

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 05/12/2018

(21) Numéro de demande : BE2017/5855

(22) Date de dépôt : 23/11/2017

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 39/00, A61K 39/095, A61K 39/116, A61K 39/385, A61K 39/108, A61K 39/112, A61K 39/04, A61K 39/02, A61K 39/05, A61K 39/015

(30) Données de priorité :

25/11/2016 GB 1619946.5

27/07/2017 GB 1712096.5

(71) Demandeur(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

(72) Inventeur(s) :

ALFINI Renzo
53100 SIENA
Italie

MICOLI Francesca
53100 SIENA
Italie

SAUL Allan James
53100 SIENA
Italie

(54) CONJUGUES IMMUNOGENES ET LEUR UTILISATION

(57) La technologie fournie se situe dans le domaine de la conjugaison de vésicules de membrane externe natives (nOMV), non extraites par un détergent, à des antigènes pour former des conjugués nOMV-antigène, qui sont particulièrement utiles pour des compositions immunogènes et une immunisation ; des procédés pour la préparation et l'utilisation de tels conjugués sont également fournis.

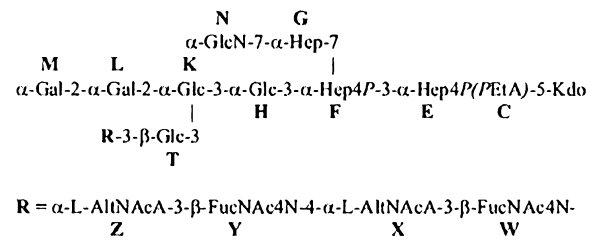


FIG. 1

CONJUGUES IMMUNOGENES ET LEUR UTILISATION

Cette invention se situe dans le domaine de la conjugaison de vésicules de membrane externe « natives » (nOMV), non extraites par un détergent, à des antigènes, pour former des conjugués nOMV-antigène, particulièrement utiles pour une immunisation.

Contexte de l'art

La conjugaison d'antigènes à des supports est une procédure établie pour améliorer l'immunogénicité, spécialement pour des saccharides. Par exemple, les saccharides capsulaires bactériens sont des antigènes naturellement indépendants des lymphocytes T qui donnent naissance à une réponse immunitaire à laquelle il manque plusieurs propriétés importantes. La conjugaison à une fraction de support convertit ces saccharides en antigènes dépendants des lymphocytes T qui peuvent alors produire un effet de mémoire immunologique, et déclenchent également des réponses immunitaires efficaces chez les jeunes enfants.

Une source connue de support protéique dans de tels conjugués est le complexe des protéines de membrane

externe (OMPC) de *N. meningitidis* du séro groupe B (par exemple, voir le document EP-0467714, Merck & co.), qui a été inclus en tant que support dans des vaccins approuvés à base de conjugués de *H. influenzae* B. L'OMPC a été également utilisé comme support dans des conjugués de protéines. Selon l'art antérieur, l'OMPC est conjugué à un antigène par l'intermédiaire d'un résidu de protéine, qui peut être activé ou modifié chimiquement afin d'effectuer plus efficacement la conjugaison avec l'antigène choisi.

Wu et al. (PNAS USA 2006 ; 103(48): 18243-18248) rapportent que la conjugaison de Pfs25H (une protéine humaine bloquant la transmission du paludisme) à l'OMPC a abouti à un vaccin à base de conjugué Pfs25H-OMPC qui a été > 1000 fois plus puissant dans la production d'une réactivité anti-Pfs25H par la technique ELISA chez des souris par rapport à une dose similaire de Pfs25H seule. La conjugaison de l'OMPC à la protéine Pfs25H peut être obtenue en faisant réagir la Pfs25H activée par un maléimide avec des protéines de membrane externe thiolées au sein de l'OMPC (pour une référence générale, voir, par exemple, le document WO 2006/124712), comme il est représenté sur le schéma 1.

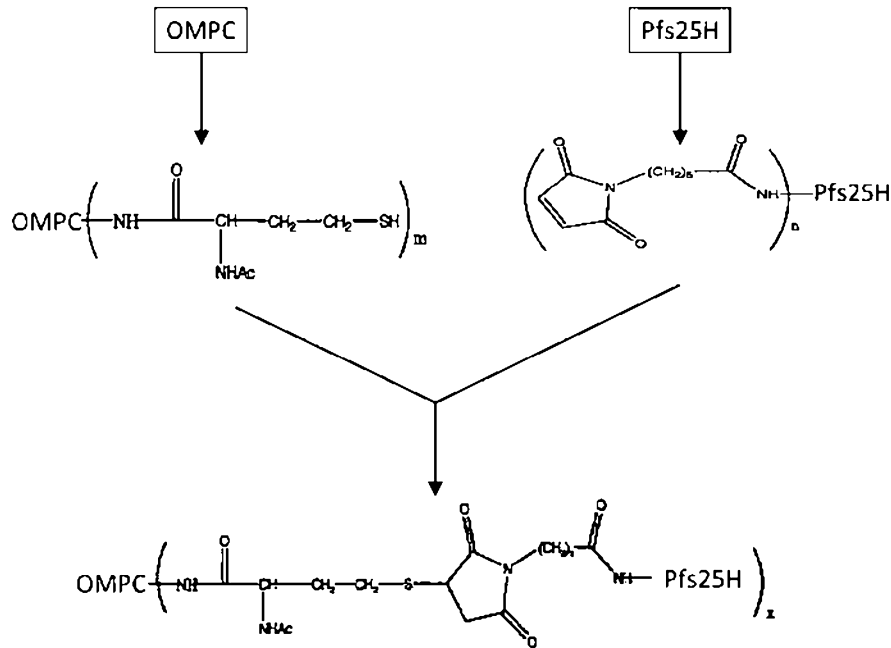


Schéma 1

Même si le procédé peut représenter une voie de
 5 synthèse valable, les vésicules considérées peuvent être
 difficiles à obtenir sous une forme pure, et elles sont
 habituellement recueillies par l'intermédiaire de
 procédés laborieux. En outre, la connexion avec
 l'antigène choisi nécessite la présence et l'activation
 10 d'une protéine de vésicule appropriée, posant ainsi un
 problème supplémentaire à la lumière de l'utilisation de
 détergents ou d'agents chimiques durant l'isolement des
 vésicules, qui peuvent modifier la composition des
 protéines de surface. Par conséquent, il existe toujours
 15 le besoin de fournir de nouveaux conjugués utiles en
 tant que composés immunogènes qui surmontent les
 problèmes de l'art antérieur, et qui peuvent être obtenus
 par une procédure simple et pratique.

Le demandeur a découvert à présent que lorsque des
 20 NOMV sont connectées à des antigènes choisis par

l'intermédiaire de fractions saccharidiques, les conjugués ainsi obtenus sont dotés d'une immunogénicité remarquable et peuvent être obtenus par un procédé fiable et pratique, tel que décrit ci-dessous plus en détail.

5

Résumé de l'invention

Dans un premier aspect, l'invention se rapporte à un conjugué immunogène nOMV-antigène, comprenant une vésicule de membrane externe native (nOMV) obtenue par un procédé dépourvu de détergent, comportant au moins
10 une fraction de saccharide de surface natif connectée à au moins un antigène étranger choisi.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé de préparation dudit conjugué, comprenant les
15 étapes suivantes :

i) l'activation d'au moins une fraction de saccharide de nOMV, généralement liée à la surface des nOMV, et

ii) la connexion du saccharide activé ainsi obtenu
20 à au moins un antigène choisi.

