygénation, l'alimentation de sources combinées (Glycérol ou Glucose). De manière générale, le pH est régulé à 7,0, la température est fixée à 37°C. La croissance est contrôlée en alimentant en glycérol (87 %) à un débit constant (12 ml/h) pour maintenir le signal de tension de l'oxygène dissous à 30 %. Lorsque la
10 turbidité de la culture (mesurée à 580 nm) atteint la valeur de 80 (après environ 24 heures de culture), la production des protéines est déclenchée par addition de l'acide indole acrylique (IAA) à la concentration finale de 25 mg/l. Environ 4 heures après induction, les cellules sont récoltées par centrifugation. La quantité de biomasse humide obtenue est d'environ 200 gr.

15 **Exemple 4** : Procédé d'extraction et de purification de la protéine rP40

A) Extraction de la rP40

Le procédé d'extraction et de purification a été décrit selon Haeuw et al. (Eur. J. Biochem. 255:446-454, 1998).

Après centrifugation du bouillon de culture (4000 tpm, 10 min, 4°C), les cellules
20 sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5. Les insolubles ou corps d'inclusion sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure température ambiante / agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25 mM à pH 8,5 et 5 mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

25 Les corps d'inclusion à 37°C sont solubilisés pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 7 M urée (agent dénaturant) et 10 mM dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000 g) permet d'éliminer les particules non solubles.

Le surnageant obtenu est ensuite resuspendu dans 13 volumes de tampon
30 Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air (afin de favoriser la renaturation de la protéine par dilution et la réoxydation des ponts disulfures).

B) Purification de la protéine rP40

35 - Etape de chromatographie d'échange d'anions

Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280 nm. La protéine rP40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2 M en NaCl dans le tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 à 0,1 % Zwittergent 3-14.

- Etape de chromatographie d'échange de cations

Les fractions contenant la protéine rP40 sont mélangées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon citrate 20 mM pH 3,0 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14.

Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20 mM pH 3,0 contenant 0,1 % de Zwittergent 3-14. La protéine rP40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7 M en NaCl.

Exemple 5 : Procédé d'extraction et de purification de la protéine P40G2Na

A) Extraction de la protéine de fusion P40G2Na

Après centrifugation du bouillon de culture (4000 tpm, 10 min, 4°C), les cellules de bactéries sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contenant 1 mM EDTA, 0,2 M NaCl et 0,05 % Tween 20. Les insolubles ou corps d'inclusion sont obtenus après un traitement par le lysozyme (0,5 g/litre, 1 heure température ambiante / agitation douce). Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (15 min à 10 000 g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25 mM à pH 8,5 contenant 5 mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10 000 g).

Les corps d'inclusion sont solubilisés à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant 7 M chlorhydrate de guanidinium (agent dénaturant) et 10 mM dithiothréitol (réduction des ponts disulfures). Une centrifugation (15 min à 10 000 g) permet d'éliminer les particules non solubles.

Le surnagant est ensuite resuspendu dans 13 volumes de tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76 g/l) et du Zwittergent 3-14 (0,1 %, p/v). La

solution est laissée pendant une nuit à température ambiante sous agitation douce au contact de l'air.

B) Purification de la protéine de fusion P40G2Na

- Etape de chromatographie d'échange d'anions

5 Après une nouvelle centrifugation, la solution est dialysée contre un tampon éthanolamine-HCl 20 mM pH 10,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C.

10 Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Amersham Pharmacia Biotech Source Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus, et la protéine P40G2Na est éluée à l'aide d'un gradient de NaCl dans le même tampon. Les protéines sont détectées à 280 nm.

- Etape de chromatographie d'échange de cations

15 Les fractions contenant la protéine P40G2Na sont mélangées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10 kDa) pour des volumes de l'ordre de 100 ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10 kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à 4°C contre un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14.

20 Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Amersham Pharmacia Biotech Source S) équilibrée dans le tampon précédent, et la protéine P40G2Na est éluée à l'aide d'un gradient de NaCl dans le même tampon. Les fractions d'intérêt sont mélangées avant d'être concentrées par ultrafiltration à l'aide de l'un des systèmes décrits précédemment.

25 **Exemple 6** : Couplage chimique pour obtenir P40-G5

A) Synthèse et caractérisation du conjugué P40-G5Cysa

- Synthèse des peptides G5aCys et CysG5a

30 Le peptide G5a, représenté par la séquence SEQ ID N° 5, est un peptide de 16 acides aminés qui correspond au fragment aa144-aa159 de la protéine G du VRS-A. Il est obtenu par synthèse chimique sur phase solide en partant du côté C terminal vers le côté N-terminal. Les peptides CysG5a et G5aCys, représentés respectivement par les séquences SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7, correspondent respectivement à ce peptide avec une Cystéine supplémentaire du côté N- ou C-terminal qui permet un couplage univoque sur une protéine porteuse.

Les peptides ont été synthétisés à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptide en phase solide du côté C vers le côté N-terminal (chimie FMOC à l'échelle de 0,1 ; 0,25 ou 1,0 mmole). La synthèse du peptide CysG5a est effectuée à partir d'une Proline préchargée sur une résine de type HMP, qui permet après clivage d'obtenir une fonction acide libre du côté C-terminal ou une résine de type Rink amide MHBA, qui permet après clivage d'obtenir une fonction amide du côté C-terminal. Celle du peptide G5aCys débute par une Cystéine préchargée sur l'une ou l'autre des résines. Les fonctions réactives des chaînes latérales des acides aminés utilisés, sont protégées par des groupes compatibles avec la chimie FMOC [Cys(Trt) ; Arg(Pmc) ; Asn(Trt) ; Gln(Trt) ; Lys(Boc) ; Ser(tBu) ; Thr(tBu)]. Un cycle de couplage se déroule de la manière suivante : déprotection de la fonction amine N-terminale du premier acide aminé à l'aide de pipéridine, activation de la fonction acide du deuxième acide aminé à coupler à l'aide d'HBTU/HMP et couplage. En fin de synthèse, le peptide est clivé de la résine et les chaînes latérales sont déprotégées par réaction avec un mélange eau / TFA. Le peptide est précipité à l'éther refroidi préalablement à -40°C et le mélange est centrifugé. Le culot est lavé à trois reprises avec de l'éther puis séché à l'azote. Le culot est repris avec de l'eau contenant 0,1 % de TFA. La suspension est à nouveau centrifugée et le surnageant qui contient le peptide est séparé du culot, qui contient la résine. Le peptide brut est purifié par HPLC en phase inverse semi-préparative. L'homogénéité du peptide purifié est vérifiée par HPLC en phase inverse et par électrophorèse capillaire (FZCE). La structure théorique est confirmée par comparaison de la compatibilité de la masse mesurée par spectrométrie de masse de type ES-MS, avec la masse calculée à partir de la séquence théorique en acides aminés.

• Peptide CysG5aNH₂

- Synthèse :

Poids théorique peptide-résine en fin de synthèse : 593 mg

Poids mesuré après séchage à l'azote : 619 mg

Clivage peptide-résine et analyse du peptide brut : 200 mg (1/3 du lot)

Masse de peptide brut clivé après lyophilisation : 84 mg (75% de quantité nette de peptide soit 97% de rendement).

Homogénéité du peptide brut : 97 % (RP-HPLC ; UV 210 NM)

97 % (FZCE/Microcoat™).

- Purification :

Masse de peptide purifié après lyophilisation : 50 mg (75% de quantité nette de peptide soit 58 % de rendement).

- Caractérisation :

5 Homogénéité du peptide purifié : > 99 % (RP-HPLC ; UV 210 NM)
> 99 % (FZCE/Microcoat™ ;
UV 200 nm)

Spectrométrie de masse (ES-MS)

Masse calculée : 1951.29 Da

10 Masse mesurée : 1950.80 Da $\pm$ 0.31

- Abréviations :

AA ou aa : acide aminé ; Boc : Tert Butoxycarbonyl ; BHA : Bromo hydrosuccimidyl
acide ; CE : Capillary Electrophoresis ; ES-MS : Electrospray - Mass Spectrometry ;
Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyl ; FZCE : Free Zone Capillary Electrophoresis ;
15 HBTU : 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluroniumhexafluorophosphate ;
HMP : p-hydroxyméthylphénoxyméthyl polystyrène ; MBHA : méthylbenzhydramine ;
NMP : N-méthyle-2-pyrrolidone ; Pmc : 2,2,5,7,8-Pentaméthylchroman-6-sulfonyl ;
RP-HPLC : Reverse Phase - High Performance Liquide Chromatography ; SPSS :
Synthèse Peptidique en Phase Solide ; tBOC : t-butyloxycarbonyl ; tBu : tertio Butyl ;
20 TFA : trifluoroacetic acid ; Trt : trityle.

La méthode utilisée pour le couplage a été décrite par Haeuw et al. (Eur. J.
Biochem. 255:446-454, 1998). Le réactif hétérobifonctionnel, N-hydroxysuccinimide
bromoacétate ou HBA, utilisé permet une activation des résidus Lysine de la protéine
par bromoacétylation, puis un couplage du peptide via le groupement thiol porté par le
25 résidu Cystéine introduit en position C-terminale du peptide.

