



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

1021192 B1

Date de délivrance : 21/10/2016

## **BREVET D'INVENTION**

Date de priorité : 15/03/2013

Classification internationale : A61K 39/00, C07K 14/705

Numéro de dépôt : 2014/0166

Date de dépôt : 14/03/2014

Titulaire :

GlaxoSmithKline Biologicals s.a.  
1330, RIXENSART  
Belgique

Inventeur :

COLLOCA Stefano  
IT 00144 ROMA  
Italie

CORTESE Riccardo  
CH 4051 BASEL  
Suisse

FOLGORI Antonella.  
IT 00144 ROMA  
Italie

NICOSIA Alfredo  
IT 00144 ROMA  
Italie

**VACCINS POXVIRAUX AMELIORES.**

La présente demande concerne de nouveaux régimes d'administration pour des vecteurs poxviraux comprenant des constructions d'acide nucléique codant pour des protéines antigéniques et des chaînes invariantes. En particulier, il est décrit l'utilisation desdits vecteurs poxviraux pour l'amorçage ou pour la stimulation d'une réponse immunitaire.

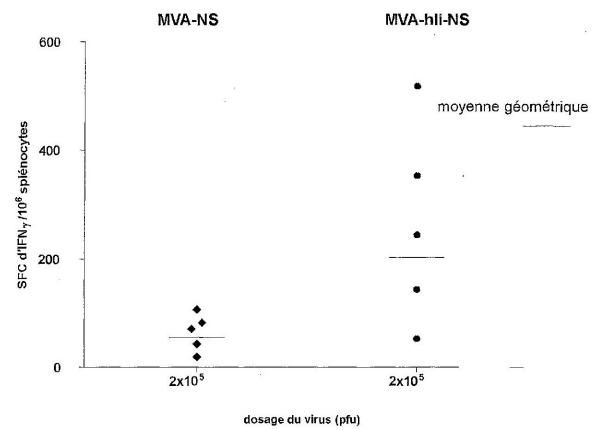


Figure 1

N

**Vaccins poxviraux améliorés**

La présente demande concerne des vaccins poxviraux améliorés comprenant des constructions d'acide nucléique codant pour des protéines antigéniques et des chaînes invariantes et de nouveaux régimes d'administration pour de tels vecteurs poxviraux. En particulier, il est décrit l'utilisation de divers vecteurs poxviraux pour amorcer ou pour stimuler une réponse immunitaire.

Contexte de l'invention

Les maladies infectieuses représentent encore une menace majeure pour l'humanité. Un moyen pour prévenir ou traiter des maladies infectieuses est l'induction artificielle d'une réponse immunitaire par une vaccination qui est l'administration de matériau antigénique à un individu de telle manière qu'il se développe une réponse immunitaire adaptative contre l'antigène respectif. Le matériau antigénique peut être des agents pathogènes (par exemple, des micro-organismes ou des virus) qui sont structuralement intacts mais inactivés (c'est-à-dire, non infectieux) ou qui sont atténués (c'est-à-dire, avec une infectivité réduite), ou des composants purifiés de l'agent pathogène qui ont été trouvés comme étant hautement immunogènes. Une autre approche pour l'induction d'une réponse immunitaire contre un agent pathogène est la fourniture de systèmes d'expression comprenant un ou plusieurs vecteurs codant pour des protéines ou des peptides immunogènes de l'agent pathogène. Un tel vecteur peut être sous la forme d'ADN plasmidique nu, ou les protéines ou les peptides immunogènes peuvent être délivrés en utilisant des vecteurs viraux, par exemple sur la base de virus modifiés de la vaccine (par exemple, le virus modifié de la vaccine Ankara ; MVA) ou des vecteurs adénoviraux. De tels

systèmes d'expression présentent l'avantage de comprendre des composants bien caractérisés présentant une faible sensibilité envers les conditions environnementales.

Un objectif particulier lors du développement de systèmes d'expression à base de vecteurs est que l'application de ces systèmes d'expression à un patient déclenche une réponse immunitaire qui est protectrice contre l'infection par l'agent pathogène respectif. Toutefois, bien qu'induisant une réponse immunogène contre l'agent pathogène, certains systèmes d'expression ne sont pas capables de déclencher une réponse immunitaire suffisamment forte pour protéger totalement contre des infections par l'agent pathogène. Par conséquent, il demeure toujours un besoin de systèmes d'expression améliorés qui sont capables d'induire une réponse immunitaire protectrice contre un agent pathogène ainsi que de nouveaux régimes d'administration de systèmes d'expression connus qui déclenchent des réponses immunitaires amplifiées.

Les antigènes sont des fragments de peptides présentés à la surface de cellules de présentation de l'antigène par des molécules du CMH. Les antigènes peuvent être d'origine étrangère, c'est-à-dire pathogènes, ou issus de l'organisme lui-même, ces derniers étant nommés auto-antigènes. Il existe deux classes de molécules du CMH, la classe I du CMH (CMH-I) et la classe II du CMH (CMH-II). Les molécules du CMH-I présentent des fragments de peptides qui sont synthétisés au sein de la cellule respective. Les molécules du CMH-II présentent des fragments de peptides qui sont absorbés par phagocytose et ensuite digérés dans l'endosome. Généralement les molécules du CMH-II sont uniquement exprimées par des cellules de présentation de l'antigène « professionnelles » telles que les macrophages ou les cellules dendritiques. Les antigènes liés aux molécules du CMH-II sont reconnus par les cellules T auxiliaires. La liaison du récepteur de cellule T

d'une cellule T auxiliaire à un antigène présenté par une molécule du CMH-II, conjointement avec des cytokines sécrétées par les cellules de présentation de l'antigène, induit la maturation d'une cellule T auxiliaire immature du phénotype TH<sub>0</sub> en divers types de cellules effectrices.

Les molécules du CMH-II sont des récepteurs liés à la membrane qui sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique et quittent le réticulum endoplasmique dans un compartiment du CMH de classe II. Afin d'empêcher des peptides endogènes, c'est-à-dire des auto-antigènes, de se lier à la molécule du CMH-II, la molécule naissante du CMH-II se combine avec une autre protéine, la chaîne invariante, ce qui bloque l'espace de liaison des peptides de la molécule du CMH-II. Lorsque le compartiment du CMH de classe II fusionne avec un endosome tardif contenant des protéines phagocytées et dégradées, la chaîne invariante est clivée pour ne laisser que la région CLIP liée à la molécule du CMH-II. Dans une seconde étape, la région CLIP est éliminée par une molécule HLA-DM laissant la molécule du CMH-II libre pour lier des fragments de l'antigène étranger. Lesdits fragments sont présentés à la surface de la cellule de présentation de l'antigène une fois que le compartiment du CMH de classe II fusionne avec la membrane plasmatique, présentant ainsi les antigènes étrangers à d'autres cellules, principalement des cellules T auxiliaires.

Il a été découvert antérieurement (WO 2007/062656, lequel publié en tant que US 2011/0293704 et incorporé par référence dans le but de décrire des séquences de chaînes invariantes) que la fusion de la chaîne invariante à un antigène qui est compris dans un système d'expression utilisé pour la vaccination augmente la réponse immunitaire contre ledit antigène, s'il est administré avec un adénovirus. En outre, ladite construction adénovirale s'est révélée utile pour amorcer une réponse immunitaire dans le contexte d'un régime

de primovaccination-rappel (WO 2010/057501, lequel publié en tant que US 2010/0278904 et incorporé par référence dans le but de décrire des vecteurs adénoviraux codant pour des séquences de chaînes invariantes). Les présents inventeurs ont  
5 découvert de manière surprenante que la réponse immunitaire contre un antigène donné peut être même amplifiée, si à la place d'un adénovirus, un poxvirus est utilisé pour la production de la fusion chaîne invariante-antigène. De cette manière, une réponse immunitaire peut être générée. Il est  
10 particulièrement surprenant que les vecteurs poxviraux aient déclenché cet effet également lorsqu'ils sont utilisés pour amorcer une réponse immunitaire.

#### Résumé de l'invention

15 Dans un premier aspect, la présente invention concerne un vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique pour une utilisation dans l'amorçage ou la stimulation d'une réponse immunitaire, le produit d'assemblage d'acide nucléique comprenant :

20 (i) une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci lié de manière fonctionnelle à

(ii) un acide nucléique codant pour au moins une chaîne invariante.

25

Dans un autre aspect, la présente invention concerne une combinaison vaccinale comprenant :

(a) un vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique, la construction d'acide nucléique  
30 comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une première protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci lié de manière fonctionnelle à

(ii) un acide nucléique codant pour au moins une chaîne invariante

et

(b) un vecteur viral comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci

ou

une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci

où au moins un épitope de la première protéine antigénique ou d'un fragment antigénique de celle-ci est immunologiquement identique à la seconde protéine antigénique ou à un fragment de celle-ci.

Dans encore un autre aspect, la présente invention concerne la combinaison vaccinale décrite ci-dessus, pour une utilisation dans un régime de primovaccination-rappel. Des procédés d'utilisation de tels vecteurs poxviraux et de telles combinaisons sont également proposés.

## Description détaillée de l'invention

Sauf définition contraire, tous les termes techniques et scientifiques utilisés dans ce document ont les mêmes significations que celles comprises de manière courante par une personne de compétence moyenne dans le domaine.

Par exemple, les termes utilisés dans ce document sont définis comme il est décrit dans "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Klbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Bale, Suisse).

Dans toute la description et dans les revendications qui suivent, sauf si le contexte requiert le contraire, le terme « comprendre », et des variations comme « comprend » et « comprenant », seront compris comme impliquant l'inclusion

d'un nombre entier ou d'une étape indiqué(e) ou d'un groupe de nombres entiers ou d'étapes mais pas l'exclusion de tout(e) autre nombre entier ou étape ou groupe de nombres entiers ou d'étapes.

5           Plusieurs documents sont cités dans tout le texte de la description. Chacun des documents cités dans la présente demande (y compris tous les brevets, les demandes de brevets, les publications scientifiques, les spécifications des fabricants, les instructions, etc.), que ce soit au-dessus ou  
10           au-dessous, est incorporé par référence dans son intégralité. Rien ne doit être interprété dans cette demande comme une admission que l'invention ne doit pas être considérée à antidater ces divulgations par l'effet d'une invention antérieure. Toutes les définitions fournies dans ce document  
15           dans le contexte d'un aspect de l'invention s'appliquent également aux autres aspects de l'invention.

          Le problème sous-jacent de la présente invention est résolu par les modes de réalisation caractérisés dans les revendications et dans la description ci-dessous.

20           Dans un premier aspect, la présente invention concerne un vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique pour une utilisation dans l'amorçage ou la stimulation d'une réponse immunitaire, la construction d'acide nucléique comprenant :

25           (i) une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une séquence antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci lié de manière fonctionnelle à

          (ii) un acide nucléique codant pour au moins une chaîne invariante.

30           Tel qu'utilisé dans ce document, le terme « vecteur poxviral » se rapporte à un membre existant à l'état naturel de la famille des poxviridés ou à un vecteur viral dérivé de celui-ci qui est capable d'introduire le produit d'assemblage



d'acide nucléique dans une cellule d'un individu. Dans le contexte de la présente invention, il est envisagé que l'antigène et la chaîne invariante codés par la construction d'acide nucléique introduite soit exprimés au sein de ladite  
5 cellule après l'introduction par le vecteur poxviral.

La famille des poxviridés est caractérisée par un génome constitué d'ADN double brin. De manière appropriée, le vecteur poxviral appartient à la sous-famille des chordopoxvirinés, de manière préférée à un genre dans ladite sous-famille choisi  
10 dans le groupe constitué des genres orthopox, parapox, yatapox, avipox (de préférence canarypox (ALVAC) ou fowlpox (FPV)) et molluscipox. De manière encore plus préférée, le vecteur poxviral appartient au genre orthopox et est choisi dans le groupe constitué du virus de la vaccine, le virus  
15 NYVAC (dérivé de la souche Copenhague de la vaccine), le virus de la vaccine Ankara modifié (MVA), le virus cowpox et le virus monkeypox. De manière préférée entre toutes, le vecteur poxviral est le MVA.

Une description du MVA peut être trouvée dans Mayr A, Stickl H, Müller HK, Danner K, Singer H. "The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism. "Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes  
20 MVA." Zentralbl Bakteriол B. 1978 Dec; 167(5-6): 375-90 et dans Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H. (1975). Infection 3, 6-14.

Le MVA est une souche hautement atténuée du virus de la vaccine qui a subi de multiples délétions totalement  
30 caractérisées durant plus de 570 passages dans des cellules de fibroblastes d'embryons de poulet. Celles-ci comprenaient des gènes du spectre de l'hôte et des gènes codant pour des récepteurs de cytokines. Le virus est incapable de se

répliquer efficacement chez l'être humain et dans la plupart des cellules d'autres mammifères mais l'anomalie de la réplication apparaît à un stade tardif de l'assemblage des virions de telle manière que l'expression des gènes viraux et recombinaux n'est pas altérée, faisant du MVA un vecteur d'expression efficace en une seule série incapable de provoquer une infection chez les mammifères.

Dans un mode de réalisation, le MVA est dérivé du lot de semence virale 460 MG obtenu à partir du 571ème passage du virus de la vaccine sur des cellules CEF. Dans un autre mode de réalisation, le MVA est dérivé du lot de semence virale MVA 476 MG/14/78. Dans un autre mode de réalisation, le MVA est dérivé ou produit avant le 31 décembre 1978 et est dépourvu de contaminations par des prions.

D'autres vecteurs poxviraux pour l'utilisation de l'invention possèdent des propriétés similaires au MVA. En particulier, ils sont infectieux mais incompétents pour une réplication chez des êtres humains. A cause de ce trait, il peut être nécessaire d'exprimer les protéines en trans pour la réplication. De manière générale, ces protéines sont exprimées de manière stable ou transitoire dans une lignée cellulaire productrice de virus, permettant de cette manière la réplication du virus.