Selon un mode de réalisation préféré, les saccharides liés à la surface des nOMV sont activés par oxydation, et ensuite connectés avec les antigènes choisis, de façon davantage préférée dans des conditions
25 d'amination réductrice.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte également au conjugué ci-dessus pour une utilisation en tant que médicament, particulièrement en tant que composé immunogène, ou pour la préparation d'une
30 composition immunogène ou d'un vaccin.

Dans encore un autre aspect, l'invention se rapporte à une composition immunogène ou à un vaccin, comprenant le conjugué indiqué ci-dessus et au moins un support ou un adjuvant pharmaceutiquement acceptable ;
5 et à un procédé pour produire une réponse immunitaire chez un vertébré, comprenant l'administration de ladite composition ou dudit vaccin.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte également à l'utilisation de nOMV pour la préparation de
10 conjugués immunogènes.

Brève description des dessins

La figure 1 représente les structures de -OAg pour *S. sonnei*.

15 La figure 2 représente les titres en IgG anti-Vi (figure 2A) et anti-OAg (figure 2B) après immunisation avec le saccharide Vi fragmenté (fVi) conjugué à des nOMV de *S. typhimurium* comparativement au fVi mélangé physiquement avec lesdites nOMV ou conjugué au support
20 plus traditionnel, le CRM197 (formulé avec du Alhydrogel). Des souris CD1 femelles, âgées de 5 semaines (8 par groupe) ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec 1 µg de Vi/dose. Les titres ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42.

25 La figure 3 représente les titres en IgG anti-CTF1232 après immunisation avec le polypeptide CTF1232 conjugué à divers supports (formulés avec du Alhydrogel). Des souris CD1 femelles, âgées de 5 semaines (8 par groupe) ont été vaccinées par voie intranasale avec 30 µl
30 de vaccin (15 µl par narine) aux jours de l'étude 0, 21

et 38. Les sérums ont été recueillis aux jours 0, 14, 35 et 52. La dose était de 0,5 µg de CTF1232.

La figure 4 représente les titres en IgG anti-Pfs25 après immunisation avec le polypeptide Pfs25 conjugué à des nOMV de *S. typhimurium* 1418 ΔtolR comparativement au Pfs25 seul ou mélangé physiquement avec lesdites nOMV. Des souris CD1 femelles, âgées de 5 semaines (8 par groupe) ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec 0,1 µg de Pfs25/dose (figure 4A, avec Alhydrogel) ou 1 µg de Pfs25/dose (figure 4B, sans Alhydrogel). Les titres ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42. La figure 4C représente les titres en IgG anti-OAg en utilisant 2 et 0,1 µg de Pfs25/dose, et correspondant à 10 et 0,5 µg de nOMV/dose, respectivement (formulé avec du Alhydrogel). A nouveau, des souris CD1 femelles, âgées de 5 semaines (8 par groupe) ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28.

La figure 5 représente les titres en IgG anti-RO6C (figure 5A) et les titres en IgG anti-OAg (figure 5B) après immunisation avec RO6C seul, ou conjugué à des vésicules nOMV de *S. typhimurium* 1418 ΔtolR (formulées avec du Alhydrogel). Un conjugué recyclé a été préparé par recyclage de RO6C non conjugué à partir du premier lot de conjugaison. Des souris CD1 femelles, âgées de 5 semaines (8 par groupe) ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28, et des doses de 1, 4 et 20 µg de RO6C ont été utilisées. Pour les conjugués, les doses correspondantes de nOMV étaient de 13 µg, 52 µg et 258 µg, respectivement (4 µg de RO6C et 32 µg de nOMV

pour le conjugué recyclé). Les titres en IgG ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42.

Figure 6a - Réponse en IgG anti-Pfs25 induite chez des souris (200 µl par dose injectée en SC aux jours 0 et 28, prélèvements aux jours 0, 14, 27 et 42) par des conjugués de nOMV de l'invention produit par conjugaison de nOMV de *S. typhimurium* avec l'antigène Pfs25, avec ou sans réaction de neutralisation, selon les modes de réalisation de l'invention.

Figure 6b - Réponse anti-OAg induite chez des souris (200 µl par dose injectée en SC aux jours 0 et 28, prélèvements aux jours 0, 14, 27 et 42) par des conjugués de nOMV de l'invention produits par conjugaison de nOMV de *S. typhimurium* avec l'antigène Pfs25, avec ou sans réaction de neutralisation, selon les modes de réalisation de l'invention.

Description détaillée de l'invention

Pour faciliter la compréhension de la présente invention, un certain nombre de termes et de phrases sont définis ci-dessous. Les synonymes ou les variantes reconnues dans l'art des termes et des phrases qui suivent (y compris les temps passé, présent, etc.), même s'ils ne sont pas décrits spécifiquement, sont envisagés.

Tel qu'utilisé dans la présente divulgation et les revendications, les formes au singulier « un », « une », « le » et « la » comprennent les formes au pluriel sauf si le contexte indique clairement le contraire ; c'est-à-dire, « un(e) » signifie « un(e) ou plusieurs » sauf indication contraire.

Les termes « environ » ou « approximativement » signifient à peu près, autour de, ou dans les régions de. Les termes « environ » ou « approximativement » signifient en outre au sein d'une plage d'erreurs contextuelles acceptable pour la valeur particulière déterminée par une personne de compétence moyenne dans le domaine, qui dépendra en partie de comment la valeur est mesurée ou déterminée, c'est-à-dire, les limitations du système de mesure ou le degré de précision requis pour un objectif particulier, par exemple, la quantité d'un nutriment au sein d'une formulation nutritive. Lorsque les termes « environ » ou « approximativement » sont utilisés conjointement avec une plage numérique, ils modifient cette plage par extension des limites au-dessus et au-dessous des valeurs numériques présentées. Par exemple, « entre environ 0,2 et 5,0 mg/ml » signifie que les limites de la plage numérique s'étendent au-dessous de 0,2 et au-dessus de 5,0 si bien que la valeur particulière en question atteint le même résultat fonctionnel qu'au sein de la plage. Par exemple, « environ » et « approximativement » peuvent signifier à 1 ou plus de 1 écart-type selon la pratique dans l'art. En variante, « environ » et « approximativement » peuvent signifier une plage jusqu'à 20 %, de préférence jusqu'à 10 %, de façon davantage préférée jusqu'à 5 %, et de façon davantage préférée jusqu'à 1 % d'une valeur donnée.

Le terme « et/ou » tel qu'utilisé dans une phrase telle que « A et/ou B » est censé inclure « A et B », « A ou B », « A », et « B ». De la même façon, le terme « et/ou » tel qu'utilisé dans une phrase telle que « A,

B, et/ou C » est censé englober chacun des modes de réalisation suivants : A, B, et C ; A, B, ou C ; A ou C ; A ou B ; B ou C ; A et C ; A et B ; B et C ; A (seul) ; B (seul) ; et C (seul).

5 Sauf précision contraire, à toutes les désignations « A %-B % », « A-B % », « A % à B % », « A à B % », « A %-B », « A % à B », il est donné la signification habituelle et conventionnelle. Dans certains modes de réalisation, ces désignations sont synonymes.