Brièvement, la protéine P40 est dialysée contre un tampon phosphate sodique
0,1M pH 7,0 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 pendant une nuit à 4°C. La protéine
dialysée est ensuite activée à l'aide du réactif HBA. Celui-ci est ajouté à raison de
1,2 mg (dans 10 µl de diméthylformamide) par mg de P40, puis l'ensemble est placé
30 sous agitation pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité. La P40 activée
est dessalée par chromatographie de tamisage moléculaire sur support Pharmacia
Sephadex G25. L'élution de la protéine est réalisée à l'aide d'un tampon phosphate
sodique 0,1M pH 7,0 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14. Les fractions contenant la P40
activée sont rassemblées. Pour le couplage, 0,4 mg de peptide (dans le tampon
35 précédent à une concentration de 10 mg/ml) sont ajoutés à 1 mg de P40

(concentration de l'ordre de 5 mg/ml). Après saturation de la solution sous courant d'argon, l'ensemble est placé sous agitation pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité. Le conjugué est ensuite dialysé contre un tampon phosphate sodique 0,1 M pH 7,0 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 pendant 24 heures à +4°C avant caractérisation par SDS-PAGE et dosages.

Le nombre de peptides couplés est déterminé par dosage par HPLC des acides aminés après hydrolyse acide et dérivatisation à l'aide du PITC (méthode PicoTag Waters). La quantification du résidu carboxyméthylcystéine libéré selon la méthode décrite par Kolodny & Robey (Anal. Biochem. 187:136-140, 1990) permet de déterminer avec précision le nombre de moles de peptide G5Cysa fixées par mole de protéine P40. Cette valeur est généralement comprise entre 5 et 10 G5Cysa / P40.

Exemple 7 : Réponse anticorps après immunisation par P40G2Na

P40G2Na, à la dose de 40 µg d'équivalent G2Na (antigène dérivé de la protéine G du VRS aa130-230) a été administré 3 fois, à 10 jours d'intervalle, par voie intranasale (i.n.), chez des souris BALB/c présensibilisées ou non par deux administrations i.n. de *Klebsiella pneumoniae*. Cette présensibilisation a pour but de mimer naturellement la situation humaine dans la mesure où ce pathogène des voies respiratoires est fréquemment rencontré par l'homme qui possède de ce fait un titre anti-rP40 de base.

De manière surprenante, la figure 2A met en évidence un titre sérique IgG élevé contre G2Na consécutif à l'administration de la protéine de fusion par voie i.n. Ce titre est significativement plus élevé chez les animaux présensibilisés par *Klebsiella pneumoniae* et l'addition de CTB (toxine cholérique sous-unité B) à la protéine de fusion améliore également l'intensité de la réponse et son homogénéité. Un isotypage de la réponse IgG (figures 2B et 2C) sérique met en évidence une réponse IgG1 majoritaire en absence de CTB avec une augmentation des titres IgG1 et IgG2a chez les souris sensibilisées avec *K. pneumoniae* (figure 2C). L'effet de la présensibilisation sur l'isotypage n'est plus perceptible dès lors que la CTB est additionnée à la protéine de fusion. A noter que le CTB (Sigma, St-Louis, MO, USA) d'origine d'extraction, contient encore des traces de CTA (toxine cholérique sous-unité A) la partie toxique qui est responsable de l'induction de réponses d'anticorps. L'ensemble de ces données met en évidence l'immunogénicité du peptide G2Na lorsqu'il est fusionné à la protéine rP40 et administré par la voie intranasale.

Exemple 8 : Réponse anticorps après immunisation par P40-G5

L'évaluation de la réponse anticorps a également été réalisée avec un épitope B pur issu de la protéine G du VRS nommé G5 (Plotnicky-Gilquin et al., J.Virol. 73:5637, 1999).

5 Comme attendu, le peptide G5 n'est pas immunogénique seul ou en présence de CTB. Etonnamment, le peptide G5 est immunogène lorsqu'il est couplé à la protéine rP40 et administré par voie i.n. (figure 3A). La présensibilisation des souris par *Klebsiella pneumoniae* (figure 3B) améliore sensiblement la réponse IgG sérique anti-G5.

10 **Exemple 9 : Protection après immunisation par P40G2Na et challenge VRS**

Afin d'évaluer la qualité de la réponse immunitaire en terme de protection, les souris BALB/c sont immunisées par la protéine hybride P40G2Na puis infectées par voie i.n. avec le RSV-A.

15 La figure 4A montre que l'administration de la protéine porteuse rP40 seule, administrée par voie i.n. avec ou sans CTB est sans conséquence sur l'infection des souris par le RSV-A. De manière intéressante, l'administration de la protéine de fusion P40G2Na à des souris non sensibilisées par *Klebsiella pneumoniae* entraîne une réduction du titre viral de 2 log 10 pour 5 des 6 souris. De manière surprenante, la sensibilisation des souris par *Klebsiella pneumoniae* améliore de manière significative
20 la protection des voies pulmonaires.

En ce qui concerne la protection des voies nasales (figure 4B), l'apport de la présensibilisation par *Klebsiella pneumoniae* est particulièrement net en présence ou en absence de CTB. Cette importance de la présensibilisation par *Klebsiella pneumoniae* peut s'expliquer par une plus grande homogénéité de la réponse IgG chez
25 les souris présensibilisées mais également par l'augmentation de la réponse locale de type IgA chez ces animaux (données non communiquées).

Ces données expérimentales démontrent pour la première fois que l'administration par voie mucosale d'une protéine recombinante sous-unitaire dérivée de la protéine G du VRS fusionnée à une protéine porteuse P40 protège à la fois la
30 voie pulmonaire et la voie nasale de l'animal.

Exemple 10 : Protection après immunisation par P40-G5 et challenge VRS

De manière intéressante, la figure 5A montre que l'administration du peptide G5 couplé à rP40 par voie nasale entraîne une réduction de virémie significative ($p < 0,05$) au niveau des poumons des souris contre une infection avec RSV-A. Concernant la
35 protection des voies supérieures (figure 5B), les résultats obtenus montrent que les

animaux immunisés par P40-G5 ont une virémie réduite après infection par le RSV-A particulièrement significative ($p < 0,05$) lorsque ceux-ci ont été présensibilisés avec *Klebsiella pneumoniae*.

1

LISTE DE SEQUENCES

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> UTILISATION D'UNE PROTEINE DE MEMBRANE OMPA D'ENTEROBACTERIE
ASSOCIEE A UN PEPTIDE IMMUNOGENE DU VRS POUR LA PREPARATION DE
VACCINS ADMINISTRABLES PAR VOIE NASALE

<130> D18229

<140>

<141>

<150> FR 99 11888

<151> 1999-09-23

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1032

<212> ADN

<213> Klebsiella pneumoniae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

<220>

<223> P40

<400> 1

atg	aaa	gca	att	ttc	gta	ctg	aat	gcg	gct	ccg	aaa	gat	aac	acc	tgg	48
Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	
1				5				10						15		
tat	gca	ggt	ggt	aaa	ctg	ggt	tgg	tcc	cag	tat	cac	gac	acc	ggt	ttc	96
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
			20					25						30		
tac	ggt	aac	ggt	ttc	cag	aac	aac	aac	ggt	ccg	acc	cgt	aac	gat	cag	144
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
		35					40					45				
ctt	ggt	gct	ggt	gcg	ttc	ggt	ggt	tac	cag	gtt	aac	ccg	tac	ctc	ggt	192
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
	50					55			60							
ttc	gaa	atg	ggt	tat	gac	tgg	ctg	ggc	cgt	atg	gca	tat	aaa	ggc	agc	240
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65				70				75					80		
gtt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	gtt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
			85					90						95		
ctg	ggt	tac	ccg	atc	act	gac	gat	ctg	gac	atc	tac	acc	cgt	ctg	ggc	336
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	
			100					105					110			
ggc	atg	gtt	tgg	cgc	gct	gac	tcc	aaa	ggc	aac	tac	gct	tct	acc	ggc	384
Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	
		115					120					125				
gtt	tcc	cgt	agc	gaa	cac	gac	act	ggc	gtt	tcc	cca	gta	ttt	gct	ggc	432
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	
	130					135					140					
ggc	gta	gag	tgg	gct	gtt	act	cgt	gac	atc	gct	acc	cgt	ctg	gaa	tac	480
Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	
145					150				155					160		

cag tgg gtt aac aac atc ggc gac gcg ggc act gtg ggt acc cgt cct	528
Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro	
165 170 175	
gat aac ggc atg ctg agc ctg ggc gtt tcc tac cgc ttc ggt cag gaa	576
Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu	
180 185 190	
gat gct gca ccg gtt gtt gct ccg gct ccg gct ccg gct ccg gaa gtg	624
Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val	
195 200 205	
gct acc aag cac ttc acc ctg aag tct gac gtt ctg ttc aac ttc aac	672
Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn	
210 215 220	
aaa gct acc ctg aaa ccg gaa ggt cag cag gct ctg gat cag ctg tac	720
Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr	
225 230 235 240	
act cag ctg agc aac atg gat ccg aaa gac ggt tcc gct gtt gtt ctg	768
Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu	
245 250 255	
ggc tac acc gac cgc atc ggt tcc gaa gct tac aac cag cag ctg tct	816
Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser	
260 265 270	
gag aaa cgt gct cag tcc gtt gtt gac tac ctg gtt gct aaa ggc atc	864
Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile	
275 280 285	
ccg gct ggc aaa atc tcc gct cgc ggc atg ggt gaa tcc aac ccg gtt	912
Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val	
290 295 300	
act ggc aac acc tgt gac aac gtg aaa gct cgc gct gcc ctg atc gat	960
Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp	
305 310 315 320	
tgc ctg gct ccg gat cgt cgt gta gag atc gaa gtt aaa ggc tac aaa	1008
Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys	
325 330 335	
gaa gtt gta act cag ccg gcg ggt	1032
Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly	
340	