Le terme « acide nucléique » se rapporte à une macromolécule polymère faite de monomères nucléotidiques. Les monomères nucléotidiques sont composés d'une nucléobase, d'un sucre à cinq atomes de carbone (tels que, mais sans limitation, le ribose ou le 2'-désoxyribose), et d'un à trois groupes phosphate. De manière générale, un polynucléotide est formé par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester entre les monomères nucléotidiques individuels. Dans le contexte de la présente invention, les molécules d'acide nucléique comprennent, mais sans limitation, l'acide

ribonucléique (ARN) et l'acide désoxyribonucléique (ADN). En outre, le terme « polynucléotide » comprend également des analogues artificiels d'ADN ou d'ARN, comme un acide nucléique peptidique (PNA).

5 Le terme « construction d'acide nucléique » se rapporte à un acide nucléique qui code pour au moins une protéine antigénique et au moins une chaîne invariante. De manière appropriée, ledit acide nucléique comprend en outre des éléments qui dirigent la transcription et la traduction des  
10 polypeptides codés par la construction d'acide nucléique. De tels éléments comprennent des éléments promoteurs et amplificateurs pour diriger la transcription de l'ARNm dans un système acellulaire ou un système à base de cellules, par exemple un système à base de cellules. De manière appropriée,  
15 un tel promoteur et/ou amplificateur est un promoteur et/ou amplificateur endogène du vecteur poxviral. Si la construction d'acide nucléique est fournie sous la forme d'un ARN pouvant être traduit, il est envisagé que la construction d'acide nucléique comprenne ces éléments qui sont nécessaires à la  
20 traduction et/ou à la stabilisation des ARN codant pour au moins un polypeptide immunogène, par exemple, une queue polyA, des IRES, des structures de coiffe, etc.

Le terme « substantiellement similaire », s'il est utilisé en relation avec des séquences d'acide nucléique ou  
25 des séquences d'acides aminés se rapporte à un degré d'identité de séquence de plus de 80 %, plus de 85 %, plus de 90 %, plus de 95 %, plus de 98 %, ou plus de 99 % avec la séquence nucléotidique ou d'acides aminés de référence indiquée, respectivement.

30 Les résidus dans deux polypeptides ou plus sont dits « correspondre » les uns avec les autres si les résidus ou un groupe de résidus occupent une ou plusieurs positions analogues dans les structures polypeptidiques. Comme il est

bien connu dans l'art, des positions analogues dans deux polypeptides ou plus peuvent être déterminées en alignant les séquences polypeptidiques en se basant sur les similarités des séquences d'acides aminés ou structurales. De tels outils d'alignement sont bien connus de l'homme du métier et peuvent être obtenus, par exemple, sur l'Internet, par exemple, ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) ou Align ([www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html](http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html)) en utilisant des réglages classiques, par exemple pour Align, Impression : aiguille, Matrice : Blosom62, Ouverture de brèche 10,0, Extension de brèche 0,5. L'homme du métier comprendra qu'il peut être nécessaire d'introduire des brèches dans l'une ou l'autre séquence pour produire un alignement satisfaisant. Les résidus sont dits « correspondre » si les résidus sont alignés dans le meilleur alignement des séquences. Le « meilleur alignement des séquences » entre deux polypeptides est défini comme l'alignement qui produit le plus grand nombre de résidus identiques alignés. La « région du meilleur alignement des séquences » se termine et, ainsi, détermine les bornes et les limites de la longueur de la séquence de comparaison dans l'objectif de la détermination du score de similarité, si la similarité ou l'identité de séquence entre deux séquences alignées chute à moins de 30 %, moins de 20 %, ou moins de 10 % sur une longueur de 10, 20 ou 30 acides aminés.

Comme il a été souligné ci-dessus, il est envisagé que le vecteur de la présente invention soit un vecteur poxviral. Ainsi, si ledit vecteur poxviral est compétent pour la réplique, la construction d'acide nucléique est composée d'une plus grosse molécule d'acide nucléique qui comprend en outre des séquences d'acide nucléique qui sont requises pour la réplique du vecteur viral et/ou des éléments régulateurs dirigeant l'expression du polypeptide codé par la construction d'acide nucléique.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci et la chaîne invariante sont compris par un seul cadre ouvert de lecture de telle manière que la transcription et la traduction dudit cadre ouvert de lecture aboutit à une protéine de fusion comprenant la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci et la chaîne invariante.

Le terme « cadre ouvert de lecture » (ORF) se rapporte à une séquence de nucléotides, qui peuvent être traduits en acides aminés. De manière générale, un tel ORF contient un codon de départ, une région subséquente ayant habituellement une longueur qui est un multiple de 3 nucléotides, mais qui ne contient pas de codon stop (TAG, TAA, TGA, UAG, UAA, ou UGA) dans le cadre de lecture donné. De manière générale, les ORF existent à l'état naturel ou sont construits artificiellement, c'est-à-dire, par des moyens technologiques à base de gènes. Un ORF code pour une protéine où les acides aminés en lesquels elle peut être traduite forment une chaîne à liaisons peptidiques.

Les termes « protéine », « polypeptide » et « peptide » sont utilisés ici de manière interchangeable et se rapportent à toute chaîne d'acides aminés à liaisons peptidiques, sans tenir compte de la longueur, des modifications cotraductionnelles ou posttraductionnelles.

Le terme « posttraductionnel » utilisé dans ce document se rapporte à des événements qui surviennent après la traduction d'un triplet nucléotidique en un acide aminé et à la formation d'une liaison peptidique à l'acide aminé précédent dans la séquence. De tels événements posttraductionnels peuvent survenir après la formation du polypeptide entier ou déjà durant le processus de traduction sur ces parties du polypeptide qui ont été déjà traduites. Généralement, les événements posttraductionnels altèrent ou

modifient les propriétés chimiques ou structurales du polypeptide résultant. Les exemples d'événements posttraductionnels comprennent, mais sans limitation, des événements comme la glycosylation ou la phosphorylation des acides aminés, ou le clivage de la chaîne peptidique, par exemple, par une endopeptidase.

Le terme « cotraductionnel » utilisé dans ce document se rapporte à des événements qui surviennent durant le processus de traduction d'un triplet nucléotidique en une chaîne d'acides aminés. Généralement, ces événements altèrent ou modifient les propriétés chimiques ou structurales de la chaîne d'acides aminés résultante. Les exemples d'événements cotraductionnels comprennent, mais sans limitation, des événements qui peuvent entièrement stopper le processus de traduction ou interrompre la formation des liaisons peptidiques aboutissant à deux produits de traduction distincts.

Les protéines utilisables dans la présente invention (y compris des dérivés de protéines, des variants de protéines, des fragments de protéines, des segments de protéines, des épitopes de protéines et des domaines de protéines) peuvent être en outre modifiées par une modification chimique. Par conséquent, un tel polypeptide chimiquement modifié peut comprendre des groupes chimiques autres que les résidus trouvés parmi les 20 acides aminés existant à l'état naturel. Les exemples de ces autres groupes chimiques comprennent, sans limitation, des acides aminés glycosylés et des acides aminés phosphorylés. Les modifications chimiques d'un polypeptide peuvent fournir des propriétés avantageuses comparativement au polypeptide parent, par exemple, une ou plusieurs d'une amplification de la stabilité, d'une augmentation de la demi-vie biologique, ou d'une augmentation de la solubilité dans l'eau. Les modifications chimiques applicables aux variants

utilisables dans la présente invention comprennent, sans limitation : la PEGylation, la glycosylation de polypeptides parents non glycosylés, ou la modification du profil de glycosylation présent dans le polypeptide parent. De telles  
5 modifications chimiques applicables aux variants utilisables dans la présente invention peuvent être cotraductionnelles ou posttraductionnelles.

Une « protéine antigénique », comme il est fait référence dans la présente demande, est un polypeptide tel que défini  
10 ci-dessus qui contient au moins un épitope. Un « fragment antigénique » d'une protéine antigénique est une séquence partielle de ladite protéine antigénique comprenant au moins un épitope. Pour des objectifs d'immunisation, seules les parties d'une protéine, qui déclenchent une réponse  
15 immunitaire sont pertinentes. Par conséquent, la construction d'acide nucléique n'a pas besoin de coder pour la protéine antigénique complète telle que trouvée dans un agent pathogène ou une cellule cancéreuse. Un fragment plus court d'une telle protéine est suffisant tant que sa séquence d'acides aminés  
20 comprend l'épitope ou les épitopes responsables de la reconnaissance de la protéine antigénique par le système immunitaire.

Le terme « épitope » également connu en tant que déterminant antigénique, tel qu'utilisé dans le contexte de la  
25 présente invention, fait partie d'un polypeptide qui est reconnu par le système immunitaire. De manière appropriée, cette reconnaissance est médiée par la liaison d'anticorps, de cellules B, ou de cellules T à l'épitope en question. Les épitopes liés par des anticorps ou des cellules B sont  
30 qualifiés « d'épitopes des cellules B » et les épitopes liés par les cellules T sont qualifiés « d'épitopes des cellules T ». Dans ce contexte, le terme « liaison » concerne une liaison spécifique, qui est définie comme une liaison avec

une constante d'association entre l'anticorps ou le récepteur de cellule T (TCR) et l'épitope respectif de  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  ou supérieure, ou de  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  ou supérieure. L'homme du métier sait bien comment déterminer la constante d'association (voir, par exemple, Caoili, S.E. (2012) *Advances in Bioinformatics* Vol. 2012). De manière appropriée, la liaison spécifique d'anticorps à un épitope est médiée par la région Fab (fragment, liaison d'antigène) de l'anticorps, la liaison spécifique d'une cellule B est médiée par la région Fab de l'anticorps composée par le récepteur de cellule B et la liaison spécifique d'une cellule T est médiée par la région variable (V) du récepteur de cellule T. Les épitopes des cellules T sont présentés à la surface d'une cellule de présentation de l'antigène, ou ils sont liés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe au moins trois classes différentes de molécules du CMH nommées les molécules des classes I, II et III du CMH, respectivement. Les épitopes présentés par l'intermédiaire de la voie du CMH-I déclenchent une réponse par les lymphocytes T cytotoxiques (cellules  $\text{CD8}^+$ ), alors que les épitopes présentés par l'intermédiaire de la voie du CMH-II déclenchent une réponse par les cellules T auxiliaires (cellules  $\text{CD4}^+$ ). Les épitopes des cellules T présentés par les molécules de la classe I du CMH sont généralement des peptides d'une longueur entre 8 et 11 acides aminés et les épitopes des cellules T présentés par des molécules de la classe II du CMH sont généralement des peptides d'une longueur entre 13 et 17 acides aminés. Les molécules de la classe III du CMH présentent également des épitopes non peptidiques comme des glycolipides. Par conséquent, le terme « épitope de cellule T » se rapporte à un peptide d'une longueur de 8 à 11 ou de 13 à 17 acides aminés qui peut être présenté par une molécule soit de la classe I du CMH soit de la classe II du CMH.



Les épitopes sont habituellement constitués de groupements de molécules de surface chimiquement actifs tels que des acides aminés ou des chaînes latérales de sucres et ils présentent habituellement des caractéristiques structurales tridimensionnelles spécifiques, ainsi que des caractéristiques de charge spécifiques. Le terme « épitope » se rapporte à des épitopes aussi bien conformationnels que non conformationnels. Les épitopes conformationnels et non conformationnels se distinguent en ce que la liaison aux premiers mais pas aux derniers est perdue en présence de solvants dénaturants. Les épitopes des cellules T sont non conformationnels, c'est-à-dire qu'ils sont linéaires, alors que les épitopes des cellules B peuvent être conformationnels ou non conformationnels. Les épitopes des cellules B linéaires varient généralement entre 5 et 20 acides aminés en longueur.

Une protéine antigénique selon la présente invention est dérivée d'un agent pathogène choisi dans le groupe constitué de virus, de bactéries, de protozoaires et de parasites multicellulaires. Dans une variante de mode de réalisation de la présente invention, la protéine antigénique est un polypeptide ou un fragment d'un polypeptide exprimé par une cellule cancéreuse.

Les protéines antigéniques ou les fragments antigéniques de celles-ci induisent une réponse des cellules B ou une réponse des cellules T ou une réponse des cellules B et une réponse des cellules T. Par conséquent, les protéines antigéniques ou les fragments antigéniques comprennent au moins un épitope de cellule T et/ou au moins un épitope de cellule B.

Dans un certain exemple de mode de réalisation de la présente invention, la protéine antigénique codée par le vecteur est dérivée du virus de l'hépatite C (VHC). Le génome du VHC est constitué d'un simple brin d'ARN d'une longueur

d'environ 9,5 kb qui code pour une polyprotéine précurseur d'environ 3000 acides aminés. (Choo et al. (1989) Science 244, 362-364 ; Choo et al. (1989) Science 244, 359-362 ; Takamizawa et al. (1991) J. Virol. 65, 1105-1113). La polyprotéine du VHC  
5 contient les protéines virales dans l'ordre : C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Les protéines virales individuelles sont produites par protéolyse de la polyprotéine du VHC. Les protéases de la cellule hôte libèrent les protéines structurales putatives C, E1, E2, et p7, et créent l'extrémité  
10 N-terminale de NS2 au niveau de l'acide aminé 810. (Mizushima et al. (1994) J. Virol. 65, 2731-2734 ; Hijikata et al. (1993) P.N.A.S. USA 90, 10773-10777).