10 Les termes « sensiblement » ou « sensible » signifient que la condition décrite ou revendiquée fonctionne dans tous les aspects importants comme le standard décrit. Ainsi, « sensiblement dépourvu » est censé englober des conditions qui fonctionnent dans tous
15 les aspects importants comme des conditions dépourvues, même si les valeurs numériques indiquent la présence de certaines impuretés ou substances. « Sensible » signifie généralement une valeur supérieure à 90 %, de préférence supérieure à 95 %, de façon préférée entre toutes
20 supérieure à 99 %. Lorsque des valeurs particulières sont utilisées dans le mémoire et dans les revendications, sauf indication contraire, le terme « sensiblement » signifie avec une plage d'erreurs acceptable pour la valeur particulière.

25 Une « quantité efficace » signifie une quantité suffisante pour provoquer l'effet ou le résultat référencé. Une « quantité efficace » peut être déterminée empiriquement et de façon routinière en utilisant des techniques connues en relation avec
30 l'objectif indiqué.

Tel qu'utilisé ici, « hétérologue » signifie que les deux molécules ou structures référencées ou plus sont dérivées d'un organisme différent. Par exemple, un antigène hétérologue est l'un qui est dérivé d'un organisme différent de la vésicule nOMV à laquelle il est annexé. « Homologue » tel qu'utilisé ici signifie que les deux molécules ou structures référencées ou plus sont dérivées du même organisme.

Tel qu'utilisé ici, « étranger » signifie que les deux molécules ou structures référencées ou plus ne sont pas associées naturellement les unes aux autres. Par exemple, un antigène choisi qui est censé ici être « étranger à » un saccharide de surface de nOMV ici signifie que l'antigène n'est pas conjugué de façon naturelle ou innée au saccharide de surface et, par conséquent, n'est pas conjugué de façon naturelle à la molécule de nOMV *même si* l'antigène et le saccharide (ou la molécule de nOMV) peuvent provenir du même organisme. De cette façon, un antigène étranger n'est pas nécessairement un antigène hétérologue mais un antigène hétérologue est un antigène étranger.

« L'identité de séquence » peut être déterminée par l'algorithme de recherche d'homologie de Smith-Waterman tel que mis en œuvre dans le programme MPSRCH (Oxford Molecular), en utilisant une recherche affine de brèche avec les paramètres de pénalité d'ouverture de brèche = 12 et de pénalité d'extension de brèche = 1, mais elle est déterminée de préférence par l'algorithme d'alignement global de Needleman-Wunsch (voir, par exemple, Rubin (2000) *Pediatric. Clin. North Am.* 47: 269-285), en utilisant les paramètres par défaut (par

exemple, avec une pénalité d'ouverture de brèche = 10,0, et avec une pénalité d'extension de brèche = 0,5, en utilisant la matrice de score EBLOSUM62). Cet algorithme est mis en œuvre de façon pratique dans l'outil Needle du logiciel EMBOSS. Lorsque la demande se rapporte à l'identité de séquence avec une SEQ ID particulière, l'identité est censée être calculée sur la longueur entière de cette SEQ ID.

Le terme « p/p en % » indique le pourcentage en poids d'un composant donné, par rapport à un composant différent ou par rapport à la teneur totale d'une composition, selon l'indication.

De façon analogue, le terme « % v/v » indique le pourcentage en volume d'un composant donné, par rapport à un composant différent ou par rapport à la teneur totale d'une composition, selon l'indication.

Le terme « -OAg » (antigène O) est utilisé au sein de la présente invention pour indiquer une fonctionnalité d'antigène présente dans les lipopolysaccharides (LPS) ou les lipooligosaccharides (LOS) sur la surface de la nOMV considérée, utile pour la conjugaison avec un antigène correct (généralement indiqué par Ag) selon l'invention. De façon plus détaillée, les LPS sont généralement formés de trois parties différentes, connues en tant que : le lipide A (responsable de la toxicité des LPS), le noyau oligosaccharidique et la chaîne -OAg, un polymère répétitif de glycanes et le principal contributeur à la spécificité sérologique des bactéries.

Le terme « groupe alkyle ou alcényle en C₁ à C_x linéaire ou ramifié » comprend dans sa signification un

groupe alkyle ou alcényle linéaire ou ramifié saturé ou insaturé bivalent comportant 1 à x atomes de carbone. Par exemple, le terme groupe alkyle ou alcényle en C₁ à C₁₀ bivalent comprend dans sa signification un groupe
5 alkyle ou alcényle saturé ou insaturé bivalent comportant 1 à 10 atomes de carbone tel que les groupes méthyle, éthyle, vinyle, allyle et analogues.

Tel qu'utilisé ici, le terme « fraction saccharidique (ou de sucre) » comprend dans sa
10 signification des monosaccharides, ainsi que des unités polysaccharidiques. Il faudra comprendre que les fractions saccharidiques peuvent exister sous forme ouverte et fermée (cycle) et que, lorsque des formes fermées sont présentées ici dans les formules
15 structurales, les formes ouvertes sont également englobées par l'invention. De façon similaire, il faudra comprendre que les fractions saccharidiques peuvent exister sous des formes de pyranose et de furanose et que, lorsque des formes de pyranose sont présentées ici
20 dans les formules structurales, les formes de furanose sont également englobées. Différentes formes anomères de fractions saccharidiques sont également englobées.

Le terme « oligosaccharide » comprend dans sa signification des polysaccharides comportant de 3 à
25 10 unités monosaccharidiques.

Sauf disposition contraire, le terme « polypeptide » se rapporte à des polypeptides d'une longueur quelconque capables d'agir comme antigène choisi. Le polymère d'acides aminés formant le
30 polypeptide de l'invention peut être linéaire ou ramifié, il peut comprendre des acides aminés modifiés, et il

peut être interrompu par des acides non aminés. Le terme englobe également un polymère d'acides aminés qui a été modifié naturellement ou par intervention ; par exemple, la formation de liaisons disulfure, la glycosylation, la lipidation, l'acétylation, la phosphorylation, ou toute autre manipulation ou modification, telle que la conjugaison avec un composant de marquage. Sont également compris au sein de la définition, par exemple, des polypeptides contenant un ou plusieurs analogues d'un acide aminé (y compris, par exemple, des acides aminés non naturels, etc.), ainsi que d'autres modifications connues dans l'art. Les polypeptides peuvent apparaître sous la forme de chaînes simples ou de chaînes associées.

La « masse moléculaire moyenne en poids » est censée indiquer la masse moléculaire moyenne en poids obtenue par le moyen arithmétique ordinaire ou la moyenne des masses moléculaires du composant individuel, par exemple, des acides aminés dans le cas de dérivés polypeptidiques.

Le terme « polysaccharides/saccharides capsulaires » (PSC) indique ces saccharides qui peuvent se trouver dans la couche qui repose à l'extérieur de l'enveloppe cellulaire des bactéries, faisant ainsi partie de l'enveloppe externe de la cellule bactérienne elle-même. Les PSC sont exprimés sur la surface la plus externe d'un large éventail de bactéries, et dans certains cas même dans des champignons.

Sauf disposition contraire, le terme « conjugaison » indique la connexion ou la liaison des

entités soumises, particulièrement en référence à la nOMV et aux fractions antigéniques choisies.