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> Klebsiella pneumoniae

<223> P40

<400> 2

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp	
1 5 10 15	
Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe	
20 25 30	
Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln	
35 40 45	
Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly	
50 55 60	
Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser	
65 70 75 80	
Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys	
85 90 95	
Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly	
100 105 110	
Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly	
115 120 125	
Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly	
130 135 140	

3

Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr
145					150					155					160
Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro
				165					170					175	
Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu
			180					185					190		
Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val
		195					200					205			
Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn
	210					215					220				
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr
225					230					235					240
Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu
				245					250					255	
Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser
			260					265						270	
Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile
		275					280					285			
Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val
	290					295					300				
Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp
305					310					315					320
Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys
				325					330					335	
Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Gly								
				340											

<210> 3

<211> 1356

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: SEQUENCE
 NUCLEIQUE RESULTANT DE LA FUSION ENTRE DE L'ADN DE
 KLEBSIELLA PNEUMONIAE (SEQ ID No. 1) ET DE L'ADN DU
 VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL (SEQ ID No. 8)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1356)

<220>

<223> P40G2Na

<400> 3

atg	aaa	gca	att	ttc	gta	ctg	aat	gcg	gct	ccg	aaa	gat	aac	acc	tgg	48
Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	
1				5				10						15		
tat	gca	ggt	ggt	aaa	ctg	ggt	tgg	tcc	cag	tat	cac	gac	acc	ggt	ttc	96
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
			20					25					30			
tac	ggt	aac	ggt	ttc	cag	aac	aac	aac	ggt	ccg	acc	cgt	aac	gat	cag	144
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
		35					40					45				
ctt	ggt	gct	ggt	gcg	ttc	ggt	ggt	tac	cag	ggt	aac	ccg	tac	ctc	ggt	192
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
		50				55					60					
ttc	gaa	atg	ggt	tat	gac	tgg	ctg	ggc	cgt	atg	gca	tat	aaa	ggc	agc	240
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
	65				70				75					80		
gtt	gac	aac	ggt	gct	ttc	aaa	gct	cag	ggc	ggt	cag	ctg	acc	gct	aaa	288

4

Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
				85					90					95		
ctg	ggt	tac	ccg	atc	act	gac	gat	ctg	gac	atc	tac	acc	cgt	ctg	ggc	336
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	
			100					105					110			
ggc	atg	gtt	tgg	cgc	gct	gac	tcc	aaa	ggc	aac	tac	gct	tct	acc	ggc	384
Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	
		115					120					125				
gtt	tcc	cgt	agc	gaa	cac	gac	act	ggc	gtt	tcc	cca	gta	ttt	gct	ggc	432
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	
	130					135					140					
ggc	gta	gag	tgg	gct	gtt	act	cgt	gac	atc	gct	acc	cgt	ctg	gaa	tac	480
Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	
145				150					155					160		
cag	tgg	gtt	aac	aac	atc	ggc	gac	gcg	ggc	act	gtg	ggc	acc	cgt	cct	528
Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	
			165					170					175			
gat	aac	ggc	atg	ctg	agc	ctg	ggc	gtt	tcc	tac	cgc	ttc	ggt	cag	gaa	576
Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu	
		180					185						190			
gat	gct	gca	ccg	gtt	gtt	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gct	ccg	gaa	gtg	624
Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	
		195				200					205					
gct	acc	aag	cac	ttc	acc	ctg	aag	tct	gac	gtt	ctg	ttc	aac	ttc	aac	672
Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn	
	210					215					220					
aaa	gct	acc	ctg	aaa	ccg	gaa	ggc	cag	cag	gct	ctg	gat	cag	ctg	tac	720
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr	
225				230				235						240		
act	cag	ctg	agc	aac	atg	gat	ccg	aaa	gac	ggc	tcc	gct	gtt	gtt	ctg	768
Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	
			245					250					255			
ggc	tac	acc	gac	cgc	atc	ggc	tcc	gaa	gct	tac	aac	cag	cag	ctg	tct	816
Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	
			260					265					270			
gag	aaa	cgt	gct	cag	tcc	gtc	gtt	gac	tac	ctg	gtt	gct	aaa	ggc	atc	864
Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	
		275				280						285				
ccg	gct	ggc	aaa	atc	tcc	gct	cgc	ggc	atg	ggc	gaa	tcc	aac	ccg	gtt	912
Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	
	290				295						300					
act	ggc	aac	acc	tgt	gac	aac	gtg	aaa	gct	cgc	gct	gcc	ctg	atc	gat	960
Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	
305				310				315						320		
tgc	ctg	gct	ccg	gat	cgt	cgt	gta	gag	atc	gaa	gtt	aaa	ggc	tac	aaa	1008
Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys	
			325					330					335			
gaa	gtt	gta	act	cag	ccg	cag	ggc	ccc	ggg	gat	cct	atg	acc	gtg	aaa	1056
Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Gln	Gly	Pro	Gly	Asp	Pro	Met	Thr	Val	Lys	
			340				345					350				
acc	aaa	aac	acc	acg	acc	acc	cag	acc	cag	ccg	agc	aaa	ccg	acc	acc	1104
Thr	Lys	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	Gln	Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	
		355					360					365				
aaa	cag	cgt	cag	aac	aaa	ccg	ccg	aac	aaa	ccg	aac	aac	gat	ttc	cat	1152
Lys	Gln	Arg	Gln	Asn	Lys	Pro	Pro	Asn	Lys	Pro	Asn	Asn	Asp	Phe	His	
	370				375						380					
ttc	gaa	gtg	ttc	aac	ttc	gtg	ccg	tgc	agc	atc	tgc	agc	aac	aac	ccg	1200
Phe	Glu	Val	Phe	Asn	Phe	Val	Pro	Cys	Ser	Ile	Cys	Ser	Asn	Asn	Pro	
385				390						395				400		
acc	tgc	tgg	gcg	atc	tgc	aaa	cgt	atc	ccg	aac	aaa	aaa	ccg	ggc	aaa	1248
Thr	Cys	Trp	Ala	Ile	Cys	Lys	Arg	Ile	Pro	Asn	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	
			405					410					415			
aaa	acc	acg	acc	aaa	ccg	acc	aaa	aaa	ccg	acc	ttc	aaa	acc	acc	aaa	1296

5

Lys	Thr	Thr	Thr	Lys	Pro	Thr	Lys	Lys	Pro	Thr	Phe	Lys	Thr	Thr	Lys	
			420					425					430			
aaa	gat	cat	aaa	ccg	cag	acc	acc	aaa	ccg	aaa	gaa	gtg	ccg	acc	acc	1344
Lys	Asp	His	Lys	Pro	Gln	Thr	Thr	Lys	Pro	Lys	Glu	Val	Pro	Thr	Thr	
		435					440					445				
aaa	ccg	gtc	gac													1356
Lys	Pro	Val	Asp													
		450														