Les protéines non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B forment vraisemblablement la machinerie de réplication du  
15 virus et sont libérées à partir de la polyprotéine. Une protéase zinc-dépendante associée à NS2 et à l'extrémité N-terminale de NS3 est responsable du clivage entre NS2 et NS3. (Grakoui et al. (1993) J. Virol. 67, 1385-1395, Hijikata et al. (1993) P.N.A.S. USA 90, 10773-10777). Une sérine protéase  
20 distincte localisée dans le domaine N-terminal de NS3 est responsable des clivages protéolytiques au niveau des jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B. (Bartenschlager et al. (1993) J. Virol. 67, 3835-3844 ; Grakoui et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10583-  
25 10587, Tomei et al. (1993) Virol. 67, 4017-4026). NS4A fournit un cofacteur pour l'activité de NS3. (Failla et al. (1994) J. Virol. 68, 3753-3760 ; De Francesco et al., brevet US No. 5 739 002). NS5A est une protéine hautement phosphorylée conférant une résistance à l'interféron. (De Francesco et al.,  
30 (2000) Semin. Liver Dis., 20(1), 69-83 ; Pawlotsky (1999) Viral Hepat. Suppl. 1, 47-48). NS5B fournit une ARN polymérase ARN-dépendante. (De Francesco et al., numéro de publication

internationale WO 96/37619, Behrens et al., EMBO 15, 12-22, 1996, Lohmann et al., Virology 249, 108-118, 1998).

Dans un exemple non limitatif de mode de réalisation, la protéine antigénique est un polypeptide Met-NS3-NS4A-NS4B-  
5 NS5A-NS5B contenant une région d'ARN polymérase ARN-dépendante inactive de NS5B. Par exemple, ladite protéine antigénique a une séquence d'acides aminés substantiellement similaire à la séquence définie par SEQ ID NO : 11 et possède une activité protéase suffisante pour induire elle-même la production d'au  
10 moins un polypeptide substantiellement similaire à la région de NS5B présente dans SEQ ID NO : 11. La séquence de cette protéine antigénique a été publiée dans le document WO 2003/031588, publié en tant que US 2004/0247615 et incorporé par référence dans le but de décrire des  
15 polypeptides du VHC. Le polypeptide produit correspondant à NS5B est inactif d'un point de vue enzymatique. Dans un autre mode de réalisation, le polypeptide du VHC possède une activité protéase suffisante pour produire des polypeptides substantiellement similaires aux régions de NS3, NS4A, NS4B,  
20 NS5A, et NS5B présentes dans SEQ ID NO : 11.

Dans un mode de réalisation, le degré d'identité de séquence avec la séquence selon SEQ ID NO : 11 est de plus de 80 %, plus de 85 %, plus de 90 %, plus de 95 % ou plus de 98 % par rapport à la séquence définie par SEQ ID NO : 11.  
25 Toutefois, dans certains modes de réalisation, la séquence de la protéine antigénique présente plus de 99 % d'identité de séquence avec la séquence définie par SEQ ID NO : 11 ou est identique à celle-ci.

Le terme « chaîne invariante », également connue sous le  
30 nom de « li » ou « CD74 », se rapporte à une protéine intégrale de membrane de type II non polymorphe. La protéine possède des fonctions multiples dans la maturation des lymphocytes et les réponses immunitaires adaptatives ; en

particulier, li assure le ciblage du CMH-II nouvellement synthétisé vers la voie endocytaire, où le complexe peut rencontrer des peptides antigéniques. (Pieters J. (1997) Curr. Opin. Immunol., 9: 8996). En outre, il a été montré que li  
5 fonctionne comme un chaperon du CMH de classe I (Morris et al. (2004) Immunol. Res., 30: 171-179) et, par sa séquence de ciblage endosomique, facilite la stimulation des cellules T CD4<sup>+</sup>, mais pas des cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre l'antigène lié de manière covalente (Diebold et al. (2001) Gene Ther. 8:  
10 487-493).

Pour la chaîne invariante humaine, quatre isoformes différentes sont connues, nommées en général p33, p35, p41 et p43 (Strubin et al., 1986, EMBO Journal, 5: 3483 - 3488). SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2 correspondent à la séquence  
15 d'acides aminés et à la séquence d'acide nucléique de l'isoforme p35 de la chaîne invariante humaine. Par rapport aux p33 et p41 humaines, les isoformes p35 et p43 humaines contiennent 16 résidus supplémentaires au niveau de l'extrémité N-terminale à cause d'une variante d'initiation de  
20 la traduction. Comparativement aux p33 et p35 humaines, les isoformes p41 et p43 humaines comprennent un domaine supplémentaire (variante d'épissage de l'exon 6b) inséré dans le cadre dans la région C-terminale de la chaîne invariante. SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 correspondent à la séquence  
25 d'acides aminés et à la séquence d'acide nucléique de l'isoforme p43 de la chaîne invariante humaine. La séquence d'une isoforme c humaine supplémentaire à laquelle il manque deux exons par rapport aux p33 et p35 humaines est disponible auprès de la Genbank (Accession BC024272). SEQ ID NO : 9 et  
30 SEQ ID NO : 10 correspondent à la séquence d'acides aminés et à la séquence d'acide nucléique de l'isoforme c de la chaîne invariante humaine.

Tableau 1 : Généralités sur les variants de la chaîne invariante humaine			
Isoforme	16 AA à l'extrémité N-terminale	Domaine supplémentaire	SEQ ID NO : (peptide, acide nucléique)
P33	-	-	-
P35	+	-	1, 2
P41	-	+	-
P43	+	+	5, 6
c	+	-	9, 10

Pour la chaîne invariante murine, seulement deux isoformes (p31 et p41) sont connues, lesquelles correspondent aux isoformes p33 et p41 de la chaîne invariante humaine. SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 4 correspondent à la séquence d'acides aminés et à la séquence d'acide nucléique de l'isoforme p31 de la chaîne invariante murine. SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO : 8 correspondent à la séquence d'acides aminés et à la séquence d'acide nucléique de l'isoforme p41 de la chaîne invariante murine. Un schéma global des différentes isoforme est représenté sur la figure 4.

Dans un mode de réalisation, la chaîne invariante utilisée dans la présente invention est substantiellement similaire à la chaîne invariante selon SEQ ID NO : 1 ou 3.

La chaîne invariante comprend plusieurs domaines : un domaine cytosolique qui comprend un peptide de tri (ciblage) (également connu comme la séquence de ciblage lysosomal) (positions 17 à 46 dans la chaîne invariante humaine SEQ ID NO : 1, positions 1 à 29 dans la chaîne invariante murine SEQ ID NO : 3) précédé d'un signal de rétention dans le RE dans les variants p35 et p43 de la chaîne invariante humaine (positions 1 à 16 dans la chaîne invariante humaine SEQ ID NO : 1), un domaine transmembranaire (ancrage signal,

positions 47 à 72 dans la chaîne invariante humaine  
SEQ ID NO : 1, positions 30 à 55 dans la chaîne invariante  
murine SEQ ID NO : 3), et un domaine luminal qui en lui-même  
comprend une région KEY (positions 93 à 96 dans la chaîne  
5 invariante humaine SEQ ID NO : 1, positions 76 à 79 dans la  
chaîne invariante murine SEQ ID NO : 3), une région CLIP  
adjacente (positions 97 à 120 dans la chaîne invariante  
humaine SEQ ID NO : 1, positions 80 à 103 dans la chaîne  
invariante murine SEQ ID NO : 3). La région CLIP comprend un  
10 peptide CLIP central (positions 103 à 117 dans la chaîne  
invariante humaine SEQ ID NO : 1, positions 86 à 100 dans la  
chaîne invariante murine SEQ ID NO : 3) et un domaine de  
trimérisation (positions 134 à 208 dans la chaîne invariante  
humaine SEQ ID NO : 1, positions 117 à 191 dans la chaîne  
15 invariante murine SEQ ID NO : 3 ; Mittendorf *et al.*, (2009)  
Expert Opin. Biol. Ther., 9: 71-78 ; Strumptner-Cuvelette and  
Benaroch, 2002, Biochem. Biophys. Acta, 1542: 1-13). Le reste  
du domaine luminal comprend deux régions hautement flexibles  
situées entre la région transmembranaire et la région KEY  
20 (positions 73 à 92 dans la chaîne invariante humaine  
SEQ ID NO : 1, positions 56 à 75 dans la chaîne invariante  
murine SEQ ID NO : 3) ou en aval le domaine de trimérisation  
(positions 209 à 232 dans la chaîne invariante humaine  
SEQ ID NO : 1, positions 192 à 215 dans la chaîne invariante  
25 murine SEQ ID NO : 3). La chaîne invariante a été caractérisée  
dans plusieurs organismes comme le poulet, la vache, le chien,  
la souris, le rat et l'être humain.

Dans un mode de réalisation, la chaîne invariante est  
issue de vertébrés, d'origine aviaire ou de mammifères, ou en  
30 outre, elle est choisie dans le groupe constitué de chaînes  
invariantes dérivées du poulet, de la vache, du chien, de la  
souris, du rat, d'un primate non humain et de l'être humain.  
Dans un autre mode de réalisation, elle est d'origine humaine

ou murine, par exemple, la chaîne invariante humaine a une séquence d'acides aminés telle que définie par SEQ ID NO : 1. Ledit polypeptide est, dans un mode de réalisation, codé par une séquence d'acide nucléique telle que donnée dans  
5 SEQ ID NO : 2. Dans un autre mode de réalisation, la chaîne invariante murine a une séquence d'acides aminés telle que définie par SEQ ID NO : 3. Ledit polypeptide est, dans un mode de réalisation, codé par une séquence d'acide nucléique telle que donnée dans SEQ ID NO : 4.

10 Le terme « chaîne invariante » comprend également des variants des polypeptides décrits ci-dessus caractérisés par des délétions de parties des séquences d'acides aminés des chaînes invariantes existant à l'état naturel substantiellement similaires aux chaînes invariantes existant  
15 à l'état naturel ou par leur substitution par d'autres séquences. Des exemples de variants sont donnés ci-dessous.

Dans un variant particulier de la chaîne invariante, la région KEY endogène qui est constituée des résidus d'acides aminés LRMK est délétée ou est substituée par une séquence  
20 d'acides aminés différente. Par exemple, les résidus d'acides aminés LRMK ou des résidus correspondants sont délétés. La délétion des résidus d'acides aminés LRMK peut être complète (impliquant tous les résidus d'acides aminés LRMK) ou partielle (impliquant au moins un résidu d'acide aminé de  
25 LRMK). La délétion complète de tous les résidus d'acides aminés LRMK est envisagée. En outre, au moins l'un ou la totalité des résidus d'acides aminés sont substitués par des résidus d'acides aminés différents.

Dans encore un autre exemple de variant, les méthionines  
30 dans les positions 107 et 115 de la chaîne invariante humaine selon SEQ ID NO : 1 ou les méthionines dans les positions 90 et 98 de la chaîne invariante murine selon SEQ ID NO : 3 ou les méthionines correspondant à ces positions dans d'autres

chaînes invariantes sont substituées par d'autres acides aminés. De manière appropriée, la méthionine est substituée.

Dans encore un autre exemple de variant, la chaîne invariante est tronquée à l'extrémité N-terminale, par exemple dans une telle mesure que l'extrémité N-terminale jusqu'à la région transmembranaire est éliminée. Par conséquent, dans un autre mode de réalisation, la chaîne invariante selon SEQ ID NO : 1, 46 acides aminés ou moins de l'extrémité N-terminale sont tronqués, 41 acides aminés ou moins sont tronqués, ou 36 acides aminés ou moins sont tronqués. Par conséquent, il est également envisagé que pour la chaîne invariante selon SEQ ID NO : 3, 30 acides aminés ou moins de l'extrémité N-terminale soient tronqués, 25 acides aminés ou moins soient tronqués, ou 20 acides aminés ou moins soient tronqués. Pour un mode de réalisation de la chaîne invariante selon SEQ ID NO : 1, les 16 premiers résidus d'acides aminés de la chaîne invariante humaine sont supprimés. Il est également possible qu'au moins un, mais pas la totalité des 16 premiers résidus d'acides aminés soient supprimés. En outre, il est possible qu'au moins un, ou la totalité des 16 premiers résidus d'acides aminés de la chaîne invariante humaine (SEQ ID NO : 1) soient substitués par d'autres résidus d'acides aminés.

Dans encore un autre variant, au moins un peptide signal pour l'expression dans la lumière du réticulum endoplasmique est ajouté à l'extrémité N-terminale de la chaîne invariante, par exemple à une version tronquée à l'extrémité N-terminale de la chaîne invariante à laquelle - à cause de la troncature N-terminale - il manque la région transmembranaire.

Dans encore un autre variant de la chaîne invariante, au moins une région CLIP est ajoutée à ou remplace la région CLIP endogène de la chaîne invariante respective. Dans la chaîne invariante humaine selon SEQ ID NO : 1, la région CLIP couvre



les positions 97 à 120 et dans la chaîne invariante murine selon SEQ ID NO : 3, elle couvre les positions 80 à 103. Ainsi, l'homme du métier peut facilement déterminer les résidus d'acides aminés correspondant à la région CLIP dans la chaîne invariante selon SEQ ID NO : 1 et 3. Dans un autre mode de réalisation, la région CLIP endogène complète est supprimée ou remplacée. Toutefois, la délétion ou le remplacement d'au moins un résidu d'acide aminé appartenant à la région CLIP endogène est également envisagé.

Le terme « chaîne invariante » se rapporte également à des fragments des chaînes invariantes et à leurs variants décrits ci-dessus, par exemple, les chaînes invariantes ayant les séquences d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ou 3 ou codées par les séquences d'acide nucléique selon SEQ ID NO : 2 ou 4. Il faut comprendre qu'à cause de la nature dégénérée du code génétique, un acide aminé peut être codé par plus d'un codon. Par exemple, l'acide aminé isoleucine peut être codé par les codons AUU, AUC ou AUA. Par conséquent, la présente invention envisage également tous les variants des séquences d'acide nucléique susmentionnées qui codent pour les séquences d'acides aminés définies par SEQ ID NO : 1 ou 3 sans tenir compte de la séquence d'acide nucléique spécifique. Puisque différents organismes utilisent différents codons avec une efficacité différente, il peut être avantageux d'adapter la séquence nucléotidique à l'organisme hôte prévu. Dans un mode de réalisation, le fragment est un fragment d'au moins 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou 210 résidus d'acides aminés d'une chaîne invariante de type sauvage ou d'un variant de celle-ci tel que défini ci-dessus.