Par « quantité immunologiquement efficace », il est signifié que l'administration de cette quantité à un individu, soit sous la forme d'une dose unique soit 5 faisant partie d'une série, est efficace pour le traitement ou la prévention. Cette quantité peut varier selon la santé et la condition physique de l'individu à traiter, l'âge, le groupe taxonomique de l'individu à 10 traiter (par exemple, primate non humain, primate, etc.), la capacité du système immunitaire de l'individu à synthétiser des anticorps, le degré de protection souhaité, la formulation du vaccin, l'estimation du médecin traitant de la situation médicale, et d'autres 15 facteurs pertinents. On s'attend à ce que la quantité se situe au sein d'une plage relativement large qui peut être déterminée par l'intermédiaire d'essais de routine.

Le terme « nOMV » ici indique une vésicule isolée du milieu ou détachée à partir de cellules, et il s'agit 20 de vésicules membranaires intactes non exposées à des détergents ou à des agents dénaturants, c'est-à-dire, non extraites par un détergent. Les nOMV de l'invention présentent les protéines de membrane externe (OMP) et le lipopolysaccharide (LPS) dans leur conformation native 25 et orientation correcte dans l'environnement membranaire naturel, et auxquelles il manque habituellement les composants cytoplasmiques.

Au contraire, le terme « OMV » ou « dOMV » englobe diverses vésicules protéoliposomiques obtenues par 30 rupture de la membrane externe d'une bactérie Gram négatif généralement par un procédé d'extraction par un

détergent pour former des vésicules à partir de celle-ci. Des complexes de protéines de membrane externe (par exemple, l'OMPC de *Neisseria meningitidis*) peuvent être considérés dans une telle définition, parce qu'ils ont

5 une structure tridimensionnelle et une composition similaire aux dOMV, et qu'ils sont isolés par des procédures d'extraction par un détergent (voir, par exemple, les documents EP 0467714, US 4 271 147, US 4 459 286 et US 4 830 852). Le procédé d'extraction

10 par un détergent élimine le LPS et les phospholipides, conjointement avec les lipoprotéines immunoprotectrices. Une telle élimination change la structure des vésicules natives et favorise l'agrégation. L'agrégation peut conduire à des problèmes conséquents en termes de

15 développement du procédé (rendement, régularité de production et de stabilité). A la différence des nOMV, caractérisées par une distribution homogène définie des tailles (généralement dans la plage de 20 à 250 nm, mesurée par la technique de diffusion dynamique de la

20 lumière DLS), les dOMV présentent une distribution hétérogène indéfinie des tailles (habituellement dans la plage de 550 à 5500 nm mesurée par la technique de diffusion dynamique de la lumière DLS) provoquée par une agrégation des vésicules induite par le détergent (voir

25 pour une référence générale, Vaccine 28, 2010, 4810). Le procédé d'extraction par un détergent provoque également une contamination de la composition contenant les OMV (par exemple, des vaccins) avec des protéines cytoplasmiques comme conséquence de la lyse des cellules

30 bactériennes.

Selon des méthodologies de l'art antérieur, les dOMV et les nOMV peuvent être analysées et décrites en termes de taille, de forme et d'apparence globale des impuretés ou des matériaux contaminants non-OMV (comme les agrégats de vésicules ou les résidus de détergent dans le cas des dOMV) en utilisant la microscopie électronique en transmission (MET). Pour des références détaillées concernant les différences entre les dOMV et les nOMV, voir, par exemple, van de Waterbeemd (2013) J. Prot. Res. "Quantitative Proteomics Reveals Distinct Differences in the Protein Content of Outer Membrane Vesicle Vaccines" ; et J. Klimentova et al. Microbiological Research 170 (2015) 1-9 "Methods of isolation and purification of the outer membrane vesicles from gram-negative bacteria".

Comme il a été indiqué ci-dessus, dans un premier aspect, l'invention se rapporte à un conjugué comprenant un antigène choisi connecté à une fraction saccharidique présente sur la surface d'une vésicule de membrane externe native non extraite par un détergent (nOMV). A noter, les nOMV conformément à la présente invention sont recueillies et isolées sensiblement sans l'utilisation de détergents, à la différence, par exemple, des dOMV de l'art antérieur obtenues par l'intermédiaire d'une extraction avec du désoxycholate ou en utilisant des détergents zwitterioniques comme Empigen BB (voir, par exemple, le document US 4 707 543) ou similaires. Au contraire, il faut souligner qu'une étape d'extraction par un détergent peut être non souhaitable dans la présente invention, pour toute une série de raisons, parmi lesquelles le fait qu'un

détergent réduira la quantité de lipopolysaccharide (LPS)/lipooligosaccharide (LOS) présente sur la vésicule, qui peut être vraiment utile pour la conjugaison avec l'antigène choisi tel que décrit ci-dessous.

5 De façon plus détaillée, les nOMV sont des vésicules membranaires existant à l'état naturel qui se forment spontanément durant la croissance bactérienne et qui sont libérées dans le milieu de culture. Elles peuvent être obtenues, par exemple, par culture de bactéries
10 dans un milieu de culture de bouillon, en séparant les cellules entières des nOMV plus petites dans le milieu de culture de bouillon (par exemple, par filtration ou par centrifugation à basse vitesse pour agréger uniquement les cellules et non pas les vésicules plus
15 petites), et ensuite en recueillant les nOMV à partir du milieu appauvri en cellules (par exemple, par filtration, par précipitation différentielle ou agrégation, par centrifugation à haute vitesse pour agréger les vésicules). Les souches pour une utilisation dans la
20 production de nOMV peuvent être généralement choisies sur la base de la quantité de nOMV produite en culture. Les présentes nOMV sont caractérisées par le fait qu'elles sont recueillies et isolées à la suite d'une procédure dépourvue de détergent. De préférence, les
25 présentes nOMV sont libérées dans le bouillon de fermentation et sont purifiées en utilisant une centrifugation et une étape de filtration subséquente (pour une référence générale, voir, par exemple, Clin Vaccine Immunol. Avril 2016; 23(4): 304-314). De façon
30 encore préférée, les présentes nOMV sont libérées dans le bouillon de fermentation et sont purifiées en

utilisant les deux étapes consécutives suivantes de filtration à flux tangentiel (FFT) : (i) une microfiltration dans laquelle le surnageant de la culture contenant les nOMV est séparé des bactéries, et
5 (ii) une ultrafiltration dans laquelle les nOMV sont séparées des protéines solubles (pour une référence générale, voir, par exemple, PLoS One. 2015; 10(8): e0134478). Les nOMV ainsi obtenues peuvent être ensuite utilisées directement au sein de la présente invention
10 sans étape supplémentaire de purification/isolement. Les nOMV présentement considérées présentent une distribution des tailles préférée comprise entre 20 et 250 nm, mesurée par la technique de diffusion dynamique de la lumière DLS.

15 Selon certains modes de réalisation, les nOMV sont préparées à partir de bactéries de type sauvage ou à partir de bactéries qui ont été manipulées génétiquement en général pour augmenter l'immunogénicité (par exemple, pour hyper-exprimer des immunogènes), pour réduire la
20 toxicité, pour inhiber la synthèse des saccharides capsulaires, pour réguler négativement l'expression des antigènes immunodominants, et analogues. Elles peuvent être également préparées à partir de souches hyper-bourgeonnantes. Les nOMV de l'invention peuvent
25 également exprimer des protéines exogènes sur leur surface et elles peuvent être appauvries en endotoxine.