<210> 4
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> P40G2Na

<400> 4

Met	Lys	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Pro	Lys	Asp	Asn	Thr	Trp	
1				5				10					15			
Tyr	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Asp	Thr	Gly	Phe	
		20					25					30				
Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Gln	Asn	Asn	Asn	Gly	Pro	Thr	Arg	Asn	Asp	Gln	
		35				40						45				
Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	Gly	
	50					55					60					
Phe	Glu	Met	Gly	Tyr	Asp	Trp	Leu	Gly	Arg	Met	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	
65					70				75						80	
Val	Asp	Asn	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Thr	Ala	Lys	
			85					90						95		
Leu	Gly	Tyr	Pro	Ile	Thr	Asp	Asp	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Arg	Leu	Gly	
		100						105					110			
Gly	Met	Val	Trp	Arg	Ala	Asp	Ser	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ala	Ser	Thr	Gly	
	115					120						125				
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	His	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Pro	Val	Phe	Ala	Gly	
	130					135					140					
Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Tyr	
145					150					155					160	
Gln	Trp	Val	Asn	Asn	Ile	Gly	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	
			165					170						175		
Asp	Asn	Gly	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Phe	Gly	Gln	Glu	
		180					185						190			
Asp	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Val	
	195					200					205					
Ala	Thr	Lys	His	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	Asp	Val	Leu	Phe	Asn	Phe	Asn	
	210					215					220					
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	Gln	Leu	Tyr	
225					230					235					240	
Thr	Gln	Leu	Ser	Asn	Met	Asp	Pro	Lys	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Leu	
			245						250					255		
Gly	Tyr	Thr	Asp	Arg	Ile	Gly	Ser	Glu	Ala	Tyr	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	
		260						265					270			
Glu	Lys	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	
	275					280						285				
Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Met	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	Val	
	290					295					300					
Thr	Gly	Asn	Thr	Cys	Asp	Asn	Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Asp	
305					310					315					320	
Cys	Leu	Ala	Pro	Asp	Arg	Arg	Val	Glu	Ile	Glu	Val	Lys	Gly	Tyr	Lys	
			325						330					335		
Glu	Val	Val	Thr	Gln	Pro	Gln	Gly	Pro	Gly	Asp	Pro	Met	Thr	Val	Lys	
		340					345					350				
Thr	Lys	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	Gln	Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	Thr	
		355					360					365				

6

Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His
 370 375 380
 Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro
 385 390 395 400
 Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys
 405 410 415
 Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
 420 425 430
 Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr
 435 440 445
 Lys Pro Val Asp
 450

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> virus respiratoire syncytial (VRS)

<220>
 <223> G5

<400> 5
 Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> virus respiratoire syncytial (VRS)

<220>
 <223> CysG5

<400> 6
 Cys Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys
 1 5 10 15
 Pro

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> virus respiratoire syncytial (VRS)

<220>
 <223> G5Cys

<400> 7
 Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro
 1 5 10 15
 Cys

<210> 8
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> virus respiratoire syncytial (VRS)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(303)

<220>
 <223> G2Na

<400> 8
 acc gtg aaa acc aaa aac acc acg acc acc cag acc cag ccg agc aaa 48
 Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys
 1 5 10 15
 ccg acc acc aaa cag cgt cag aac aaa ccg ccg aac aaa ccg aac aac 96
 Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn
 20 25 30
 gat ttc cat ttc gaa gtg ttc aac ttc gtg ccg tgc agc atc tgc agc 144
 Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
 35 40 45
 aac aac ccg acc tgc tgg gcg atc tgc aaa cgt atc ccg aac aaa aaa 192
 Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
 50 55 60
 ccg ggc aaa aaa acc acg acc aaa ccg acc aaa aaa ccg acc ttc aaa 240
 Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys
 65 70 75 80
 acc acc aaa aaa gat cat aaa ccg cag acc acc aaa ccg aaa gaa gtg 288
 Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val
 85 90 95
 ccg acc acc aaa ccg 303
 Pro Thr Thr Lys Pro
 100

<210> 9
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> virus respiratoire syncytial (VRS)
 <223> G2Na

<400> 9
 Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys
 1 5 10 15
 Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn
 20 25 30
 Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
 35 40 45
 Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
 50 55 60
 Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys
 65 70 75 80
 Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val
 85 90 95
 Pro Thr Thr Lys Pro
 100

<210> 10
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> virus respiratoire syncytial (VRS)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(303)

<220>
 <223> G2Nb

<400> 10
 acc gcg cag acc aaa ggc cgt atc acc acc agc acc cag acc aac aaa 48
 Thr Ala Gln Thr Lys Gly Arg Ile Thr Thr Ser Thr Gln Thr Asn Lys
 1 5 10 15
 ccg agc acc aaa agc cgt agc aaa aac ccg ccg aaa aaa ccg aaa gat 96

REVENDICATIONS

1/ Utilisation d'une protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, associée à un peptide immunogène dérivé du virus respiratoire syncytial (VRS) pour la préparation d'une composition pharmaceutique administrable par voie nasale destinée à induire une réponse immunitaire protectrice de la voie respiratoire supérieure et/ou de la voie inférieure (poumons) d'un sujet contre l'infection par le VRS.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite entérobactérie est *Klebsiella pneumoniae*.

3/ Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la séquence d'acides aminés de ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, comprend :

a) la séquence d'acides aminés de séquence SEQ ID N° 2 ;
b) la séquence d'acides aminés d'une séquence présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ; ou

c) la séquence d'acides aminés d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N° 2.

4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, est obtenue par un procédé d'extraction à partir d'une culture de ladite entérobactérie.

5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, ou ledit peptide immunogène est obtenue par voie recombinante.

6/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est choisi parmi les peptides dérivés de la protéine G, F, M2 ou N du VRS.

7/ Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est un peptide dérivé de la protéine G.

8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est un fragment de la protéine G comprenant un épitope de type B.

9/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est choisi parmi les peptides de séquence SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11 ou de séquence présentant un pourcentage

d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N° 11.

10/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA d'entérobactérie, ou l'un de ses fragments, ou ledit peptide immunogène, ladite construction nucléique étant contenue dans un vecteur d'expression ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA d'entérobactérie et/ou ledit peptide immunogène.

11/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ledit peptide immunogène est couplé par liaison covalente avec ladite protéine OmpA ou l'un de ses fragments, pour former une protéine hybride.

12/ Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que le couplage par liaison covalente est un couplage réalisé par synthèse chimique.

13/ Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il est introduit un ou plusieurs éléments de liaison dans ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, et/ou dans ledit peptide immunogène pour faciliter le couplage chimique.

14/ Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit élément de liaison introduit est un acide aminé.

15/ Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite protéine hybride est une protéine de fusion exprimée par une cellule transformée avec une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride.

16/ Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend une construction nucléique codant pour ladite protéine hybride, notamment contenue dans un vecteur d'expression, ou dans une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine hybride.

17/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que ladite composition pharmaceutique est véhiculée sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son immunogénicité.

18/ Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit véhicule est un liposome, un vecteur viral contenant une construction nucléique codant pour ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit peptide immunogène, ou ladite protéine hybride, ou une cellule hôte transformée capable d'exprimer ladite protéine OmpA, ou l'un de ses fragments, ledit peptide immunogène, ou ladite protéine hybride.

19/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 18, pour la préparation d'une composition pharmaceutique, notamment vaccinale, destinée à prévenir ou à traiter les infections au VRS.