En outre, le terme « chaîne invariante » se rapporte à des polypeptides présentant au moins 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 %

ou 99,9 % d'identité de séquence avec l'une quelconque des chaînes invariantes de type sauvage décrites ci-dessus, des variants ou des fragments de celles-ci. Les procédés de détermination de l'identité de séquence entre deux polypeptides différents sont bien connus dans l'art. La similarité des séquences nucléotidiques et d'acides aminés, c'est-à-dire le pourcentage d'identité de séquence, peut être déterminée à l'aide d'un alignement des séquences. De tels alignements peuvent être réalisés avec plusieurs algorithmes connus dans l'art, par exemple avec l'algorithme mathématique de Karlin et Altschul (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), avec hmalign (progiciel HMMER, [hmmerr.wustl.edu/](http://hmmerr.wustl.edu/)) ou avec l'algorithme CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, par exemple, à l'adresse [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/) ou à l'adresse [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) ou à l'adresse [npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html). Les paramètres préférés utilisés sont les paramètres par défaut tel que présentés à l'adresse [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/) ou [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Le grade de l'identité de séquence (correspondance des séquences) peut être calculé en utilisant, par exemple, BLAST, BLAT ou BlastZ (ou BlastX). Un algorithme similaire est incorporé dans les programmes BLASTN et BLASTP de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410.

Pour obtenir des alignements avec des brèches pour des objectifs de comparaison, Gapped BLAST est utilisé comme il est décrit dans Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Lorsque les programmes BLAST et Gapped BLAST sont utilisés, les paramètres par défaut des programmes respectifs sont utilisés. L'analyse de la correspondance des séquences peut être complémentée par des techniques établies de

cartographie des homologies comme Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: I54-I62) ou les champs aléatoires de Markov. Lorsqu'il est fait référence à des pourcentages d'identité de séquence dans la présente demande, ces pourcentages sont calculés par rapport à la longueur complète de la séquence plus longue, s'il n'est pas indiqué autrement.

Le terme « amorçage d'une réponse immunitaire » se rapporte à la première rencontre du système immunitaire avec la au moins une protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci et à l'induction subséquente d'une réponse immunitaire spécifique de l'antigène au sein d'une période de temps définie. Ladite période de temps est de, par exemple, au moins 1 an, au moins 2 ans, au moins 3 ans, au moins 5 ans ou au moins 10 ans avant l'amorçage. Dans un mode de réalisation, les rencontres du système immunitaire de l'individu ou du sujet avec la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci qui n'induisent pas une réponse immunitaire spécifique de l'antigène ne sont pas considérées comme « amorçant une réponse immunitaire ». Par exemple, les rencontres du système immunitaire de l'individu avec la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci qui n'induisent pas une immunité qui dure ne sont pas considérées comme « amorçant une réponse immunitaire » selon la présente invention. Dans un autre mode de réalisation, l'induction d'une immunité qui dure est médiée par la génération de cellules B mémoire et/ou de cellules T mémoire. Dans le cas du cancer, par exemple, un antigène spécifique peut être exprimé par les cellules cancéreuses sans déclencher une réponse immunitaire. La simple présence de cet antigène n'est pas un « amorçage d'une réponse immunitaire » contre ledit antigène comme il est compris par la présente demande. Dans un mode de réalisation, l'individu ou le sujet n'a pas

été délibérément immunisé avec la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci ou un vecteur comprenant un acide nucléique codant pour une telle protéine ou un fragment dans l'objectif de traiter ou de prévenir une maladie dans la période de temps donnée avant.

Toutefois, le terme « amorçage d'une réponse immunitaire » se rapporte à tout contact antérieur de l'individu avec un agent pathogène comprenant de manière naturelle ladite protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci, à condition que ledit contact n'ait pas été induit artificiellement pour des objectifs médicaux. En particulier, il est envisagé par la présente demande que l'individu puisse avoir été déjà infecté avec l'agent pathogène susmentionné, à condition que ladite infection n'ait pas été induite artificiellement pour des objectifs médicaux. Au moment où l'amorçage de la réponse immunitaire prend place, l'infection de l'individu peut être encore présente ou elle peut avoir été déjà éliminée. De façon similaire, dans le cas du cancer, il est envisagé que l'individu ou le sujet à immuniser avec le vecteur poxviral de la présente invention souffre déjà du cancer exprimant la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci qui est compris par le produit d'assemblage d'acide nucléique de la présente invention.

Le patient ou le sujet à immuniser avec un vecteur poxviral selon la présente invention est, par exemple, un mammifère ou un oiseau, plus spécifiquement un primate, une souris, un rat, un mouton, une chèvre, une vache, un porc, un cheval, une oie, un poulet, un canard ou une dinde et, de manière la plus spécifique, un être humain.

Le vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique tel que définie ci-dessus est, par exemple, utilisé dans un régime de primovaccination-rappel.

Dans de nombreux cas, une seule administration d'un vaccin n'est pas suffisante pour générer le nombre de cellules immunitaires de longue durée qui est requis pour une protection efficace en cas de future infection par l'agent pathogène en question, pour protéger contre des maladies y compris des maladies tumorales ou pour traiter thérapeutiquement une maladie, comme une maladie tumorale. Par conséquent, une stimulation répétée avec une préparation biologique spécifique d'un agent pathogène ou d'une maladie spécifique est requise afin d'établir une immunité qui dure et protectrice contre ledit agent pathogène ou ladite maladie ou pour guérir une maladie donnée. Un régime d'administration comprenant l'administration répétée d'un vaccin dirigé contre le même agent pathogène ou la même maladie est qualifié dans la présente demande de « régime de primovaccination-rappel ». Dans un mode de réalisation, un régime de primovaccination-rappel implique au moins deux administrations d'un vaccin ou d'une composition vaccinale dirigé contre un agent pathogène spécifique, un groupe d'agents pathogènes ou de maladies. La première administration du vaccin est qualifiée « d'amorçage » et toute administration subséquente du même vaccin ou d'un vaccin dirigé contre le même agent pathogène que le premier vaccin est qualifiée de « rappel ». Ainsi, dans un autre mode de réalisation de la présente invention, le régime de primovaccination-rappel implique une administration du vaccin pour amorcer la réponse immunitaire et au moins une administration subséquente pour stimuler la réponse immunitaire (rappel). Il faut comprendre que 2, 3, 4 voire même 5 administrations pour stimuler la réponse immunitaire sont également envisagées par la présente invention.

La période de temps entre l'amorçage et le rappel est de, éventuellement, 1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 6 semaines ou 8 semaines. Plus particulièrement, elle est de 4 semaines

ou 8 semaines. Si plus d'un rappel est réalisé, le rappel suivant est administré 1 semaine, 2 semaines, 4 semaines, 6 semaines ou 8 semaines après le rappel précédent. Par exemple, l'intervalle entre deux rappels quelconques est de 4 semaines ou 8 semaines.

Les régimes de primovaccination-rappel peuvent être homologues ou hétérologues. Dans les régimes de primovaccination-rappel homologues, à la fois l'amorçage et le au moins un rappel sont réalisés en utilisant le même moyen d'administration de la protéine antigénique ou du fragment antigénique de celle-ci, c'est-à-dire que l'amorçage et le rappel sont effectués en utilisant un polypeptide ou l'amorçage et le rappel sont réalisés en utilisant une construction d'acide nucléique compris dans le même vecteur.

Dans le contexte de la présente invention, un régime de primovaccination-rappel homologue comprendra l'utilisation du vecteur poxviral de l'invention aussi bien pour l'amorçage que pour la stimulation de la réponse immunitaire (rappel). Un régime de primovaccination-rappel hétérologue implique l'utilisation de moyens différents pour l'amorçage et pour la stimulation de la réponse immunitaire (rappel). Dans le contexte de la présente invention, un régime de primovaccination-rappel hétérologue comprendra un vecteur poxviral tel que décrit ci-dessus pour l'amorçage d'une réponse immunitaire et un vecteur différent ou un vaccin peptidique pour la stimulation de la réponse immunitaire (rappel).

En variante, un régime de primovaccination-rappel hétérologue comprendra un vecteur ou un vaccin peptidique différent pour l'amorçage d'une réponse immunitaire et un vecteur poxviral tel que décrit ci-dessus pour la stimulation de la réponse immunitaire (rappel).

Dans un mode de réalisation de la présente invention, le régime de primovaccination-rappel est homologue.

Dans un autre mode de réalisation de la présente invention, le régime de primovaccination-rappel est  
5 hétérologue.

Dans un régime de primovaccination-rappel hétérologue, un vecteur poxviral tel que décrit ci-dessus est utilisé pour la stimulation de la réponse immunitaire (rappel) et un vecteur ou un vaccin peptidique différent est utilisé pour l'amorçage  
10 de la réponse immunitaire. Dans un autre mode de réalisation du régime de primovaccination-rappel hétérologue, un vecteur poxviral tel que décrit ci-dessus est utilisé pour l'amorçage de la réponse immunitaire et un vecteur ou un vaccin peptidique différent est utilisé pour la stimulation de la  
15 réponse immunitaire (rappel).

Dans un autre mode de réalisation, le régime de primovaccination-rappel hétérologue comprendra un vecteur adénoviral pour l'amorçage d'une réponse immunitaire et un vecteur poxviral tel que décrit ci-dessus pour la stimulation  
20 de la réponse immunitaire (rappel).

Dans encore un autre mode de réalisation, le régime de primovaccination-rappel hétérologue comprendra un vecteur poxviral tel que décrit ci-dessus pour l'amorçage d'une réponse immunitaire et un vecteur adénoviral pour la  
25 stimulation de la réponse immunitaire (rappel).

Pour tous les régimes de primovaccination-rappel, il est envisagé que les protéines antigéniques ou les peptides antigéniques utilisés pour stimuler la réponse immunitaire soient immunologiquement identiques à la protéine antigénique  
30 ou au fragment antigénique de celle-ci utilisé(e) pour l'amorçage de la réponse immunitaire. Il faut comprendre que la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci peut être administré(e) sous la forme d'un polypeptide

(« vaccin peptidique ») ou qu'elle/il peut être codé(e) par une molécule d'acide nucléique administrée à l'individu en question. Dans ce dernier cas, la protéine antigénique ou le peptide antigénique qui déclenche la réponse immunitaire  
5 souhaitée est exprimé(e) dans les cellules de l'individu immunisé.

Deux protéines antigéniques ou plus ou des fragments antigéniques de celles-ci sont « immunologiquement identiques » s'ils/si elles sont reconnu(e)s par le même  
10 anticorps, la même cellule T ou cellule B. La reconnaissance de deux polypeptides immunogènes ou plus par le même anticorps, la même cellule T ou cellule B est également connue sous le nom de « réactivité croisée » dudit anticorps, de ladite cellule T ou cellule B. Dans un mode de réalisation, la  
15 reconnaissance de deux polypeptides immunologiquement identiques ou plus par le même anticorps, la même cellule T ou cellule B est due à la présence d'épitopes identiques ou similaires dans tous les polypeptides. Des épitopes similaires partagent suffisamment de caractéristiques structurales et/ou  
20 de charge pour être liés par la région Fab du même anticorps ou récepteur de cellule B ou par la région V du même récepteur de cellule T. Les caractéristiques de liaison d'un anticorps, d'un récepteur de cellule T ou d'un récepteur de cellule B sont définies, par exemple, par l'affinité de liaison du  
25 récepteur à l'épitope en question. Deux polypeptides immunogènes sont « immunologiquement identiques » comme il est compris par la présente demande si la constante d'affinité du polypeptide avec la constante d'affinité inférieure est d'au moins 30 %, au moins 40 %, au moins 50 %, au moins 60 %, au  
30 moins 70 %, au moins 80 %, au moins 90 %, au moins 95 % ou au moins 98 % de la constante d'affinité du polypeptide avec la constante d'affinité supérieure. Les procédés de détermination de l'affinité de liaison d'un polypeptide à un récepteur comme



la dialyse à l'équilibre ou la technique ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) sont bien connus dans l'art.

Dans un mode de réalisation, deux polypeptides « immunologiquement identiques » comprennent au moins un  
5 épitope identique. Les effets de vaccination les plus forts peuvent être habituellement obtenus si les polypeptides immunogènes comprennent des épitopes identiques ou s'ils ont une séquence d'acides aminés identique.

Dans un mode de réalisation, l'utilisation du vecteur  
10 poxviral tel que décrit ci-dessus pour l'amorçage d'une réponse immunitaire établira une immunité protectrice contre un agent pathogène ou une maladie ou mènera à l'éradication de la maladie.

Dans un mode de réalisation, le vecteur poxviral est  
15 administré par les voies intranasale, intramusculaire, sous-cutanée, intradermique, intragastrique, orale et topique.

Une « administration intranasale » est l'administration d'un vecteur de la présente invention à la muqueuse des voies respiratoires complètes y compris le poumon. Plus  
20 particulièrement, la composition est administrée à la muqueuse du nez. Dans un mode de réalisation, une administration intranasale est obtenue au moyen d'une instillation, d'une pulvérisation ou d'un aérosol. Dans un autre mode de réalisation, ladite administration n'implique pas la  
25 perforation de la muqueuse par un moyen mécanique comme une aiguille.

Le terme « administration intramusculaire » se rapporte à l'injection d'un vecteur dans un muscle quelconque d'un individu. Les exemples d'injections intramusculaires sont  
30 administrés dans le deltoïde, le muscle vaste externe ou les zones ventroglutéale et dorsoglutéale.

Le terme « administration sous-cutanée » se rapporte à l'injection d'un vecteur dans l'hypoderme.

Le terme « administration intradermique » se rapporte à l'injection d'un vecteur dans le derme entre les couches de la peau.

Le terme « administration orale » se rapporte à l'administration d'un vecteur par la bouche au système gastrique.

Une « administration topique » est l'administration du vecteur à une partie quelconque de la peau avec une aiguille ou un dispositif comparable. Le vecteur peut être également administré par voie topique à la muqueuse de la bouche, du nez, de la région génitale et du rectum.