De préférence, les nOMV à utiliser dans la présente invention sont produites à partir de souches bactériennes génétiquement modifiées qui sont mutées
30 pour amplifier la production des vésicules, et éventuellement aussi pour éliminer ou modifier des

antigènes (par exemple, le lipide A) et/ou pour surexprimer des antigènes homologues ou des antigènes provenant d'autres organismes. Lesdites nOMV préférées sont également connues en tant que modules généralisés d'antigènes membranaires (GMMA) comme il est décrit, par exemple, dans PLoS One. 2015; 10(8): e0134478.

La production spontanée amplifiée des vésicules peut être obtenue, par exemple, par une délétion ciblée de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité de la membrane. Il a été observé que la surface externe des nOMV correspond sensiblement à la surface externe de la bactérie à partir de laquelle elles sont dérivées, en préservant les antigènes membranaires (y compris, par exemple, les lipopolysaccharides, les lipooligosaccharides et les lipoprotéines) dans le contexte de la membrane. De façon avantageuse, les nOMV utilisées dans l'invention (à la différence des dOMV extraites par un détergent) conservent ces composants de la membrane externe dans leur conformation native et orientation correcte, préservant mieux l'immunogénicité contre la souche bactérienne à partir de laquelle elles sont dérivées.

Généralement, les nOMV pour une utilisation dans la présente invention peuvent être préparées à partir de toute bactérie appropriée, où les bactéries préférées comprennent, mais n'y sont pas limitées : *Neisseria* (par exemple, en particulier *N. meningitidis* de tout séro groupe y compris A, B, C, X, Y ou W135, ou à partir d'une *Neisseria* non pathogène), *Shigella* (comme *S. sonnei*, *S. flexneri*, *dysenteriae* ou *boydii*), des sérovars de *Salmonella enterica* (tels que *paratyphi* A,

B ou C, *enteritidis*, *typhi* ou *typhimurium*), *Haemophilus influenzae* (par exemple, *H. influenzae* non typable), *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Escherichia coli*,
5 *Bacteroides* (y compris *Porphyromonas*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Brucella melitensis*,
Campylobacter jejuni, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Xenorhabdus nematophilus*,
Moraxella catarrhalis, ou *Borrelia burgdorferi*.

10 Les bactéries particulièrement préférées sont choisies parmi au moins l'une de : *S. sonnei*, *S. flexneri*, la bactérie *Salmonella*, et le méningocoque, particulièrement le méningocoque du séro groupe B.

Les souches virulentes de *Shigella* possèdent un
15 plasmide de 220 kb qui médie les propriétés de virulence. Il a été montré que ce « plasmide de virulence » code pour les gènes pour plusieurs aspects de la virulence de *Shigella*, y compris des adhésines pour les cellules épithéliales cibles, les antigènes des plasmides
20 d'invasion, *virF*, *virG*, et analogues. Une *Shigella* utilisée avec l'invention peut posséder ou pas un plasmide de virulence. L'absence du plasmide peut stabiliser la souche durant la culture industrielle, atténuer la souche par élimination des facteurs de
25 virulence (augmentant de cette façon la sécurité de la fabrication), éviter la présence de l'entérotoxine ShET-2 (codée par le gène *ospD3* ou *sen* sur le plasmide), et éviter la présence de *msbB2* qui est une seconde copie du gène *msbB* responsable de l'acylation du lipide A.
30 L'absence du plasmide de virulence peut également perturber le lipopolysaccharide. Toutefois, les gènes de

biosynthèse pour l'-OAg devront de préférence être conservés, soit par le maintien d'un plasmide de virulence muté, soit par l'inclusion dans un autre plasmide soit par le clonage dans le chromosome bactérien.

5 Tant que la bactérie *Salmonella* est concernée, une souche particulièrement préférée est choisie parmi : *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* et *Salmonella paratyphi* A.

Les nOMV des bactéries *Meningococcus* sont également
10 préférées. De telles vésicules peuvent être préparées à partir de toute souche méningococcique. Les vésicules sont préparées de préférence à partir d'une souche du séro-groupe B, mais il est également préféré de les préparer à partir de sérogroupes autres que B, comme
15 l'un de : A, C, W135 ou Y, selon des procédures connues dans l'art. La souche peut être de tout sérotype (par exemple, 1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 16, etc.), tout séro-sous-type (par exemple, P1.4), et tout immunotype (par exemple, L1 ; L2 ; L3 ; L3,7 ; L3,7,9 ; L10 ; etc.). Les
20 méningocoques peuvent être de toute lignée appropriée, y compris des lignées hyper-invasives et hypervirulentes, de préférence l'une quelconque des sept lignées hypervirulentes suivantes : sous-groupe I ; sous-groupe III ; sous-groupe IV-1 ; complexe ET-5 ; complexe
25 ET-37 ; groupe A4 ; lignée 3. De façon préférée entre toutes, les OMV sont préparées à partir de la souche NZ98/254, ou une autre souche avec le séro-sous-type de PorA P1.4.

Dans un autre mode de réalisation, les bactéries
30 pour la préparation des nOMV utiles pour l'invention peuvent être des souches mutantes qui ont été manipulées,

par exemple, pour amplifier la production des vésicules, pour exprimer un ou plusieurs antigènes souhaités, et/ou pour inactiver ou modifier un gène non souhaité (par exemple, un qui code pour une toxine ou qui code pour
5 une enzyme impliquée dans la production d'un produit toxique, telle qu'une endotoxine).

Dans cette direction, d'autres NOMV pour l'invention sont produites par une bactérie *Salmonella*, particulièrement une *S. typhimurium* (également connue
10 sous le nom de *Salmonella enterica* sérovar *typhimurium*) qui n'exprime pas une protéine TolR fonctionnelle.

Lorsque les vésicules sont préparées à partir d'*E. coli*, de *Shigella* ou de *Salmonella*, la bactérie ne peut pas exprimer plus de 4 des protéines TolA, TolB,
15 TolQ, TolR et Pal. Ainsi, au moins une protéine parmi le système des cinq protéines Tol-Pal naturelles peut être absente, résultant en une bactérie qui, durant la croissance dans le milieu de culture, libère des quantités supérieures de vésicules de membrane externe
20 dans le milieu par rapport à la même bactérie exprimant les 5 protéines Tol-Pal. De préférence TolR n'est pas exprimée, mais les quatre autres protéines peuvent être exprimées (c'est-à-dire, une souche Δ TolR).

Dans des modes de réalisation préférés, au moins
25 l'une des cinq protéines Tol-Pal dans *E. coli*, *Shigella* ou *Salmonella* est éliminée, par exemple, par délétion ou inactivation du gène codant pour la protéine. Ainsi, la bactérie peut exprimer 0, 1, 2, 3 ou 4 des protéines TolA, TolB, TolQ, TolR et Pal. L'élimination de l'une
30 des cinq protéines peut suffire, en quel cas la bactérie exprime seulement 4 de ces protéines. De préférence, la

protéine TolR est éliminée, par exemple, par inactivation du gène *tolR* d'une souche de départ. Ainsi, une bactérie préférée peut être *tolA+* *tolB+* *tolQ+* *TolR-* *Pal+*.