1/3

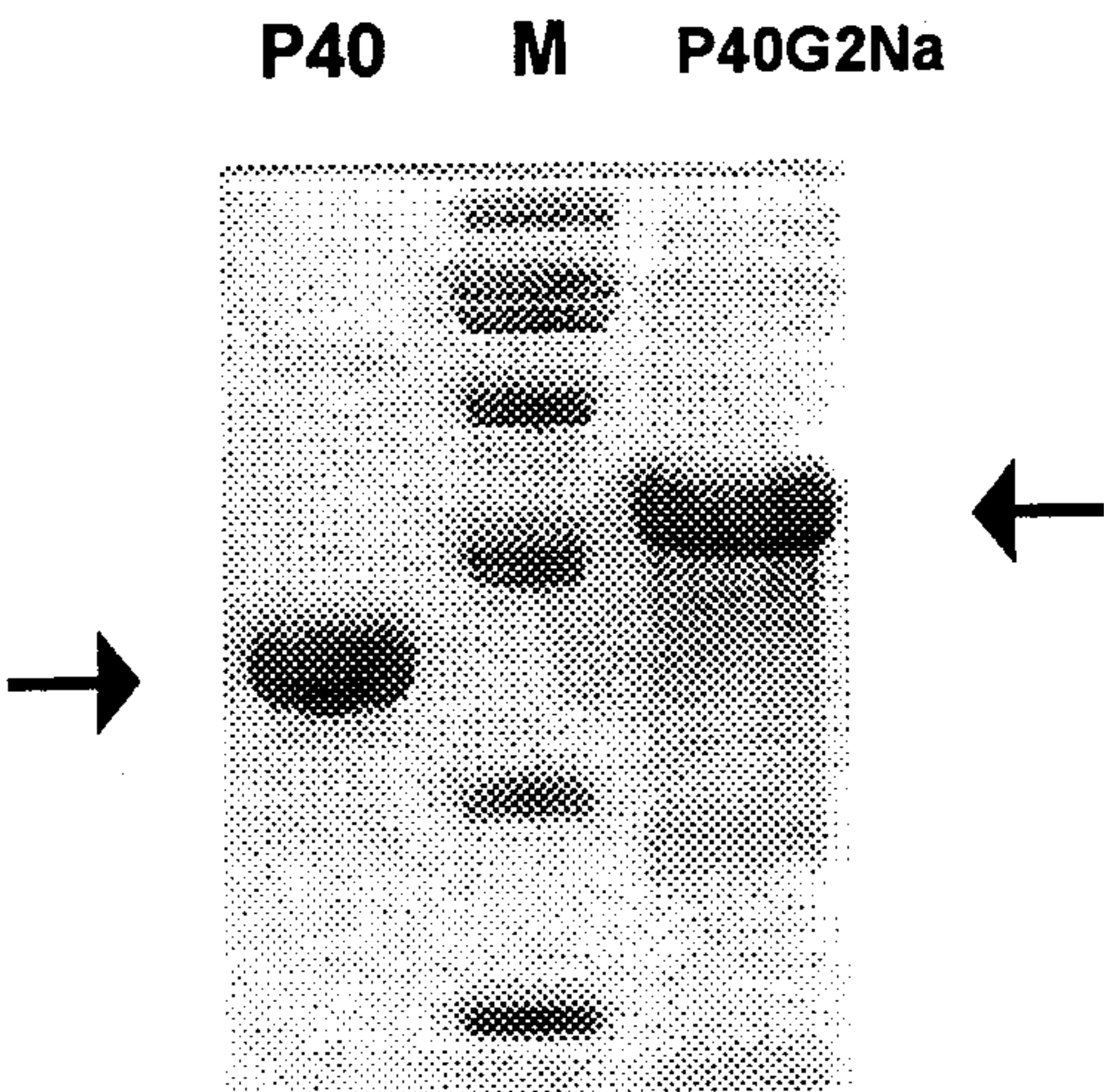


FIGURE 1

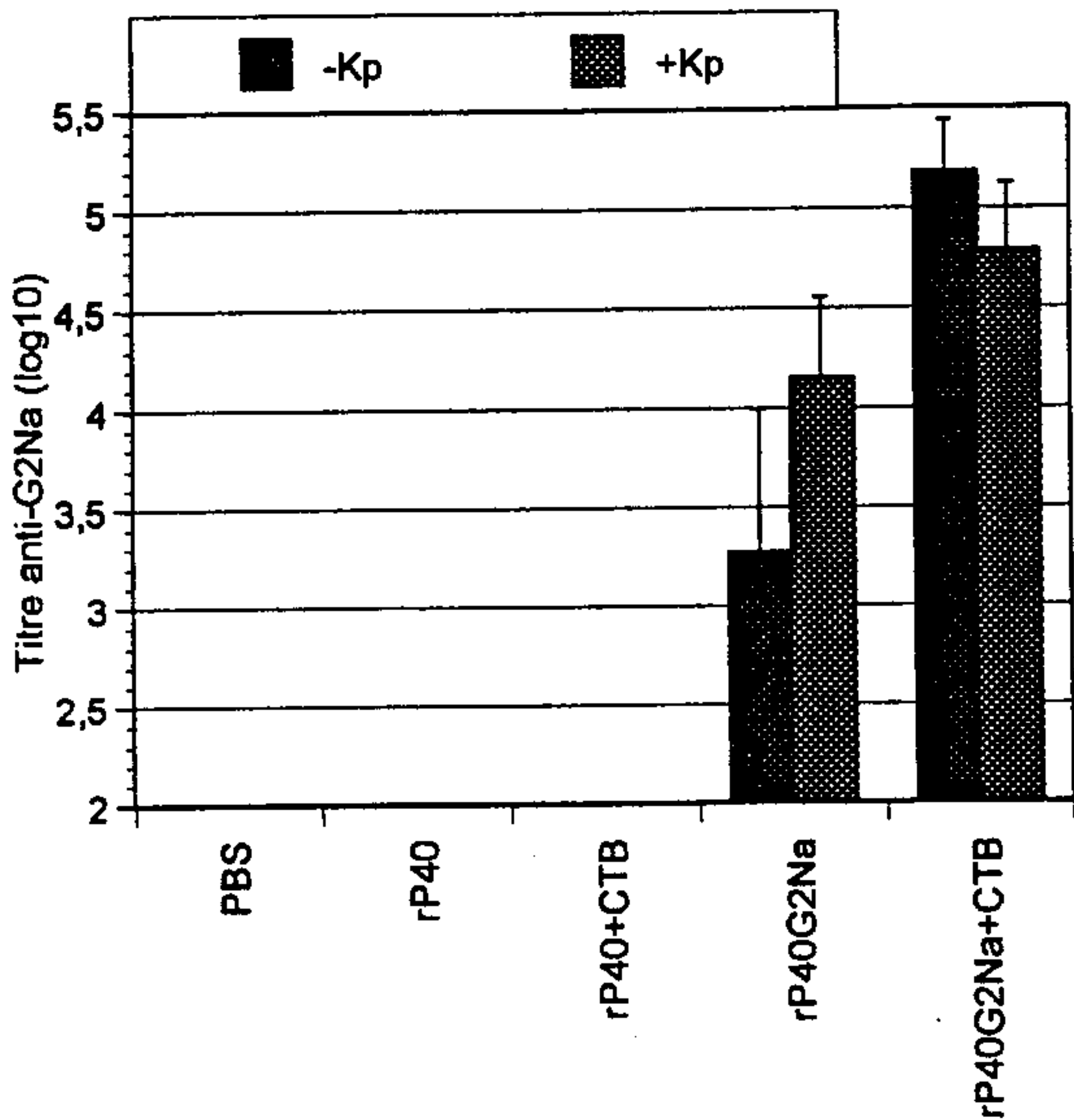


FIGURE 2A

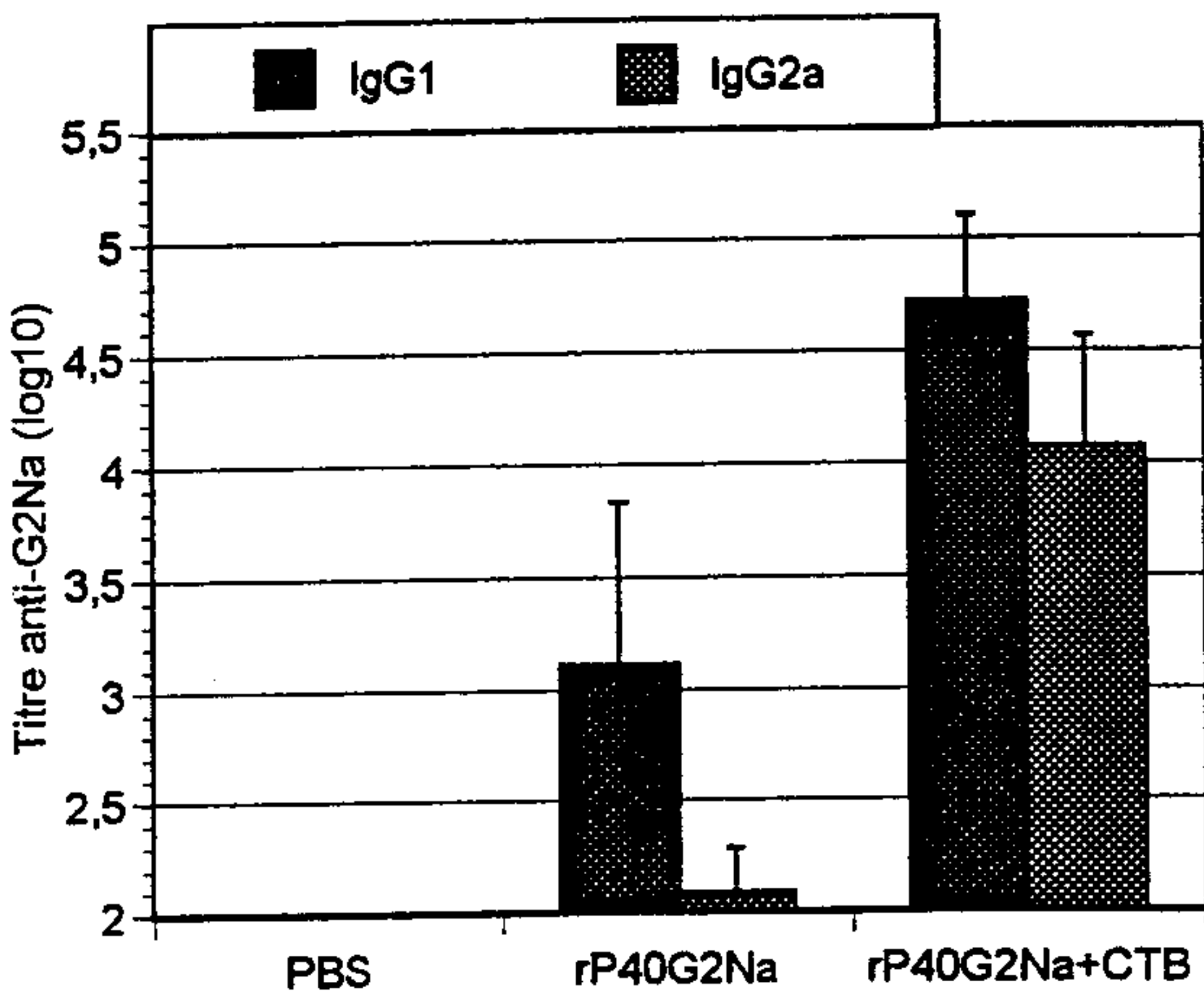