Dans un autre aspect, la présente invention concerne une combinaison vaccinale comprenant :

(a) un vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique, le produit d'assemblage d'acide nucléique comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une première protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci liée de manière fonctionnelle à

(ii) un acide nucléique codant pour au moins une chaîne invariante  
et

(b) un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci

ou

une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci

ou

des particules pseudovirales

où au moins un épitope de la première protéine antigénique ou d'un fragment antigénique de celle-ci est

immunologiquement identique à la au moins seconde protéine antigénique ou à un fragment de celle-ci.

Le terme « vaccin » se rapporte à une préparation biologique qui induit ou améliore l'immunité envers une  
5 maladie spécifique. Ladite préparation peut comprendre un agent pathogène tué ou vivant atténué. Elle peut également comprendre un ou plusieurs composés dérivés d'un agent pathogène appropriés pour déclencher une réponse immunitaire. Dans un mode de réalisation, ledit composé est un polypeptide  
10 qui est substantiellement identique ou immunologiquement identique à un polypeptide dudit agent pathogène. Dans un autre mode de réalisation, le vaccin comprend une construction d'acide nucléique qui code pour un polypeptide immunogène qui est substantiellement identique ou immunologiquement identique  
15 à un polypeptide dudit agent pathogène. Dans ce dernier cas, il est également envisagé que le polypeptide soit exprimé chez l'individu traité avec le vaccin. Le principe sous-jacent de la vaccination est la génération d'une « mémoire » immunologique. La stimulation du système immunitaire d'un  
20 individu avec un vaccin induit la formation et/ou la propagation des cellules immunitaires qui reconnaissent spécifiquement le composé compris dans le vaccin. Au moins une partie desdites cellules immunitaires demeurent viables pendant une période de temps qui peut dépasser 10, 20 ou  
25 30 ans après la vaccination. Si le système immunitaire de l'individu rencontre l'agent pathogène à partir duquel le composé capable de déclencher une réponse immunitaire a été dérivé au sein de la période de temps susmentionnée, les cellules immunitaires générées par la vaccination sont  
30 réactivées et amplifient la réponse immunitaire contre l'agent pathogène comparativement à la réponse immunitaire d'un individu qui n'a pas été stimulé avec le vaccin et qui

rencontre les composés immunogènes de l'agent pathogène pour la première fois.

Tel qu'utilisé ici, le terme « vecteur » se rapporte à au moins un polynucléotide ou à un mélange d'au moins un  
5 polynucléotide et d'au moins une protéine qui est capable d'introduire le polynucléotide compris dedans dans une cellule. En outre, le terme « vecteur » peut également se rapporter à au moins un polynucléotide formulé avec une préparation de liposomes ou de nanoparticules lipidiques qui  
10 est capable de transfecter une cellule avec au moins un polynucléotide, comme il est décrit, par exemple, par Geall et al., 2012, PNAS, 109: 14604-14609.

Au moins un polynucléotide compris dans le vecteur est constitué de ou comprend au moins une construction d'acide  
15 nucléique codant pour au moins une protéine immunogène. En plus du polynucléotide constitué de ou comprenant la construction d'acide nucléique de la présente invention, des polynucléotides et/ou des polypeptides supplémentaires peuvent être introduits dans la cellule. L'addition de polynucléotides  
20 et/ou de polypeptides supplémentaires est également envisagée si lesdits polynucléotides et/ou polypeptides supplémentaires sont requis pour introduire la construction d'acide nucléique de la présente invention dans la cellule ou si l'introduction de polynucléotides et/ou polypeptides supplémentaires augmente  
25 l'expression du polypeptide immunogène codé par la construction d'acide nucléique de la présente invention.

Dans le contexte de la présente invention, il est envisagé que la protéine antigénique ou le fragment antigénique de celle-ci codé(e) par la construction d'acide  
30 nucléique introduit soit exprimé(e) au sein de la cellule après l'introduction du vecteur ou des vecteurs. Les exemples de vecteurs appropriés comprennent, mais sans limitation, des

plasmides, des cosmides, des phages, des vecteurs viraux, des nanoparticules lipidiques ou des chromosomes artificiels.

Dans un mode de réalisation de la présente invention, le vecteur viral est choisi dans le groupe constitué de vecteurs adénoviraux, de vecteurs de virus adéno-associés (AAV) (par exemple, AAV de type 5 et de type 2), des vecteurs alphaviraux (par exemple, le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (VEE), le virus sindbis (SIN), le virus de la forêt semliki (SFV), et les chimères VEE-SIN), des vecteurs d'herpèsvirus (par exemple, des vecteurs dérivés de cytomégalovirus, comme le cytomégalovirus du singe rhésus (RhCMV), des vecteurs d'arénavirus (par exemple, des vecteurs du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)), des vecteurs du virus de la rougeole, des vecteurs poxviraux, des vecteurs de paramyxovirus, des vecteurs baculoviraux, des vecteurs du virus de la stomatite vésiculaire, des rétrovirus, des lentivirus, des particules pseudovirales, et des spores bactériennes.

Dans un autre mode de réalisation, les vecteurs sont des vecteurs adénoviraux, en particulier des vecteurs adénoviraux dérivés de l'être humain ou d'un grand singe non humain. Les exemples de grands singes à partir desquels les adénovirus sont dérivés sont le chimpanzé (Pan), le gorille (Gorilla) et l'orang-outan (Pongo), par exemple le Bonobo (*Pan paniscus*) et le chimpanzé commun (*Pan troglodytes*). De manière générale, les adénovirus des grands singes non humains existant à l'état naturel sont isolés des échantillons de selles du grand singe respectif. De manière spécifique, les vecteurs sont des vecteurs adénoviraux qui ne se répliquent pas basés sur les vecteurs hAd5, hAd11, hAd26, hAd35, hAd49, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73,

ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2, et PanAd3 ou des vecteurs compétents pour la répllication Ad4 et Ad7. Les adénovirus humains hAd4, hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd35 et hAd49 sont bien connus dans l'art. Les vecteurs à base de ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd63 et ChAd82 existant à l'état naturel sont décrits en détail dans le document WO 2005/071093, publié en tant que US 20110217332 et incorporé par référence par rapport aux vecteurs adénoviraux décrits dedans. Les vecteurs à base de PanAd1, PanAd2, PanAd3, ChAd55, ChAd73, ChAd83, ChAd146, et ChAd147 existant à l'état naturel sont décrits en détail dans le document WO 2010/086189, publié en tant que US 20120027788 et incorporés par référence par rapport aux vecteurs adénoviraux décrits dedans.

Dans un autre mode de réalisation, la seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci est immunologiquement identique à la protéine antigénique ou à un fragment antigénique de celle-ci codé(e) par la construction d'acide nucléique comprise dans le vecteur poxviral.

Dans un autre mode de réalisation de la présente invention, le vecteur est présent sous forme d'ADN nu. Le terme « ADN nu » se rapporte à toute molécule d'acide nucléique, ADN ou ARN, qui ne code pas pour des protéines d'un vecteur viral mais code pour au moins une protéine antigénique ou un fragment de celle-ci. Il est envisagé que l'ADN nu ne soit pas associé à des polypeptides quelconques, en particulier pas avec des polypeptides d'origine virale. Par exemple, l'ADN nu est présent sous forme de plasmide, cosmide ou sous la forme d'un chromosome artificiel. Dans un autre mode de réalisation, l'ADN nu code pour un polypeptide qui est immunologiquement identique à la protéine antigénique ou à un

fragment antigénique de celle-ci codé(e) par la construction d'acide nucléique comprise dans le vecteur poxviral.

Le terme « particules pseudovirales » (PPV) se rapporte à des assemblages comprenant des protéines virales mais pas d'acide nucléique. Les PPV peuvent être produites en exprimant des protéines de surface virales dans des lignées cellulaires productrices appropriées. Le manque d'acide nucléique, et ainsi d'informations génétiques, rend les PPV non infectieuses, créant ainsi un vaccin sans risque. Par exemple, la PPV comprend un polypeptide qui est immunologiquement identique à la protéine antigénique ou à un fragment antigénique de celle-ci codé(e) par la construction d'acide nucléique comprise dans le vecteur poxviral.

Dans un certain mode de réalisation de la présente invention, la combinaison vaccinale décrite ci-dessus est utilisée dans un régime de primovaccination-rappel. Dans un premier mode de réalisation de ce régime de primovaccination-rappel, le vecteur poxviral est utilisé pour l'amorçage de la réponse immunitaire et le vecteur viral ou la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci est utilisé pour stimuler la réponse immunitaire (rappel). Dans un autre mode de réalisation du régime de primovaccination-rappel, le vecteur viral ou la protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci est utilisé pour l'amorçage de la réponse immunitaire et le vecteur poxviral est utilisé pour stimuler la réponse immunitaire (rappel).

Dans un mode de réalisation de la présente invention, la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration sous-cutanée ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intradermique ;

5 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intragastrique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration orale ;

10 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

20 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration sous-cutanée ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intradermique ;

25 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intragastrique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration orale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;



la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration  
5 sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration sous-cutanée ;

10 la réponse immunitaire est amorcée par une administration sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intradermique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au  
15 moins une administration intragastrique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration orale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration  
20 sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration sous-cutanée et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale ;

25 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au  
30 moins une administration sous-cutanée ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intradermique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intragastrique ;

5 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration orale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;

10 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intradermique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

15 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration sous-cutanée ;

20 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intradermique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intragastrique ;

25 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration orale ;

30 la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration intragastrique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration  
5 orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration sous-cutanée ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intradermique ;

10 la réponse immunitaire est amorcée par une administration orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intragastrique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une  
15 administration orale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration  
20 orale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire ;

25 la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration sous-cutanée ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins  
30 une administration intradermique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intragastrique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration orale ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration topique ;

la réponse immunitaire est amorcée par une administration topique et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale.

Dans un mode de réalisation, la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire.

Dans encore un autre mode de réalisation, la réponse immunitaire est amorcée par une administration intranasale et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intranasale.

Dans encore un autre mode de réalisation, la réponse immunitaire est amorcée par une administration intramusculaire et la réponse immunitaire est stimulée par au moins une administration intramusculaire.

Dans un autre aspect, la présente invention concerne une composition vaccinale comprenant un vecteur poxviral pour l'amorçage d'une réponse immunitaire telle que définie ci-dessus ou une combinaison vaccinale comprenant un vecteur poxviral et un agent choisi dans le groupe constitué de (i) un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci, (ii) une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci et (iii) des particules pseudovirales.

Le terme « composition » se rapporte à la combinaison comprenant une protéine antigénique ou un fragment de celle-ci

ou une particule pseudovirale ou un vecteur comprenant une construction d'acide nucléique et au moins un autre composé choisi dans le groupe constitué de supports pharmaceutiquement acceptables, excipients et adjuvants pharmaceutiques.

5       « Pharmaceutiquement acceptable » signifie approuvé par un organisme réglementaire du gouvernement fédéral ou d'un état ou listé dans la Pharmacopée Américaine ou une autre pharmacopée reconnue de manière générale pour une utilisation chez des animaux, et plus particulièrement chez les êtres  
10 humains.

Le terme « support », tel qu'utilisé dans ce document, se rapporte à une substance pharmacologiquement inactive telle que, mais sans limitation, un diluant, un excipient, ou un véhicule avec lequel le principe thérapeutiquement actif est  
15 administré. De tels supports pharmaceutiques peuvent être liquides ou solides. Un support liquide comprend, mais sans limitation, des liquides stériles, tels que des solutions salines dans l'eau et des huiles, y compris celles de pétrole, animales, végétales ou d'origine synthétique, comme l'huile  
20 d'arachide, l'huile de soja, une huile minérale, l'huile de sésame et analogues. Des solutions salines et des solutions aqueuses de dextrose et de glycérol peuvent être également employées en tant que supports liquides, particulièrement pour des solutions injectables. Une solution saline est un support  
25 préféré lorsque la composition pharmaceutique est administrée par voie intraveineuse ou intranasale par un nébuliseur.

Les excipients pharmaceutiques appropriés comprennent l'amidon, le glucose, le lactose, le saccharose, la gélatine, le malt, le riz, la farine, la craie, le gel de silice, le  
30 stéarate de sodium, le monostéarate de glycérol, le talc, le chlorure de sodium, le lait écrémé séché, le glycérol, le propylène glycol, l'eau, l'éthanol et analogues.

Des exemples de supports pharmaceutiques appropriés sont décrits dans "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin.

Le terme « adjuvant » se rapporte à des agents qui augmentent, stimulent, activent, potentialisent ou modulent la réponse immunitaire au principe actif de la composition au niveau soit cellulaire soit humoral, par exemple, les adjuvants immunologiques stimulent la réponse du système immunitaire contre l'antigène en question, mais n'ont aucun effet immunologique eux-mêmes. Les exemples de tels adjuvants comprennent, mais sans limitation, des adjuvants inorganiques (par exemple, des sels de métaux inorganiques tels que le phosphate d'aluminium ou l'hydroxyde d'aluminium), des adjuvants organiques (par exemple, des saponines ou le squalène), des adjuvants à base d'huile (par exemple, l'adjuvant complet de Freund et l'adjuvant incomplet de Freund), des cytokines (par exemple, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CSF, et INF- $\gamma$ ), des adjuvants particuliers (par exemple, des complexes immunostimulants (ISCOM), des liposomes, ou des microsphères biodégradables), des virosomes, des adjuvants bactériens (par exemple, le monophosphoryl-lipide A, ou les muramyl-peptides), des adjuvants synthétiques (par exemple, des copolymères séquencés non ioniques, des analogues de muramyl-peptides, ou un lipide A synthétique), ou des adjuvants polynucléotidiques synthétiques (par exemple, la polyarginine ou la polylysine).

#### Brève description des figures

Figure 1 : le MVA codant pour une chaîne invariante (li)-antigène NS induit une réponse plus forte des cellules T chez les souris. Deux groupes de souris ont été immunisés avec  $2 \times 10^5$  unités formant une plaque (pfu) de MVA comprenant l'antigène NS (image de gauche) et avec le MVA comprenant le

NS lié à une chaîne invariante (image de droite). La réponse totale des cellules T à l'antigène NS a été mesurée par un test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  et les nombres sur l'ordonnée représentent les cellules formant des taches (SFC)/million de splénocytes.