5 Dans certains modes de réalisation, la bactérie exprime les cinq protéines Tol-Pal, mais au moins l'une est mutée pour provoquer un hyper-bourgeoisement. Par exemple, la protéine TolA, TolQ, TolR et/ou Pal peut être mutée de telle façon que la protéine conserve sa
10 localisation membranaire mais ses interactions avec les autres membres du système Tol-Pal sont perturbées. La bactérie conservera ainsi TolA, TolQ et TolR en tant que protéines transmembranaires dans la membrane interne, et la protéine Pal en tant que lipoprotéine faisant face au
15 périplasme dans la membrane externe, mais au moins l'une des protéines TolA, TolQ, TolR et/ou Pal est mutée et pas totalement fonctionnelle.

En outre, d'autres mutations peuvent être également présentes, par exemple, pour donner des souches
20 déficientes en OAg, par exemple dans ces cas où la fonctionnalité -OAg n'est pas prévue pour la réponse immunitaire souhaitée, ou dans ces cas où l'-OAG peut avoir un impact négatif sur l'immunogénicité contre l'antigène hétérologue. Dans cette direction, les
25 mutations possibles peuvent être $\Delta galU$, $\Delta galE$ ou $\Delta wbaP$ dans des souches d'*E. coli*, de *Shigella* ou de *Salmonella*.

Dans un autre mode de réalisation préféré, un méningocoque n'exprime pas une protéine MltA
fonctionnelle. L'inactivation de MltA (la
30 transglycosylase lytique liée à la membrane, également connue sous le nom de GNA33) dans le méningocoque fournit

des bactéries qui libèrent spontanément des grandes quantités de nOMV dans le milieu de culture, à partir duquel elles peuvent être facilement purifiées. Par exemple, les vésicules peuvent être purifiées en
5 utilisant le procédé de filtration par taille en deux étapes, comprenant : (i) une première étape de filtration dans laquelle les vésicules sont séparées des bactéries en se basant sur leurs tailles différentes, avec les vésicules passant dans le filtrat ; et (ii) une
10 seconde étape de filtration dans laquelle les vésicules sont retenues dans le rétentat.

Dans la présente invention, il est préféré que l'-OAg soit présent sur les nOMV parce que nous avons observé (par exemple, des nOMV provenant de *Salmonella*
15 et *Shigella*) que, la présence de l'-OAg sur la surface desdites nOMV est avantageuse dans la fourniture d'un vaccin bivalent, car l'-OAg peut agir en tant qu'antigène protecteur. Certaines souches préférées comportent un LPS penta- ou tétra-acylé moins toxique, qui comprend
20 l'-OAg fixé, après la mutation de *msbB*, *htrB*, *ddg* et/ou *PagP* (voir, par exemple, Rossi O *et al.*, Clin Vaccine Immunol. 4 avril 2016; 23(4): 304-14 et Rossi O *et al.*, J Biol Chem. 5 septembre 2014; 289(36): 24922-35.

Dans *Neisseria*, la souche comporte de préférence un
25 gène *fur* modifié. Selon ce mode de réalisation, les *Neisseria* mutantes sont modifiées pour réduire ou désactiver l'expression d'au moins un gène impliqué pour rendre toxique la partie lipide A du LPS, en particulier du gène *lpx11*. De cette façon, les nOMV résultantes
30 présentent une toxicité réduite par rapport à la souche

de type sauvage, depuis la conversion du lipide A acylé en une forme moins acylée.

De façon similaire, les *Neisseria* mutantes préférées pour l'invention sont modifiées pour réduire ou désactiver l'expression d'au moins un gène impliqué dans la synthèse ou l'export des saccharides capsulaires, en particulier des gènes synX et/ou ctrA. De cette façon, les nOMV résultantes peuvent présenter une protection croisée contre divers sérotypes, ce qui est particulièrement apprécié de l'homme du métier.

Dans des modes de réalisation préférés, une souche peut comprendre une ou plusieurs des mutations d'inactivation et/ou d'hyper-expression divulguées, par exemple, dans Fukusawa *et al.* (1999), Vaccine 17: 2951-2958. Par exemple, en suivant les conseils et la nomenclature qui y sont indiqués, les gènes utiles pour la régulation négative et/ou l'inactivation comprennent :

(a) Cps, CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GaleE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, et/ou TbpB ; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GaleE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PhoP, PilC, PmrE, PmrF, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, et/ou TbpB ; (c) ExbB, ExbD, rmpM, CtrA, CtrB, CtrD, GaleE, LbpA, LpbB, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, et/ou TbpB ; ou (d) CtrA, CtrB, CtrD, FrpB, OpA, OpC, PilC, PorB, SiaD, SynA, SynB, SynX et/ou SynC.

Tel que susmentionné, les présents conjugués sont obtenus en connectant au moins une fraction saccharidique de surface de nOMV (comprise de préférence dans l'-OAg apparenté) à un ou plusieurs antigènes

étrangers choisis, c'est-à-dire qui ne font pas partie de la vésicule.

Tant que la fraction saccharidique de nOMV est concernée, il faut noter qu'elle peut faire partie de la fonctionnalité -OAg présente sur la surface de la nOMV (par exemple, dans le LPS ou le LOS), ou elle peut être présente au sein d'une partie différente de la surface de la nOMV, par exemple un PSC, comme il est décrit ci-dessous en détail. De façon avantageuse, tout antigène correct peut être conjugué à la nOMV pour obtenir les conjugués nOMV-antigène de l'invention, de préférence sous la forme d'un (poly)saccharide ou d'un polypeptide. Dans tous les cas, la connexion d'un ou de plusieurs antigènes choisis produit un conjugué immunogène qui peut produire une réponse immunitaire qui reconnaît ledit antigène, et qui reconnaît également un ou plusieurs composants dans la nOMV, ainsi de façon pratique et utile pour la préparation d'un vaccin multivalent. Les antigènes seront inclus dans les présents conjugués à une concentration qui est suffisamment élevée pour déclencher, lorsqu'ils sont administrés à un hôte, une réponse immunitaire qui reconnaît cet antigène. En outre, la réponse immunitaire est de préférence protectrice contre le pathogène à partir duquel l'antigène a été dérivé, de façon même davantage préférée contre l'un des pathogènes énumérés ci-dessous.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la nOMV est conjuguée à au moins un antigène homologue, c'est-à-dire dérivé du même organisme à partir duquel les nOMV sont dérivées. Dans un mode de réalisation encore préféré,

l'antigène choisi est un antigène hétérologue, c'est-à-dire dérivé d'un organisme différent de l'organisme à partir duquel les nOMV sont dérivées.

Dans tous les cas, les antigènes sont choisis généralement parmi des polypeptides immunogènes quelconques, c'est-à-dire des polypeptides capables de déclencher une réponse immunitaire lorsqu'ils sont administrés à un sujet. Les polypeptides utilisés avec l'invention comprendront un acide aminé ayant un résidu, ou une chaîne latérale, avec un groupe fonctionnel approprié pour la conjugaison, de préférence un groupe amino ou thiol, de façon même davantage préférée de formule générale : $-NH_2$ ou $-SH$. Ces résidus peuvent être naturellement présents dans un antigène, ou ils peuvent être introduits artificiellement pour les objectifs de la conjugaison. Les résidus d'acides aminés préférés comprennent, mais n'y sont pas limités : l'arginine, la lysine, l'asparagine, la glutamine, la cystéine et l'histidine. Le résidu d'acide aminé préféré entre tous pour la conjugaison est la lysine. En fait, sa chaîne latérale $-NH_2$ peut réagir avec un groupe $-OH$ oxydé activé à partir d'une fraction saccharidique de nOMV et peut réagir avec le groupe aldéhyde ainsi obtenu par amination réductrice, selon le procédé divulgué ici en détail.