FIGURE 2B

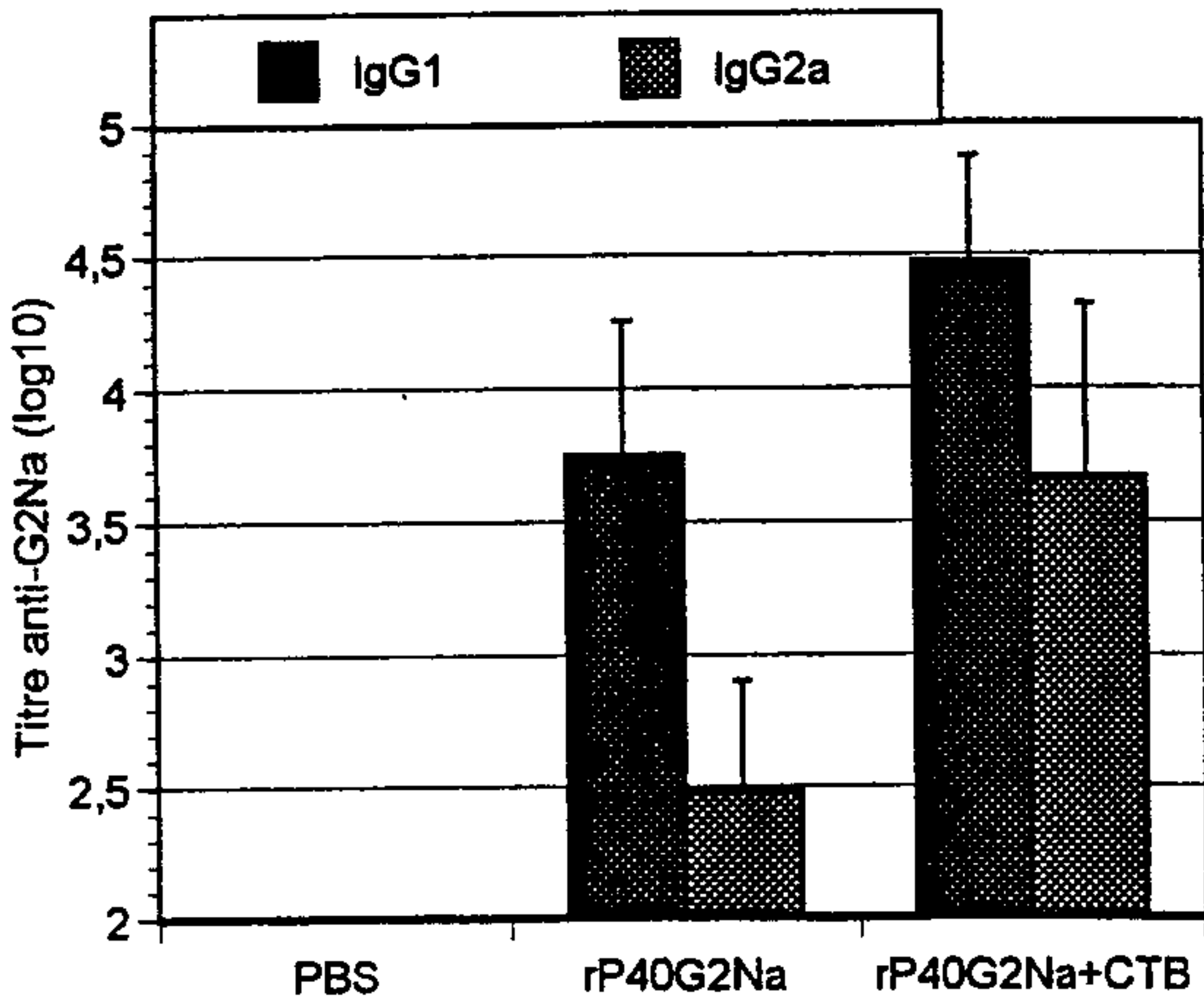


FIGURE 2C

2/3

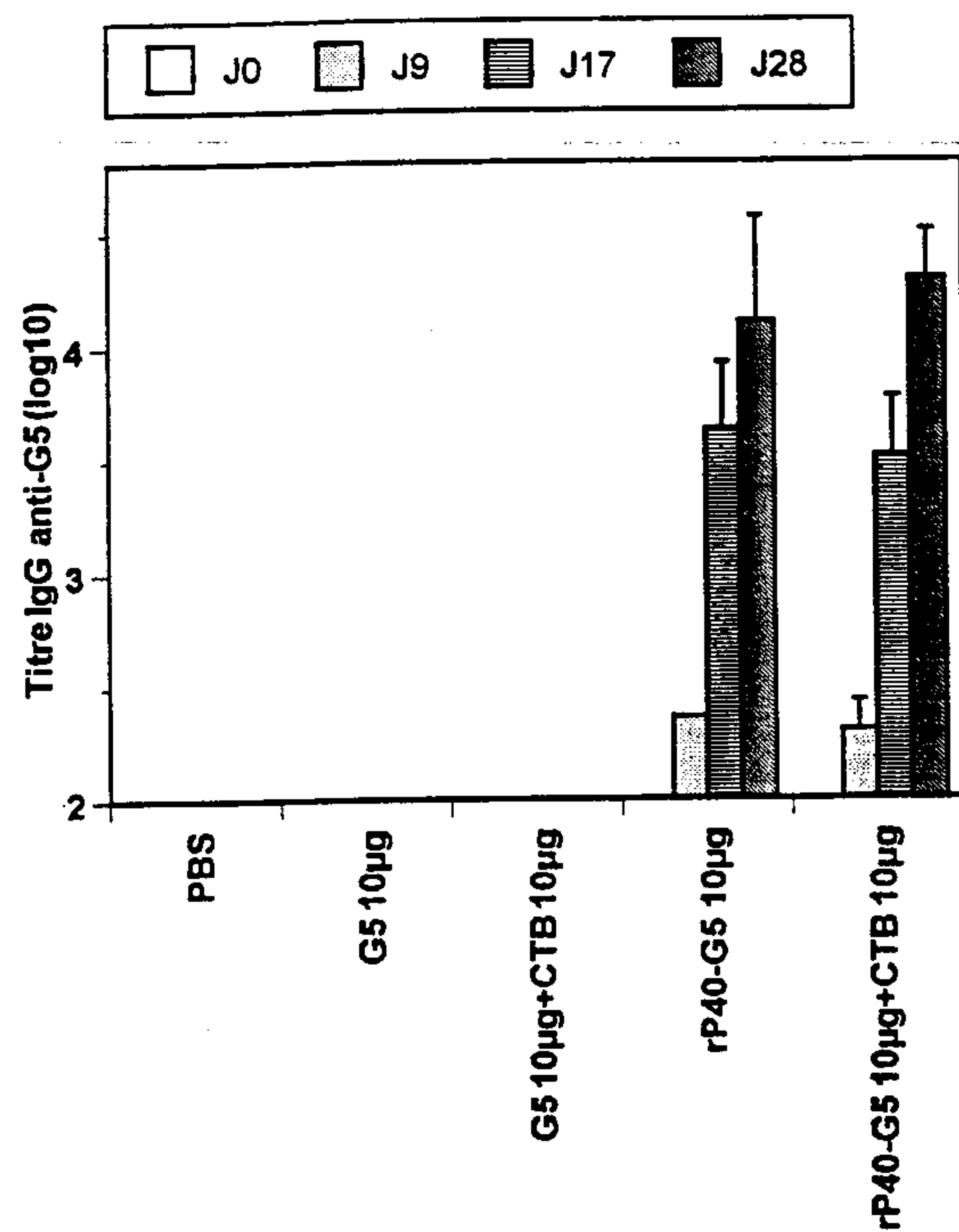