Figure 2 : le MVA codant pour une chaîne invariante (li)-antigène NS induit une réponse plus forte des cellules T que l'adénovirus correspondant chez des souris. Deux groupes de souris ont été immunisés avec le MVA codant pour l'antigène NS (MVA wt) ou l'antigène NS lié à une chaîne invariante humaine (MVAli). Deux groupes supplémentaires de souris ont été immunisés avec une dose comparable de ChAd3 codant pour le NS (ChAd3 wt) ou le NS lié à une chaîne invariante humaine (ChAd3li). La réponse totale des cellules T à l'antigène NS a été mesurée par un test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  et les nombres sur l'ordonnée représentent les cellules formant des taches (SFC)/million de splénocytes.

Figure 3 : le rappel avec le MVA comprenant l'antigène NS lié à une chaîne invariante augmente la génération de cellules T spécifiques du VHC-NS chez des macaques.

Deux groupes de 4 macaques ont été sensibilisés avec ChAd3liNS et 50 semaines plus tard, ils ont reçu un rappel avec le MVA-NS (barres grises) ou avec le MVA-liNS (barres noires). L'image A montre la réponse par un test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  une semaine (pic du rappel) ou 3 mois après le rappel (mémoire). Les nombres sur l'ordonnée représentent les cellules formant des taches (SFC)/million de CMSP. L'image B montre une fréquence supérieure des CD8 par ICS de l'IFN $\gamma$  une semaine après le rappel avec le MVAliNS (barres noires). Les nombres sur l'ordonnée représentent le % de cellules T CD8 spécifiques de l'antigène produisant de l'IFN $\gamma$ .

Figure 4 : diagramme schématique montrant les quatre isoformes de la chaîne invariante humaine (p33, p35,

p41, p43, isoforme c) et les deux isoformes de la chaîne invariante murine (p31, p41). Dans les p35 et p43 humaines, 16 résidus supplémentaires sont présents à l'extrémité N-terminale à cause d'une variante d'initiation de la traduction. Dans les isoformes p41 et p43 humaines et l'isoforme p41 murine, un domaine supplémentaire est présent à cause d'une variante d'épissage. A l'isoforme c humaine, il manque deux exons par rapport aux p33 et p35 humaines (trois exons par rapport aux p41 et p43 humaines) menant à un décalage du cadre.

### Exemples

Exemple 1 - L'amorçage avec le MVA comprenant l'antigène NS lié à une chaîne invariante (MVA-hli NS) augmente la génération des cellules T spécifiques du VHC-NS chez les souris.

Deux groupes de souris Balb/c ont été immunisés par voie intramusculaire avec  $2 \times 10^5$  pfu (unités formant une plaque) de MVA codant pour l'antigène NS ou avec la même dose de MVA comprenant l'antigène NS lié à une chaîne invariante humaine. La région NS englobe deux tiers du génome du VHC et code pour cinq protéines différentes (NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) qui résultent du clivage protéolytique de la polyprotéine du VHC par la protéase NS3 codée. Dix jours après l'immunisation, des splénocytes sont prélevés et la réponse des cellules T spécifiques du VHC-NS a été évaluée par un test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  en utilisant des groupes de peptides couvrant la région NS. La réponse a été évaluée en additionnant les réactivités contre les six groupes peptidiques individuels et en soustrayant le bruit de fond (taches comptées dans les puits témoins sans aucun peptide). Le taux des cellules T spécifiques ciblant l'antigène NS a été supérieur chez les



souris sensibilisées avec le vaccin MVA à base de li (figure 1).

Exemple 2 - L'amorçage avec le MVA comprenant l'antigène NS  
5 lié à une chaîne invariante (MVA-hli NS) induit une réponse  
plus forte des cellules T chez les souris que le vecteur  
adénoviral correspondant.

Deux groupes de souris Balb/c ont été immunisés par voie intramusculaire avec  $2 \times 10^5$  pfu de MVA codant pour l'antigène  
10 NS ou avec la même dose de MVA comprenant l'antigène NS lié à une chaîne invariante humaine. Deux groupes supplémentaires de souris ont été immunisés avec  $2 \times 10^5$  ui (unités infectieuses) de ChAd3 codant pour l'antigène NS ou avec la même dose de ChAd3 comprenant l'antigène NS lié à une chaîne  
15 invariante humaine. Le pic de la réponse immunitaire a été évalué sur des splénocytes prélevés 10 et 21 jours après l'immunisation avec les vaccins à base des vecteurs MVA et ChAd3, respectivement. La réponse des cellules T a été évaluée par un test ELIspot pour l'IFN $\gamma$  en utilisant des groupes de  
20 peptides couvrant l'antigène NS. Les résultats (figure 2) montrent que le vaccin MVA à base de li induit une réponse supérieure par rapport au vaccin ChAd3 à base de li correspondant.

25 Exemple 3 - Le rappel avec le MVA comprenant l'antigène NS lié  
à une chaîne invariante (MVA-hli NS) augmente la génération  
des cellules T spécifiques du VHC-NS chez les macaques.

Deux groupes de 4 macaques ont été sensibilisés avec ChAd3liNS et 50 semaines plus tard, ils ont reçu un rappel  
30 avec le MVA-NS (barres grises) ou avec le MVA-liNS (barres noires). La dose injectée a été de  $1 \times 10^{10}$  vp pour les vecteurs adénoviraux, et de  $2 \times 10^8$  pfu pour les vecteurs MVA. La réponse immunitaire a été évaluée sur des CMSP prélevées

1 semaine (pic de la réponse) et 3 mois (réponse mémoire) après l'amorçage par un test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  et une coloration intracellulaire de l'IFN $\gamma$  (ICS) en utilisant des groupes de peptides couvrant l'antigène NS. Comme il est  
5 illustré sur la figure 3, la réponse supérieure du test ELISpot a été induite dans le groupe recevant le MVAliNS aux deux points de temps (barres noires). L'image A montre la réponse par le test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  une semaine ou 3 mois après le rappel. L'image B montre la fréquence supérieure des  
10 cellules T CD8 produisant de l'IFN $\gamma$  par ICS une semaine après le rappel avec le MVAliNS (barres noires).

#### Matériaux et procédés

##### Vecteurs adénoviraux et MVA

15 Le vecteur ChAd3 exprimant la région entière NS3-5B (NS) du VHC à partir du génotype 1b, souche bk, a été décrit auparavant (Colloca et al. Sci Transl Med 4(115), 115ra112, 2012). Le vecteur MVA exprimant la même cassette a été dérivé et préparé comme il a été décrit auparavant (Cottingham, M.G.  
20 et al. PLoS ONE 3, e1638, 2008 ; Di Lullo, G. et al. Virol. Methods 156, 37-43, 2009). L'insert de la li humaine (p35, séquence de référence du NCBI : NM\_004355) a été synthétisé par GeneArt (Life Technologies, Paisley, Royaume-Uni) et ensuite cloné à l'extrémité N-terminale du transgène NS sous  
25 le contrôle du HCMV et de BGHpA.

##### Animaux et vaccinations

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées conformément aux lois et aux politiques nationales et internationales (directive du Conseil Européen 86/609 ; Décret  
30 Législatif Italien 116/92). Le comité d'éthique du Ministère Italien de la Santé a approuvé cette recherche. Les procédures de manipulation d'animaux ont été effectuées sous anesthésie et tous les efforts ont été apportés pour minimiser la

souffrance et réduire les nombres des animaux. Des souris Balb/c ou C57Bl/6 femelles âgées de 6 semaines ont été achetées chez Charles River (Come, Italie), et des groupes expérimentaux de 5 souris chacun ont été constitués. Les vecteurs ChAd3 et MVA ont été administrés par voie intramusculaire dans le quadriceps par délivrance d'un volume de 50 µl par site (100 µl de volume final).

Des macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) femelles, naïfs, âgés de 11 à 19 ans (plage de poids de 3,2 à 6,5 kg) provenant d'une colonie élevée dans cet objectif logée à l'Institute of Cell Biology and Neurobiology (National Research Council of Italy, Rome), ont été assignés à des groupes expérimentaux de quatre animaux chacun. Toutes les immunisations ont été délivrées par la voie intramusculaire dans le muscle deltoïde en injectant 0,5 ml de virus dilué dans du tampon de stabilisation. La dose injectée a été de  $1 \times 10^{10}$  vp pour les vecteurs adénoviraux, et de  $2 \times 10^8$  pfu pour les vecteurs MVA. Durant la manipulation, les animaux ont été anesthésiés par injection i.m. de 10 mg/kg de chlorhydrate de kétamine.

#### Peptides

Un ensemble de 494 peptides, d'une longueur de 15 acides aminés, se chevauchant de 11 acides aminés et couvrant le cadre ouvert de lecture de NS3-NS5B (1985 a.a.) de la souche BK du génotype 1b du VHC a été obtenu auprès de BEI Resources (Manassas, VA).

Test ELISpot pour l'IFN $\gamma$  ex vivo avec des échantillons de souris et de macaques

Des plaques MSIP S4510 (Millipore) ont été sensibilisées avec 10 µg/ml d'anticorps anti-IFN $\gamma$  de souris ou anti-IFN $\gamma$  de singe (les deux de U-CyTech Utrecht, Pays-Bas) pendant une nuit à 4 °C. Après lavage et blocage, des splénocytes de souris ou des cellules mononucléées du sang périphérique

(CMSP) de macaque ont été déposés en double à deux densités différentes ( $2 \times 10^5$  et  $4 \times 10^5$  cellules/puits) et stimulés pendant une nuit avec des groupes de peptides de 15 mer se chevauchant à une concentration finale de  $4 \mu\text{g/ml}$  de chaque peptide simple. Des diluants pour peptides DMSO (Sigma-Aldrich, Milan, Italie) et ConA (Sigma-Aldrich, Milan, Italie) ont été utilisés respectivement en tant que témoins négatif et positif. Les plaques ont été développées par des incubations subséquentes avec un anticorps anti-IFN $\gamma$  de souris ou anti-IFN $\gamma$  de singe biotinylé (les deux de U-CyTech Utrecht, Pays-Bas), du conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (BD Biosciences, NJ) et finalement avec une solution de BCIP/NBT 1-Step (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Les plaques ont été acquises et analysées par un lecteur de plaque automatisé A.EL.VIS. La réponse du test ELISpot a été considérée comme positive lorsque toutes les conditions suivantes ont été satisfaites : production d'IFN $\gamma$  présente dans les puits stimulés avec le Con-A ; au moins 50 taches/million de splénocytes ou de CMSP spécifiques d'au moins un groupe de peptides ; le nombre de taches observées dans les puits positifs était le triple du nombre détecté dans les puits témoins (DMSO) ; et que les réponses ont diminué avec les dilutions cellulaires. Les données du test ELISpot ont été exprimées en cellules formant des tâches d'IFN $\gamma$  (SFC) par million de splénocytes ou de CMSP.

Coloration intracellulaire de cytokines (ICS) et analyse FACS avec des échantillons de macaques

En bref,  $2 \times 10^6$  CMSP de singe ont été stimulées à  $37^\circ\text{C}$  dans 5 % de  $\text{CO}_2$  pendant 15 à 20 heures en utilisant des groupes de peptides en tant qu'antigène à  $2 \mu\text{g/ml}$  de chaque concentration finale de peptides en présence d'anticorps costimulants anti-CD28/CD49d humains (BD Biosciences, NJ) et de Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Milan, Italie). Du DMSO (Sigma-

Aldrich, Milan, Italie) a été utilisé en tant que témoin négatif, et de l'entérotoxine staphylococcique B (SEB, Sigma-Aldrich, Milan, Italie) a été utilisée en tant que témoin positif. Après stimulation pendant une nuit, les CMSP ont été

5 colorées avec les anticorps de surface suivants : APC anti-CD3 de singe, clone SP34-2 ; PerCp-Cy5.5 anti-CD4 de singe, clone L200 ; PE anti-CD8 humain, clone RPA-T8 (tous de BD Biosciences, NJ). La coloration intracellulaire a été réalisée après traitement avec du Cytofix/Cytoperm et en présence de

10 PermWash (BD Biosciences, NJ) en utilisant le clone MD-1 anti-IFN $\gamma$  humain marqué au FITC (U-CyTech Utrecht, Pays-Bas). Les cellules colorées ont été acquises sur un cytomètre en flux FACS Canto, et analysées en utilisant le logiciel DIVA (BD Biosciences, NJ). Au moins 30,000 événements dépendants de

15 CD8+, CD3+ ont été acquis pour chaque échantillon.

REVENDEICATIONS

1. Vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique pour une utilisation dans l'amorçage ou la stimulation  
5 d'une réponse immunitaire, la construction d'acide nucléique comprenant :

(i) une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci liée de manière fonctionnelle à

10 (ii) un acide nucléique codant pour au moins une chaîne invariante.

2. Vecteur poxviral selon la revendication 1, dans lequel au moins une chaîne invariante codée est issue d'un mammifère.

15

3. Vecteur poxviral selon les revendications 1 ou 2, dans lequel au moins une chaîne invariante codée est caractérisée par au moins l'un des caractères suivants :

20 (i) la région KEY endogène est délétée ou substituée par une séquence différente ;

(ii) la méthionine dans les positions 107 et 115 (chaîne invariante humaine) ou dans les positions 90 et 98 (chaîne invariante murine) ou les positions y correspondant dans une autre chaîne invariante est substituée par un autre acide aminé ;  
25

(iii) les 16 premiers acides aminés de la séquence de la chaîne invariante humaine de type sauvage sont délétés ;

(iv) au moins un peptide de tri est ajouté à, éliminé de ou remplace le peptide de tri endogène de la chaîne invariante,  
30 et/ou

(v) au moins une région CLIP est ajoutée à, éliminée de ou remplace la région CLIP endogène d'au moins une chaîne invariante.