Les antigènes polypeptidiques sont préparés de préférence sous une forme sensiblement pure ou sensiblement isolée (c'est-à-dire, sensiblement dépourvue d'autres polypeptides). Ils peuvent être préparés par divers moyens, par exemple, par synthèse chimique (au moins en partie), par digestion de polypeptides plus longs en utilisant des protéases, par

traduction à partir d'ARN, par purification à partir d'une culture cellulaire (par exemple, à partir d'une expression recombinante ou à partir de la culture native), et analogues. L'expression recombinante dans un hôte d'*E. coli* est une voie d'expression utile. Les antigènes polypeptidiques peuvent prendre diverses formes (par exemple, native, fusions, glycosylée, non glycosylée, lipidée, ponts disulfure et analogues).

Les antigènes polypeptidiques utilisés avec l'invention ont une masse moléculaire moyenne en poids préférée d'au moins 1 kDa, de façon davantage préférée d'au moins 3,5 kDa, de façon même davantage préférée de 10 à 80 kDa. De façon encore davantage préférée, la masse moléculaire moyenne en poids est comprise de 15 à 75 kDa.

D'autres antigènes polypeptidiques préférés pour la conjugaison aux nOMV selon la présente invention comprennent un épitope provenant d'un polypeptide fongique, bactérien, de protozoaire ou viral. Les polypeptides de protozoaires préférés proviennent d'un *Plasmodium* (tel que *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*). Les polypeptides bactériens particulièrement préférés sont choisis parmi : *E. coli*, *N. meningitidis*, et les streptocoques (tels que *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*).

Les antigènes polypeptidiques d'*E. coli* préférés comprennent CTF1232, 405 et 3526. En tant qu'exemples préférés non limitatifs, les nOMV provenant de *Shigella* ou *Salmonella* peuvent être conjuguées à CTF1232, selon la présente invention, pour produire un vaccin bivalent couvrant à la fois *E. coli* entérotoxigène (ETEC) et *Shigella/Salmonella*.

Dans un mode de réalisation, les polypeptides de *N. meningitidis* considérés sont capables, lorsqu'ils sont administrés à un mammifère, de déclencher une réponse en anticorps qui est bactéricide contre le méningocoque. Les polypeptides de *N. meningitidis* préférés pour une utilisation avec l'invention sont choisis parmi au moins l'un de : NHBA, NadA, NsPA, NhhA, App et fHbp, comme il est détaillé ci-dessous.

Antigène NHBA

10 L'antigène NHBA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de séro groupe B MC58 en tant que gène NMB2132 (numéro d'accèsion GenBank GI:7227388 ; SEQ ID NO : 2 ici). Les séquences de l'antigène NHBA de nombreuses souches ont été publiées depuis lors. Divers fragments immunogènes de l'antigène NHBA ont été également rapportés. Les antigènes NHBA préférés pour une utilisation avec l'invention comprennent une séquence d'acides aminés :

15 (a) présentant 50 % ou plus d'identité (par exemple, 20 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 2 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins « n » acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 2, dans lequel « n » vaut 7 ou plus (par

25 exemple, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope issu de SEQ ID NO : 2. Les antigènes NHBA les plus utiles de l'invention peuvent déclencher des anticorps qui, après

30 administration à un sujet, peuvent se lier à un polypeptide méningococcique constitué de la séquence

d'acides aminés SEQ ID NO : 2. Les antigènes NHBA avantageux pour une utilisation avec l'invention peuvent déclencher des anticorps antiméningococciques bactéricides après administration à un sujet.

5 Antigène NadA

L'antigène NadA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de séro groupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin et al. (2000) Science 287: 1809-1815) en tant que gène NMB1994
10 (numéro d'accèsion GenBank GI:7227256 ; SEQ ID NO : 3 ici). Les séquences du gène NadA de nombreuses souches ont été publiées depuis lors, et l'activité de la protéine en tant qu'adhésine neissérienne a été bien documentée. Divers fragments immunogènes de NadA ont été
15 également rapportés. Les antigènes NadA préférés pour une utilisation avec l'invention comprennent une séquence d'acides aminés : (a) présentant 50 % ou plus d'identité (par exemple, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 20 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 3 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins « n » acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 3, dans lequel « n » vaut 7 ou plus (par exemple, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250
25 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope issu de SEQ ID NO : 3. Les antigènes NadA préférés entre tous de l'invention peuvent déclencher des anticorps qui, après administration à un sujet, peuvent se lier à un polypeptide méningococcique
30 constitué de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 3. Les antigènes NadA avantageux pour une utilisation avec

l'invention peuvent déclencher des anticorps antiméningococciques bactéricides après administration à un sujet. SEQ ID NO : 7 est un tel fragment.

Antigène NspA

5 L'antigène NspA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de séro groupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287: 1809-1815) en tant que gène NMB0663 (numéro d'accèsion GenBank GI:7225888 ; SEQ ID NO : 4
10 ici). Les séquences de l'antigène NspA de nombreuses souches ont été publiées depuis lors. Divers fragments immunogènes de NspA ont été également rapportés. Les antigènes NspA préférés pour une utilisation avec l'invention comprennent une séquence d'acides aminés :
15 (a) présentant 50 % ou plus d'identité (par exemple, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 4 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins « n » acides aminés consécutifs de
20 SEQ ID NO : 4, dans lequel « n » vaut 7 ou plus (par exemple, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope issu de SEQ ID NO : 4. Les antigènes NspA préférés entre tous de
25 l'invention peuvent déclencher des anticorps qui, après administration à un sujet, peuvent se lier à un polypeptide méningococcique constitué de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 4. Les antigènes NspA avantageux pour une utilisation avec l'invention peuvent
30 déclencher des anticorps antiméningococciques bactéricides après administration à un sujet.

Antigène NhhA

L'antigène NhhA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de séro groupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin et al. (2000) Science 287: 1809-1815) en tant qu'antigène NMB0992 (numéro d'accèsion GenBank GI:7226232 ; SEQ ID NO : 5 ici). Les séquences de l'antigène NhhA de nombreuses souches ont été publiées depuis lors, par exemple, WO 00/66741 et WO 01/55182, et divers fragments immunogènes de NhhA ont été rapportés. Il est également connu en tant que Hsf. Les antigènes NhhA préférés pour une utilisation avec l'invention comprennent une séquence d'acides aminés : (a) présentant 50 % ou plus d'identité (par exemple, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 5 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins « n » acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 5, dans lequel « n » vaut 7 ou plus (par exemple, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les fragments préférés de (b) comprennent un épitope issu de SEQ ID NO : 5. Les antigènes NhhA préférés entre tous de l'invention peuvent déclencher des anticorps qui, après administration à un sujet, peuvent se lier à un polypeptide méningococcique constitué de la séquence d'acides aminés SEQ ID NO : 5. Les antigènes NhhA avantageux pour une utilisation avec l'invention peuvent déclencher des anticorps anti méningococciques bactéricides après administration à un sujet.