FIGURE 3A

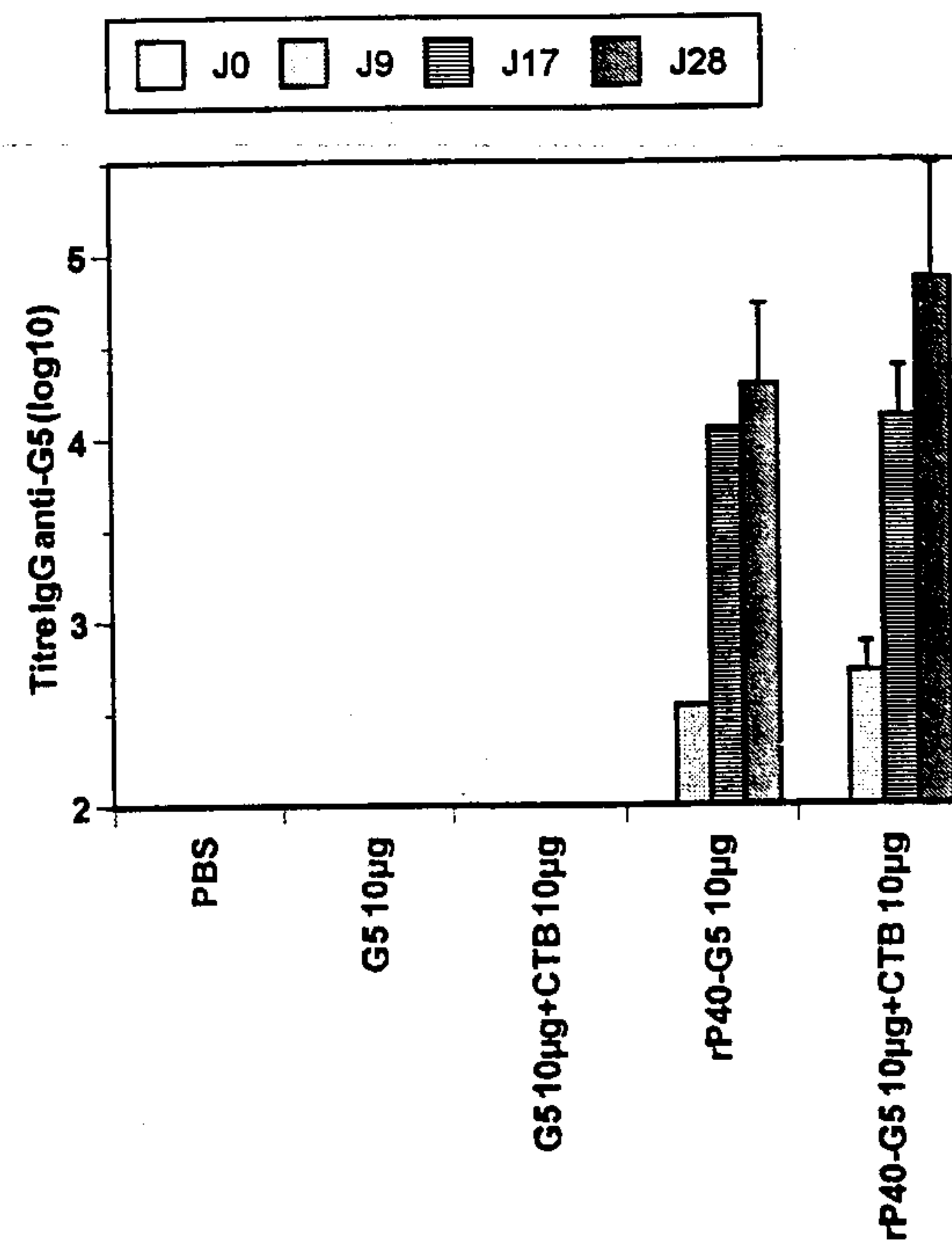


FIGURE 3B

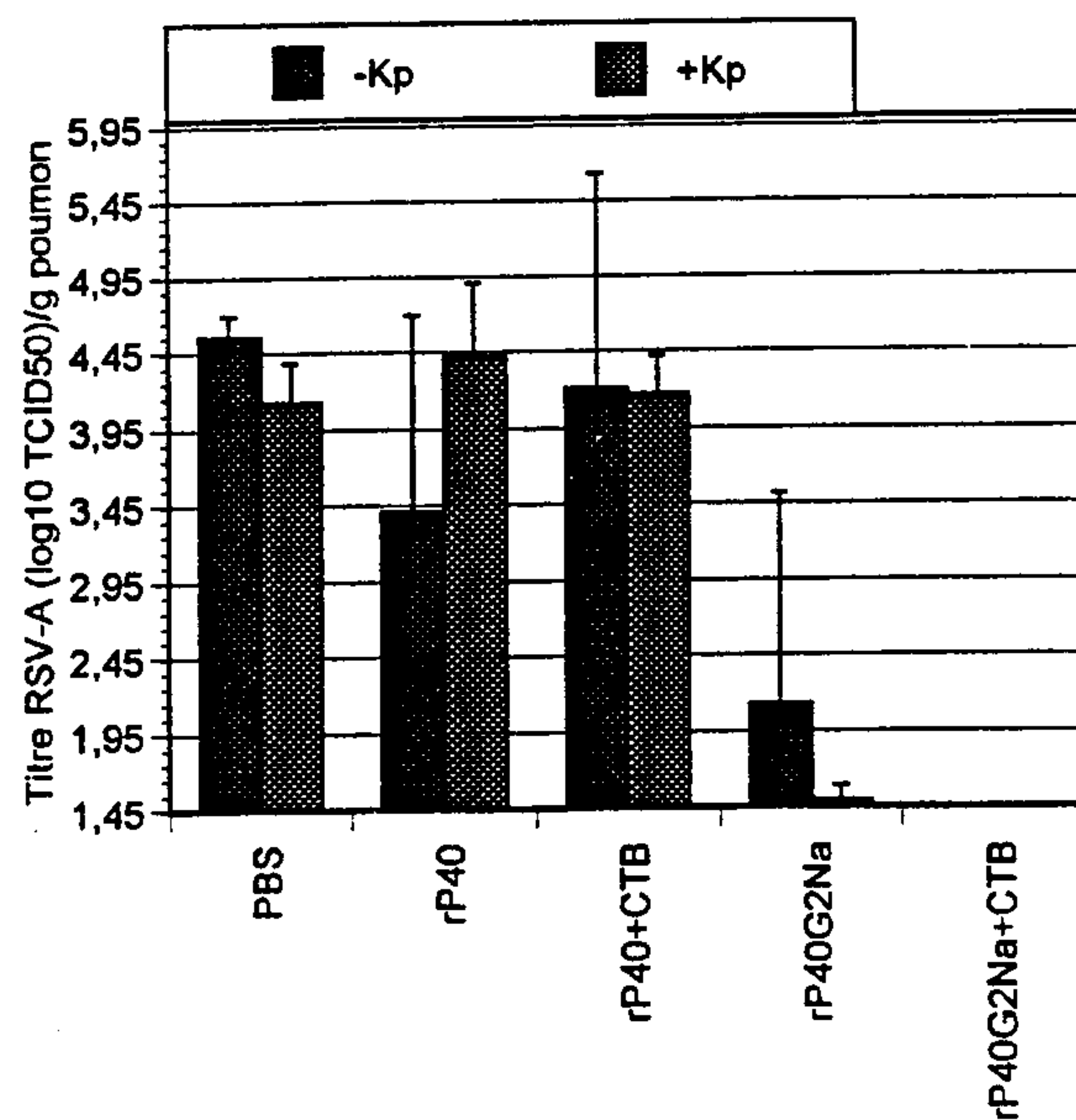


FIGURE 4A

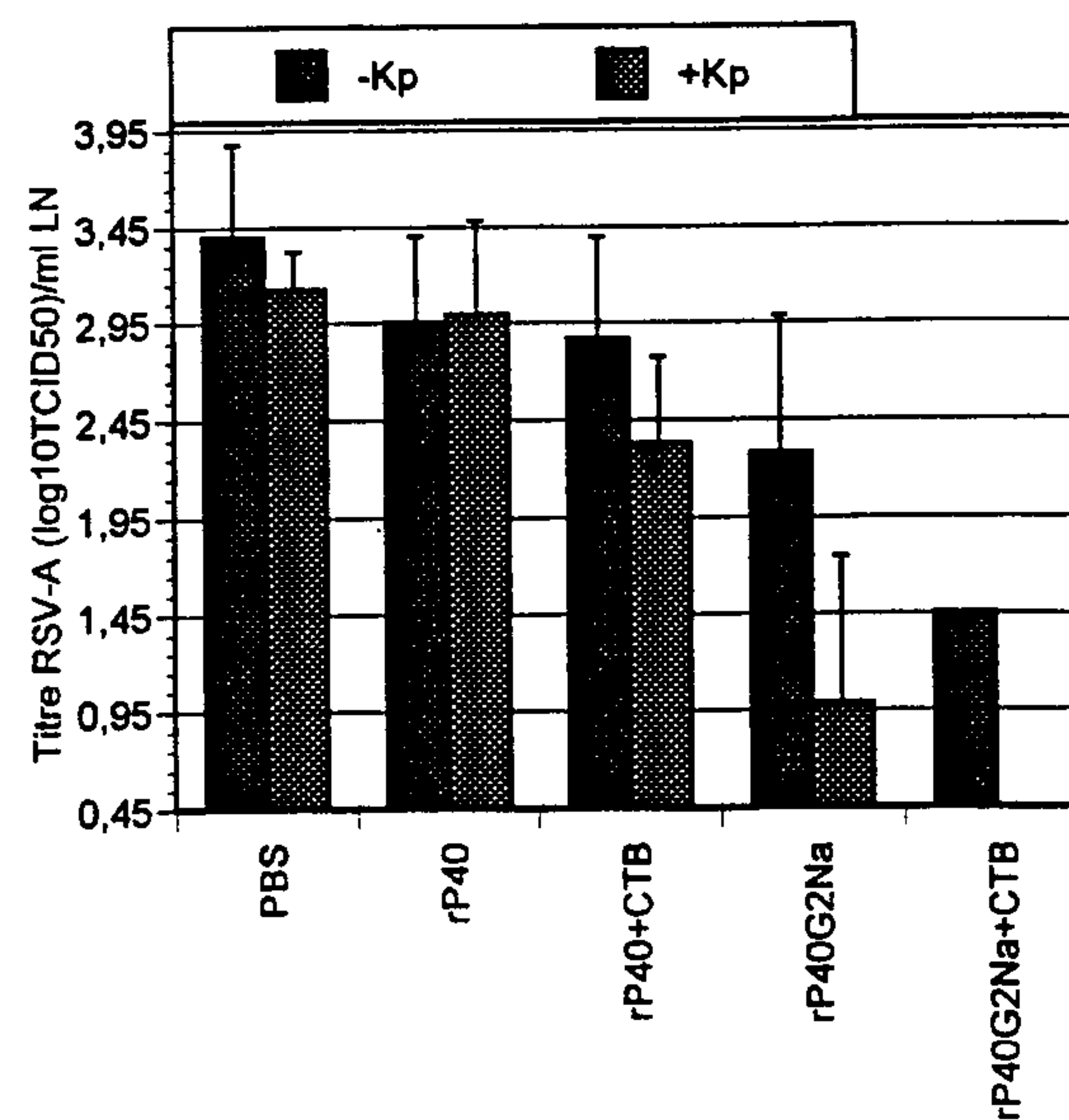