4. Vecteur poxviral selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel au moins une chaîne invariante codée est un fragment de SEQ ID NO : 1 ou SEQ ID NO : 3 d'au moins 40 acides aminés consécutifs ou présente au moins 85 % d'identité de séquence avec le même fragment de SEQ ID NO : 1 ou de SEQ ID NO : 3.

5. Vecteur poxviral selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel au moins une protéine antigénique est une protéine d'un organisme pathogène, une protéine spécifique d'un cancer, ou une protéine associée à une réponse physiologique anormale.

6. Vecteur poxviral selon la revendication 5, où l'organisme pathogène est un virus, une bactérie, un protiste ou un parasite multicellulaire.

7. Vecteur poxviral selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, où le poxvirus est choisi parmi un vecteur viral d'orthopox, parapox, yatapox, avipox et molluscipox.

8. Vecteur poxviral selon la revendication 7, où ledit vecteur viral d'orthopox est un vecteur poxviral de singe, un vecteur poxviral de vache ou un vecteur du virus de la vaccine, de préférence un virus modifié de la vaccine Ankara (MVA).

9. Vecteur poxviral selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, où l'amorçage de la réponse immunitaire fait partie d'un régime de primovaccination-rappel homologue.

10. Vecteur poxviral selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, où l'amorçage de la réponse immunitaire fait partie d'un régime de primovaccination-rappel hétérologue.

5        11. Vecteur poxviral selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, où le vecteur poxviral est administré par les voies intranasale, intramusculaire, sous-cutanée, intradermique, intragastrique, orale et topique.

10        12. Combinaison vaccinale comprenant :

(a) un vecteur poxviral comprenant une construction d'acide nucléique, la construction d'acide nucléique comprenant :

15        (i) une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une première protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci liée de manière fonctionnelle à

(ii) un acide nucléique codant pour au moins une chaîne invariante

et

20        (b) un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci

ou

une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci

25        ou

des particules pseudovirales

30        où au moins un épitope de la première protéine antigénique ou d'un fragment antigénique de celle-ci est immunologiquement identique à la seconde protéine antigénique ou à un fragment de celle-ci.

13. Combinaison vaccinale selon la revendication 12, dans laquelle le vecteur viral est choisi parmi un vecteur



adénoviral, un vecteur poxviral, un vecteur viral adéno-associé, un vecteur lentiviral, un vecteur d'alphavirus, un vecteur du virus de la rougeole, un vecteur d'arénavirus, un vecteur de paramyxovirus, un vecteur de baculovirus, de l'ADN nu et des  
5 particules pseudovirales.

14. Combinaison vaccinale selon la revendication 13, dans laquelle le vecteur adénoviral est un vecteur adénoviral dérivé d'un grand singe non humain, de préférence un vecteur adénoviral  
10 de chimpanzé ou de bonobo.

15. Combinaison vaccinale selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, pour une utilisation dans un régime de primovaccination-rappel.

15

16. Combinaison vaccinale selon la revendication 15, dans laquelle le vecteur poxviral (a) est utilisé pour l'amorçage de la réponse immunitaire et le vecteur viral ou la protéine antigénique de (b) est utilisé pour la stimulation de la réponse  
20 immunitaire.

17. Combinaison vaccinale selon la revendication 15, dans laquelle le vecteur viral ou la protéine antigénique de (b) est utilisé pour l'amorçage de la réponse immunitaire et le vecteur  
25 poxviral (a) est utilisé pour la stimulation de la réponse immunitaire.

18. Combinaison vaccinale selon les revendications 16 ou 17, où la réponse immunitaire est amorcée par une voie  
30 d'administration choisie dans le groupe constitué d'une administration intranasale, une administration intramusculaire, une administration sous-cutanée, une administration intradermique, une administration intragastrique, une

administration orale et une administration topique ; et la réponse immunitaire est stimulée par une voie d'administration choisie dans le groupe constitué d'une administration intranasale, une administration intramusculaire, une administration sous-cutanée, une administration intradermique, une administration intragastrique, une administration orale et une administration topique.

19. Une composition comprenant le vecteur poxviral selon la revendication 1, pour stimuler une réponse immunitaire chez un sujet.

20. La composition selon la revendication 19, pour stimuler une réponse immunitaire chez un sujet par en outre l'administration de

(i) un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci ;

(ii) une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci ; et des particules pseudovirales.

N

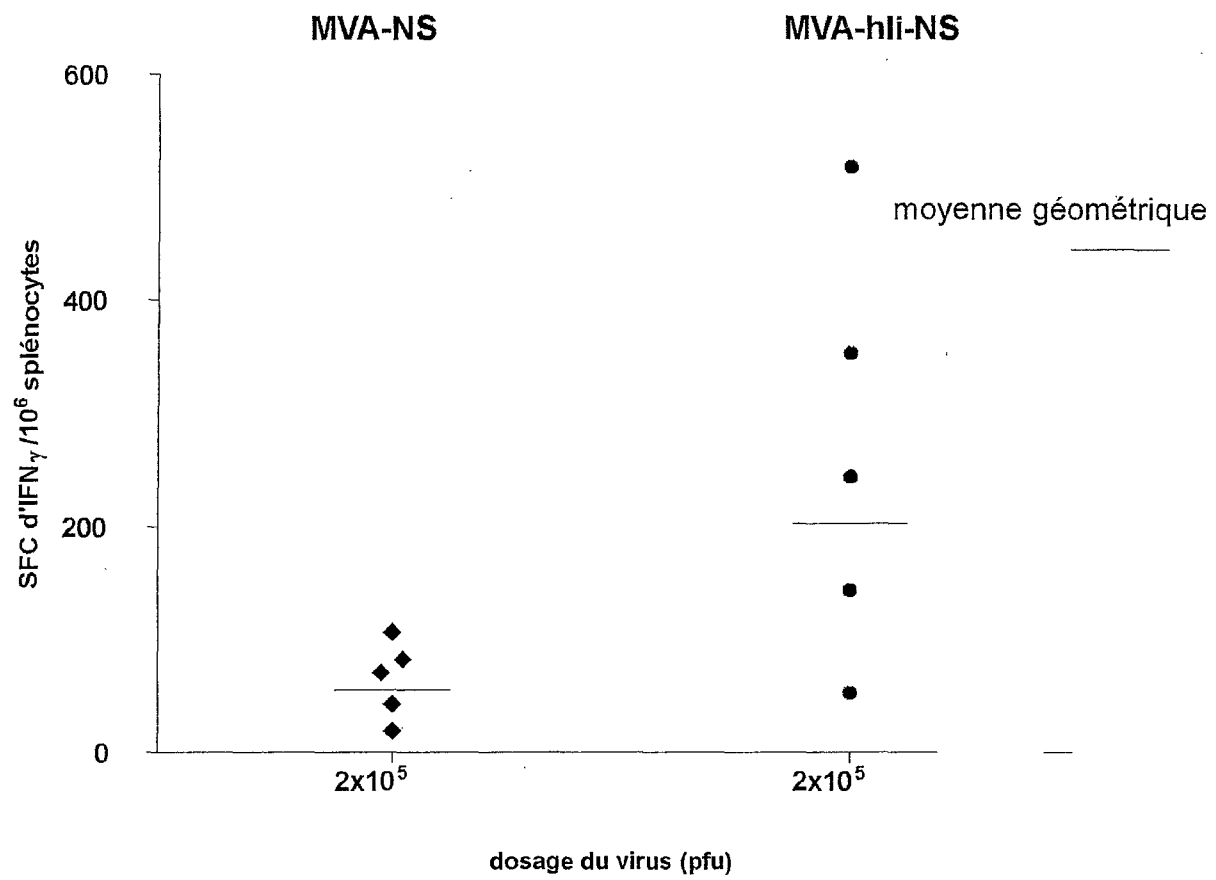


Figure 1

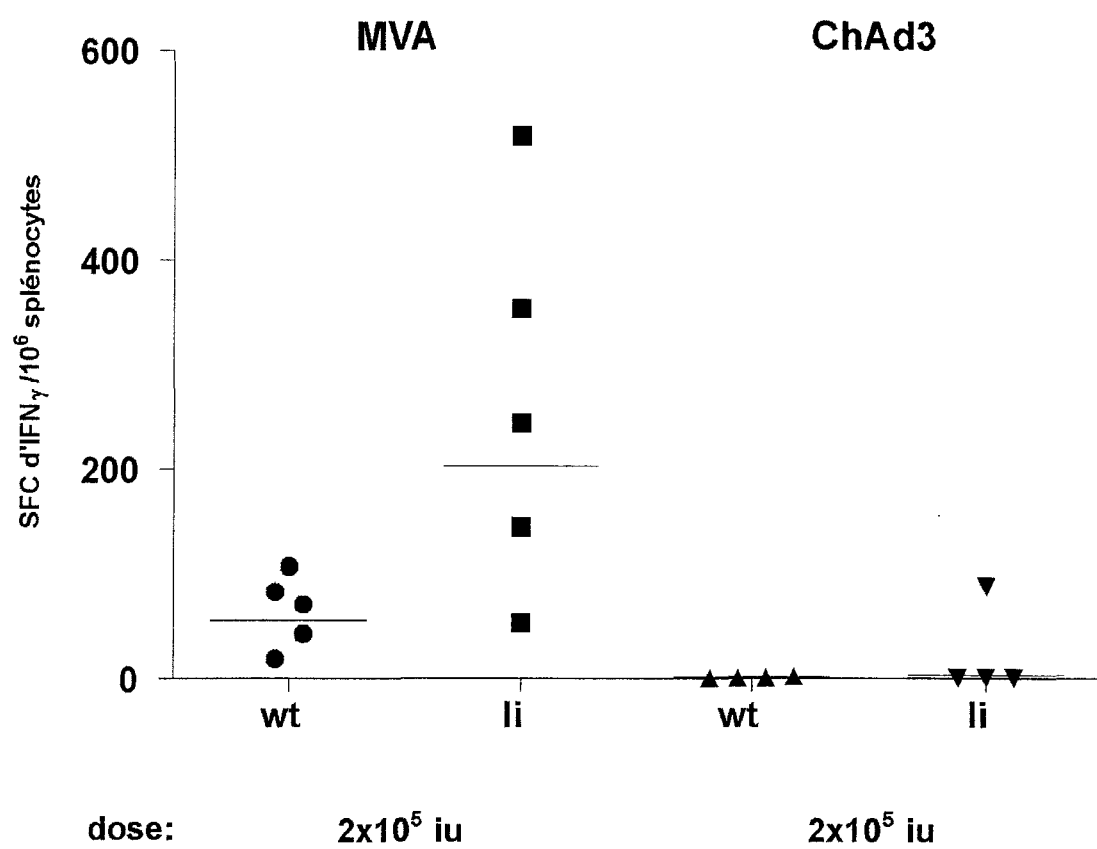


Figure 2

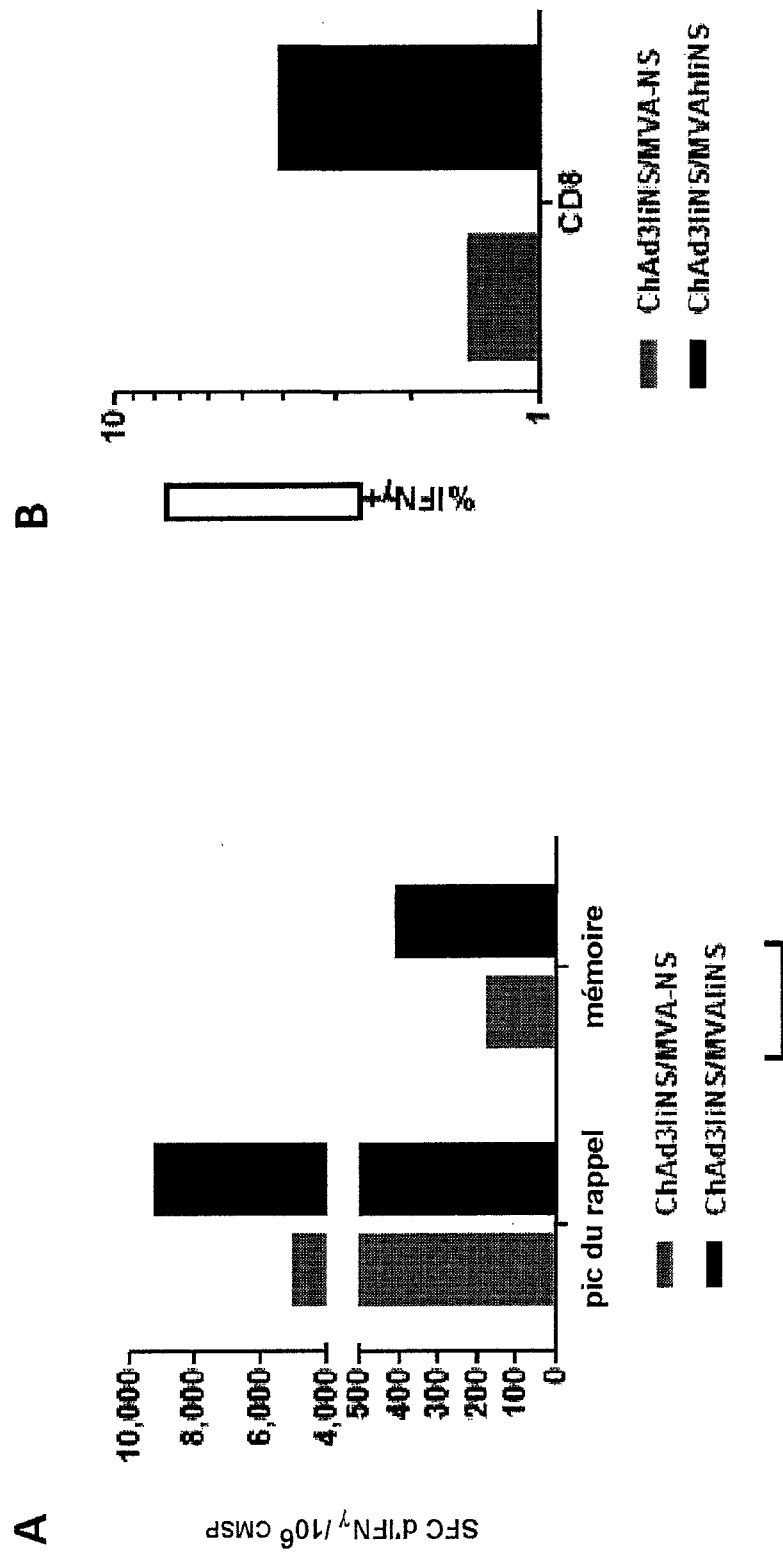
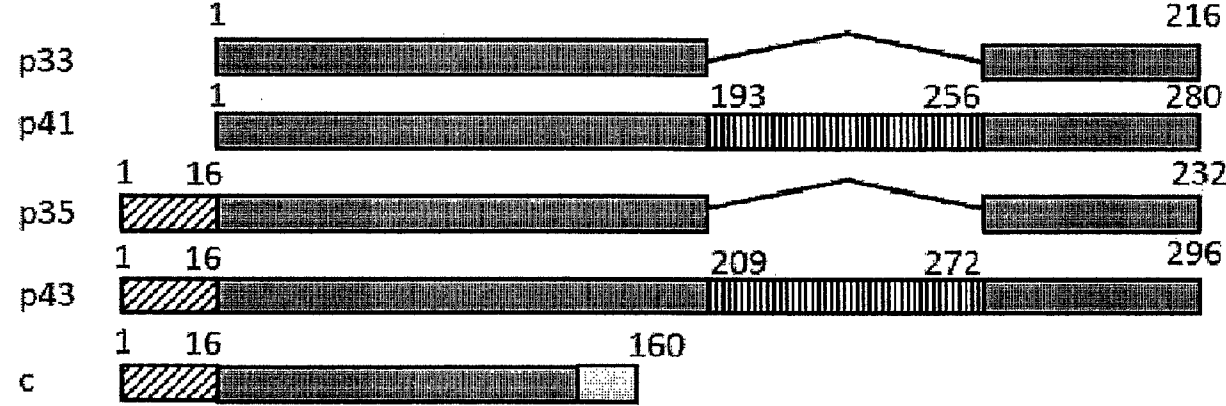