FIGURE 4B

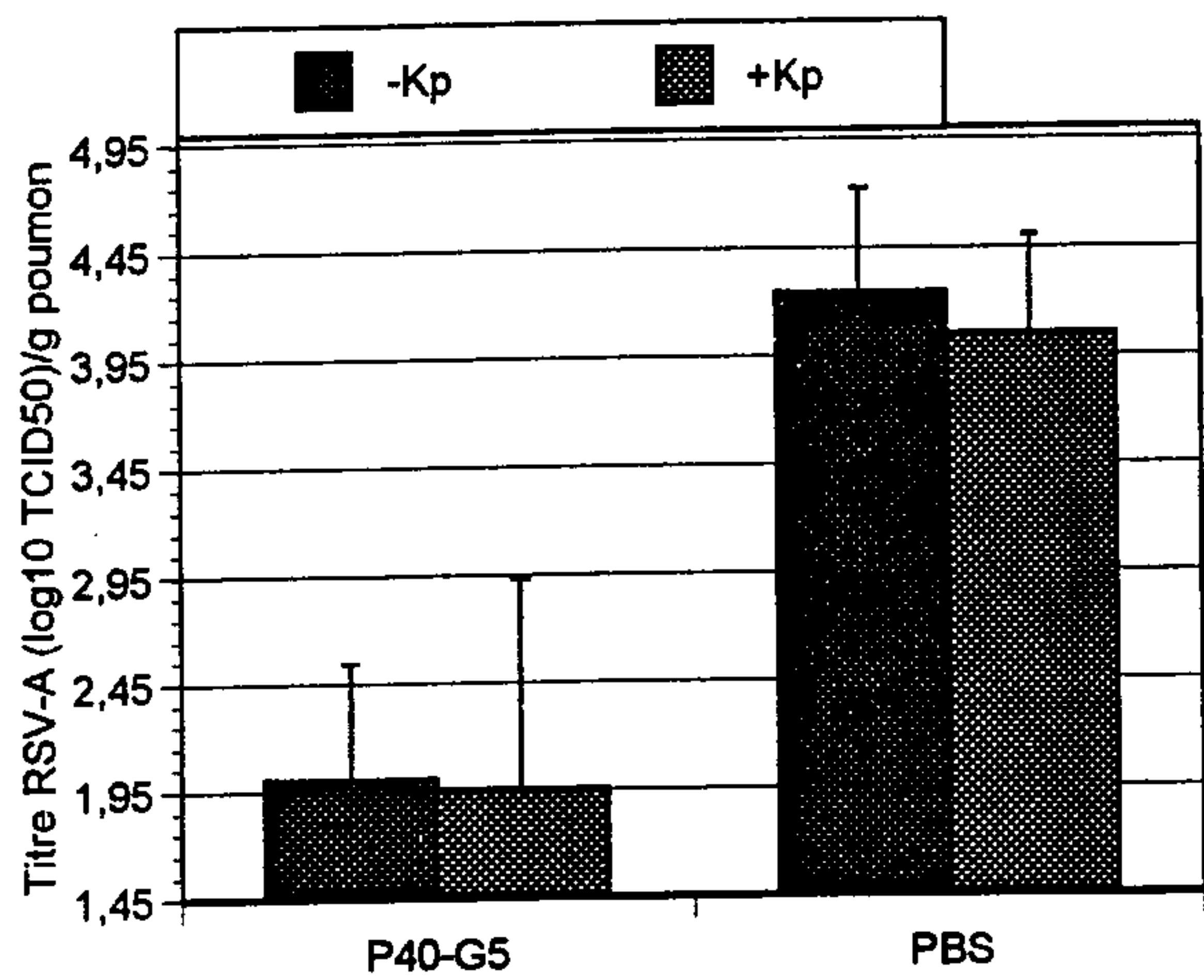


FIGURE 5A

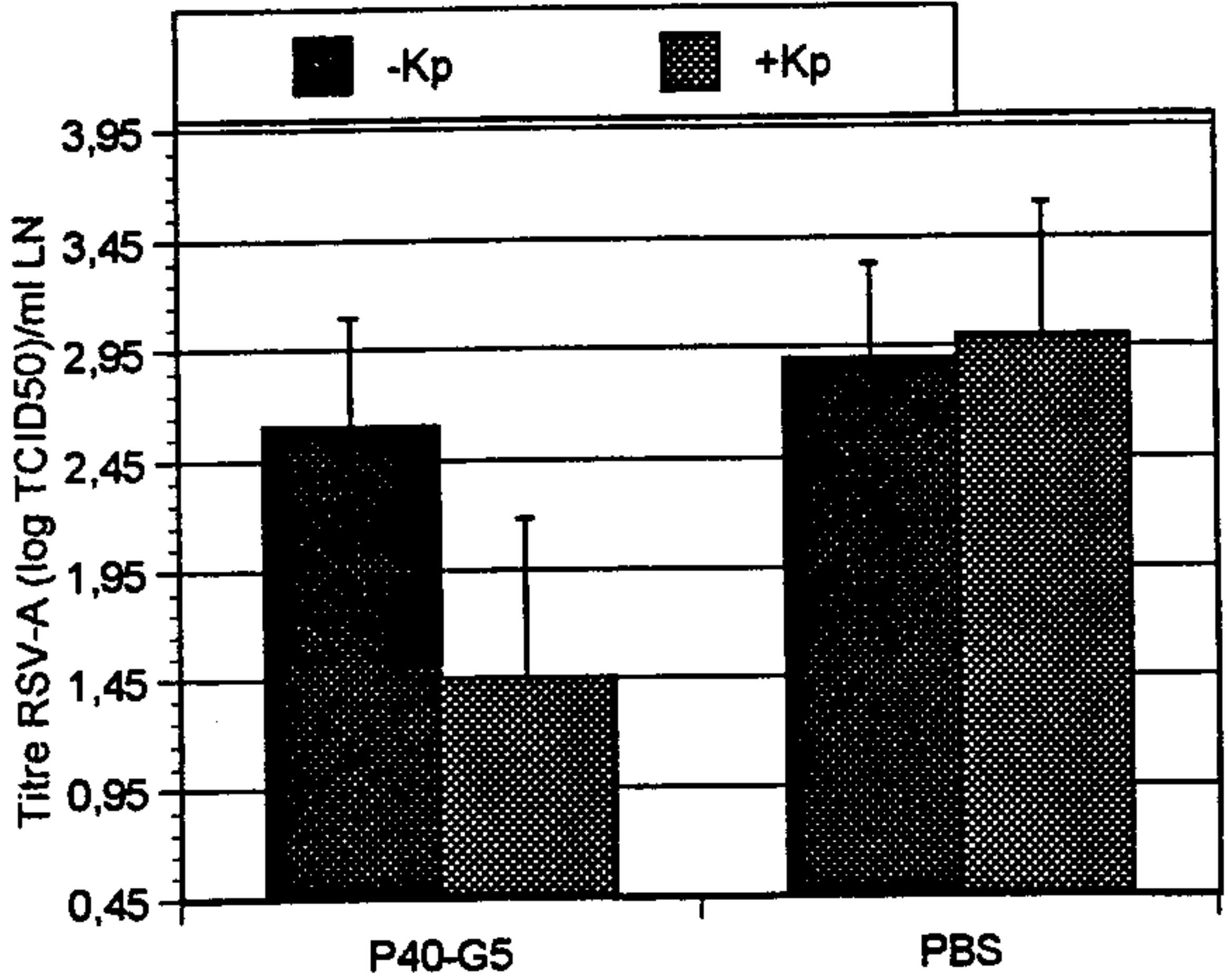


FIGURE 5B