Figure 3

Chaîne invariante humaine



Chaîne invariante murine



Extension N-terminale  
(variante d'initiation de la traduction)



Exon 6b  
(variante d'épissage)



Figure 4

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLI EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE  <b>BPGSKL0004BE00</b>
Demande nationale belge n°  <b>201400166</b>	Date du dépôt  <b>14-03-2014</b>
	Date de priorité revendiquée  <b>15-03-2013</b>
Déposant (Nom)  <b>Okairos AG c/o OBC Suisse AG</b>	
Date de la requête d'une recherche de type international  <b>20-05-2014</b>	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international  <b>SN62028</b>
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous) Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  <b>A61K39/00;C07K14/705</b>	
II. DOMAINES RECHERCHES	
Documentation minimale consultée	
Système de classification	Symboles de la classification
<b>IPC</b>	<b>A61K;C07K</b>
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés	
III. <input type="checkbox"/> IT A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	
IV. <input type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)	

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A61K39/00 C07K14/705  
ADD.

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

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

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

A61K C07K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,D	<p>WO 2010/057501 A1 (KOEENHAVNS UNI UNIVERSITY OF [DK]; HOLST PETER JOHANNES [DK]; THOMSEN) 27 mai 2010 (2010-05-27) cité dans la demande</p> <p>* page 1, lignes 7-9 *</p> <p>* page 2, ligne 24 - ligne 26 *</p> <p>* page 3, ligne 17 - ligne 28 *</p> <p>* page 3, ligne 30 - ligne 35 *</p> <p>* page 8, ligne 9 - ligne 13 *</p> <p>* page 26, ligne 39 - page 31, ligne 32 *</p> <p>* page 31, ligne 35 - page 37, ligne 23 *</p> <p>* page 47, ligne 16 - ligne 27 *</p> <p>* page 50, ligne 34 - page 51, ligne 3 *</p> <p>* page 51, ligne 5 - ligne 10 *</p> <p>* page 59, ligne 27 - ligne 34 *</p> <p>* page 62, ligne 11 - page 65, ligne 32 *</p> <p>* page 72, ligne 11 - page 73, ligne 32 *</p> <p>* page 76, ligne 30 - ligne 33 *</p> <p>* exemple 2 *</p> <p>-/--</p>	1-20



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



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée

28 octobre 2015

Date d'expédition du rapport de recherche de type international

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

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

Fonctionnaire autorisé

Rojo Romeo, Elena



C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>-----</p> <p>FANGFANG CHEN ET AL: "Boosting immune response with the invariant chain segments via association with non-peptide binding region of major histocompatibility complex class II molecules", BMC IMMUNOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 13, no. 1, 27 septembre 2012 (2012-09-27), page 55, XP021128024, ISSN: 1471-2172, DOI: 10.1186/1471-2172-13-55 * abrégé *</p>	1-20
A	<p>-----</p> <p>MARIA R. SORENSEN ET AL: "Vaccination with an adenoviral vector encoding the tumor antigen directly linked to invariant chain induces potent CD4 + T-cell-independent CD8 + T-cell-mediated tumor control", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 39, no. 10, 1 octobre 2009 (2009-10-01), pages 2725-2736, XP055060938, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.200939543 * abrégé *</p>	1-20
A	<p>-----</p> <p>M. GRUJIC ET AL: "Fusion of a viral antigen to invariant chain leads to augmented T-cell immunity and improved protection in gene-gun DNA-vaccinated mice", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 90, no. 2, 1 février 2009 (2009-02-01), pages 414-422, XP055060939, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.002105-0 * abrégé *</p>	1-20
A	<p>-----</p> <p>SABARTH N ET AL: "Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 3, 8 janvier 2010 (2010-01-08), pages 650-656, XP026793732, ISSN: 0264-410X [extrait le 2009-11-05] * abrégé *</p> <p>-----</p>	1-20

# RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°

BE 201400166

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
W0 2010057501	A1	27-05-2010	
		AU 2009317691 A1	27-05-2010
		CA 2743229 A1	27-05-2010
		CN 102292102 A	21-12-2011
		CN 104404068 A	11-03-2015
		EP 2355842 A1	17-08-2011
		EP 2865387 A2	29-04-2015
		JP 2012509071 A	19-04-2012
		JP 2015061530 A	02-04-2015
		RU 2011125306 A	27-12-2012
		US 2011293704 A1	01-12-2011
		US 2015056227 A1	26-02-2015
		W0 2010057501 A1	27-05-2010
-----			



## OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN62028	Date du dépôt (jour/mois/année) 14.03.2014	Date de priorité (jour/mois/année) 15.03.2013	Demande n° BE201400166
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/00 C07K14/705			
Déposant Okairos AG c/o OBC Suisse AG			

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

---

**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 internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

## OPINION ÉCRITE

Demande n°  
BE201400166

---

**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	1-20
	Non : Revendications	
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-20
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-20
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

**voir feuille séparée**

---

**Cadre n° VIII Observations relatives à la demande**

---

**voir feuille séparée**

1 **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**

1.1 Il est fait référence aux documents suivants:

D1 WO 2010/057501 A1 (KOESENHAVNS UNI UNIVERSITY OF [DK]; HOLST PETER JOHANNES [DK]; THOMSEN) 27 mai 2010 (2010-05-27) cité dans la demande

D2 FANGFANG CHEN ET AL: "Boosting immune response with the invariant chain segments via association with non-peptide binding region of major histocompatibility complex class II molecules",  
BMC IMMUNOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB,  
vol. 13, no. 1, 27 septembre 2012 (2012-09-27), page 55, XP021128024,  
ISSN: 1471-2172, DOI: 10.1186/1471-2172-13-55

D3 MARIA R. SORESEN ET AL: "Vaccination with an adenoviral vector encoding the tumor antigen directly linked to invariant chain induces potent CD4 + T-cell-independent CD8 + T-cell-mediated tumor control",  
EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,  
vol. 39, no. 10, 1 octobre 2009 (2009-10-01), pages 2725-2736, XP055060938,  
ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.200939543

D4 M. GRUJIC ET AL: "Fusion of a viral antigen to invariant chain leads to augmented T-cell immunity and improved protection in gene-gun DNA-vaccinated mice",  
JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY,  
vol. 90, no. 2, 1 février 2009 (2009-02-01), pages 414-422, XP055060939,  
ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.002105-0

D5 SABARTH N ET AL: "Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model",  
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB,

vol. 28, no. 3, 8 janvier 2010 (2010-01-08), pages 650-656,  
XP026793732,  
ISSN: 0264-410X  
[extrait le 2009-11-05]

1.2 Nouveauté

Aucun des documents cités ne divulgue l'objet des présentes revendications.  
Les revendications 1-20 sont donc nouvelles.

1.3 Activité inventive

Concernant les revendications indépendantes 1 et 12, l'art antérieur es  
WO2010057501/D1.

Ce document divulgue que l'amorçage avec DNA-liGP, une construction d'ADN exprimant la glycoprotéine G du LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire) fusionnée à la chaîne invariable (Li) améliore considérablement la réponse des cellules T CD8+ induite ultérieurement par la même construction génique exprimée par un adénovirus de sérotype 5 vecteur (Ad5-liGP), fournissant un argument fort pour l'inclusion de constructions géniques basés sur la chaîne invariable li d'ADN pour de futures protocoles de primovaccination-rappel hétérologues (page 76, lignes 30-33).

La différence entre cette divulgation et la revendication 1 est que c'est un vecteur poxviral qui est utilisé pour l'amorçage et le rappel, au lieu d'un vecteur adénoviral.

L'effet technique allégué est que la réponse immunitaire est plus forte (Fig. 2 of la présente demande).

Le problème technique objectif peut donc être formulé comme étant l'amélioration du vaccin divulgué en D1.

La solution proposée par la revendication 1 (est d'utiliser un vecteur poxviral au lieu d'un vecteur adénoviral.

Cette utilisation est cependant déjà divulguée par D1 (page 47, lignes 16-27; page 50, ligne 34 à page 51, ligne 3).

En effet, il était déjà suggéré d'utiliser les vecteurs poxviraux entre autres pour exprimer des constructions géniques antigènes-chaîne invariable. Il n'y avait donc qu'un nombre limité de possibilités de vecteurs proposés.

Par conséquent, l'homme du métier aurait essayé les vecteurs cités et aurait obtenu l'effet technique revendiqué.

La revendication 1 n'est donc pas inventive.

- 1.4 Les revendications 2 (séquence humaine utilisée en D1 et donc mammifère), 4 (page 21, ligne 26 à page 25, ligne 9), 5 (page 31, ligne 35 à page 37, ligne 23), 6 (page 32, ligne 6 à page 37, ligne 23), 7 et 8 (virus de la vaccine, page 47, lignes 16-27; page 50, ligne 34 à page 51, ligne 3), 9 et 10 (page 8, lignes 9-13), 11 (page 59, lignes 27 à 34) manquent d'activité inventive.
- 1.5 La revendication 3 concerne des modifications de la chaîne invariante. D1 divulgue que des modifications des régions KEY et CLIP peuvent être effectuées sans réduire l'effet d'amorçage immunitaire (page 2, lignes 24-26, page 26, ligne 39 to page 31, ligne 32, exemple 2).

La présente demande ne discute, ni ne fournit aucune évidence que les modifications telles que dans la revendication 3 ont un effet technique qui ne soit pas déjà divulgué par D1. La revendication 3 n'est donc pas inventive.

- 1.6 Il est également fait référence aux documents D2-D5 qui étudient des vaccins comprenant un antigène fusionné à la chaîne invariable dans des protocoles de primovaccination-rappel homologues et hétérologues.
- Dans tous les cas, la fusion à la chaîne invariable mène à une amélioration de la réponse immunitaire.
- 1.7 La revendication 12 concerne une combinaison vaccinale comprenant (a) le vecteur poxviral de la revendication 1 et (b) un vecteur comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour au moins une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci, ou une seconde protéine antigénique ou un fragment antigénique de celle-ci, ou des particules



pseudovirales où au moins un épitope de la première protéine ou d'un fragment antigénique de celle-ci est immunologiquement identique à la seconde protéine antigénique ou à un fragment de celle-ci.

De telles combinaisons sont également considérées dans D1 (voir page 62, ligne 11 à page 65, ligne 32).

Les modes de réalisation des revendications 13 à 20 sont donc triviales dans ce domaine technique (voir également ci-dessus).

Les revendications 13-20 manquent donc d'activité inventive.

1.8 En conséquent, les revendications 1-20 manquent d'activité inventive.

2 Application industrielle

L'objet du présent jeu de revendications a une application industrielle.

3 Remarque: les revendications 19 et 20 concernent des méthodes de traitement.

4 **Ad point VIII**

**Certaines observations relatives à la demande**

Clarté, support par la description et divulgation complète et permettant la mise en oeuvre de l'invention

4.1 La revendication 3 n'est pas claire car aucun numéro de séquence n'est fourni. Les positions données n'ont donc aucun contenu technique et les positions correspondantes dans une autre chaîne invariante ne peuvent donc pas être déterminées.

4.2 La présente demande ne démontre pas qu'une chaîne invariable ayant un fragment quelconque de 40 acides aminés consécutifs des séquences SEQ ID NO: 1 or 3, ou un fragment ayant 85% d'identité avec le premier fragment a le même effet technique que la chaîne invariable utilisée dans les exemples.

La revendication 4 manque donc de support dans la description.

- 4.3 Concernant la revendication 12, la terminologie "immunologiquement identique" n'est pas claire: il pourrait s'agir du même épitope or d'un autre épitope du même organisme.
- 4.4 La revendication 17 se réfère au vecteur viral ou la protéine antigénique de (a), alors que (a) de la revendication 12 concerne un vecteur poxviral, et que la revendication 17 fait également référence au vecteur poxviral en (b). Ceci rend la revendication peu claire.