Antigène App

L'antigène App a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de séro-groupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin et al. (2000) Science 287: 1809-1815) en tant qu'antigène NMB1985 (numéro d'accèsion GenBank GI:7227246 ; SEQ ID NO : 6 ici). Les séquences de l'antigène App de nombreuses souches ont été publiées depuis lors. Divers fragments immunogènes de App ont été également rapportés.

10 Les antigènes App préférés pour une utilisation avec l'invention comprennent une séquence d'acides aminés : (a) présentant 50 % ou plus d'identité (par exemple, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus) avec SEQ ID NO : 6 ; et/ou (b) comprenant un fragment

15 d'au moins « n » acides aminés consécutifs de SEQ ID NO : 6, dans lequel « n » vaut 7 ou plus (par exemple, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 ou plus). Les

20 fragments préférés de (b) comprennent un épitope issu de SEQ ID NO : 6. Les antigènes NhhA préférés entre tous de l'invention peuvent déclencher des anticorps qui, après administration à un sujet, peuvent se lier à un polypeptide méningococcique constitué de la séquence

25 d'acides aminés SEQ ID NO : 6. Les antigènes App avantageux pour une utilisation avec l'invention peuvent déclencher des anticorps antiméningococciques bactéricides après administration à un sujet.

Antigène fHbp

30 La protéine de liaison du facteur H existe sous la forme de trois variants (v1, v2 et v3), et l'invention

peut utiliser l'un quelconque de ceux-ci en tant que mode de réalisation préféré.

Un v1 de fHbp comprend de préférence (a) une séquence d'acides aminés qui présente au moins k' % d'identité avec SEQ ID NO : 8, et/ou (b) un fragment de SEQ ID NO : 8. k' se rapporte à un pourcentage d'identité et pourra être défini comme tout nombre de 1 à 100. En référence aux séquences d'acides aminés ou d'acide nucléique, généralement l'identité utilisée dans la demande démarre aussi bas que 40 % avec des références spécifiques à des pourcentages supérieurs, c'est-à-dire, 70 %, 75 %, 80 %, etc.

Le fragment comprendra de préférence au moins un épitope issu de SEQ ID NO : 8. De préférence, le v1 de fHbp peut déclencher des anticorps qui sont bactéricides contre les souches v1, par exemple contre la souche MC58 (disponible auprès de l'ATCC en tant que « BAA-335 »).

Un v2 de fHbp comprend de préférence (a) une séquence d'acides aminés qui présente au moins k' % d'identité avec SEQ ID NO : 1, et/ou (b) un fragment de SEQ ID NO : 1. Des informations concernant k' et les fragments sont données ci-dessus. Le fragment comprendra de préférence au moins un épitope issu de SEQ ID NO : 1. De préférence, le v2 de fHbp peut déclencher des anticorps qui sont bactéricides contre des souches v2, par exemple, contre la souche M2091 (ATCC 13091).

Un v3 de fHbp comprend de préférence (a) une séquence d'acides aminés qui présente au moins k' % d'identité avec SEQ ID NO : 9, et/ou (b) un fragment de SEQ ID NO : 9. Des informations concernant k' et les fragments sont données ci-dessus. Le fragment comprendra

de préférence au moins un épitope issu de SEQ ID NO : 9. De préférence, le v3 de fHbp peut déclencher des anticorps qui sont bactéricides contre des souches v3, par exemple, contre la souche M01-240355.

5 Les antigènes de *Streptococcus* du groupe A (GAS), de *Streptococcus* du groupe B (GBS) et de *Pneumococcus* sont aussi préférés de façon égale. En tant qu'exemples non limitatifs, les antigènes GAS25 (Slo), GAS40 (SpyAD) et GAS57 (SpyCEP) peuvent être incorporés dans des
10 conjugués conformément à certains modes de réalisation de l'invention.

Les antigènes de *Plasmodium* sont en outre préférés. Ceux-ci peuvent provenir de toute espèce appropriée, où les espèces préférées sont choisies parmi :
15 *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*.

Encore un autre antigène préféré est Pfs25 (SEQ ID NO : 10), qui est un antigène du stade sexuel de *P. falciparum* exprimé sur la surface des formes zygotes et ookinètes du parasite. Un autre antigène préféré est
20 Pfs48/45, qui est un vaccin candidat bloquant la transmission. Récemment, le fragment C-terminal de 10 cystéines (10C) de Pfs48/45, contenant trois épitopes connus pour les anticorps bloquant la transmission, a été produit sous la forme d'une chimère avec la partie
25 N-terminale de GLURP (RO), la protéine riche en glutamate antigène du stade sanguin asexué. La protéine de fusion résultante (RO10C) a déclenché des taux élevés d'anticorps bloquant la transmission chez des rongeurs (voir, Theisen et al. (2014) Vaccine 32: 2623-2630).
30 Shing et al. (2015) Vaccine 33: 1981-1986 décrivent une chimère contenant des fragments tronqués de 6C, qui

augmente le rendement du conformère correctement replié. La construction R06C a été capable de déclencher un titre élevé d'anticorps bloquant la transmission chez des rats. R06C (SEQ ID NO : 11) est un antigène préféré qui peut
5 être conjugué selon la présente invention.

Un autre antigène préféré est la protéine circumsporozoïte (CSP ; SEQ ID NO : 12).

Des peptides plus courts issus de la CSP peuvent être également conjugués selon la présente invention.
10 Par exemple, le peptide de 12 acides aminés (NANP)₃ (SEQ ID NO : 13) dérivé de la CSP peut être utilisé selon des modes de réalisation préférés.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré, les antigènes sont une espèce de saccharide. L'invention
15 est en fait également appropriée pour conjuguer un ou plusieurs antigènes saccharidiques aux nOMV, grâce à quoi les saccharides peuvent être utilisés sous leur forme naturelle pleine longueur. Comme variante, une fraction d'une taille particulière peut être également
20 choisie de façon avantageuse. Ainsi, les saccharides peuvent être fragmentés à partir de leur longueur naturelle, et éventuellement une fraction de taille de ces fragments peut être utilisée. Même en outre, les saccharides ne sont pas limités à des saccharides
25 purifiés à partir de sources naturelles et des saccharides synthétiques ou semi-synthétiques peuvent être utilisés à la place.

Les antigènes saccharidiques préférés sont des saccharides capsulaires (PSC) bactériens. Ceux-ci
30 comprennent, mais n'y sont pas limités, les saccharides capsulaires choisis parmi au moins l'un de : *Haemophilus*

influenzae de type B ; *Neisseria meningitidis* des sérogroupes A, C, W135, X et Y ; *Streptococcus pneumoniae* des sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, et 33F ; *Salmonella* y compris *Salmonella enterica* sérovar *typhi* Vi, soit pleine longueur soit fragmenté (indiqué par fVi) ; *Streptococcus agalactiae* des sérotypes Ia, Ib, et III ; *Streptococcus pyogenes*, *Shigella sp.*, *Streptococcus* du groupe A et B (GAS et GBS respectivement). Les antigènes saccharidiques davantage préférés proviennent de *Neisseria meningitidis* des sérogroupes A et C. Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, la nOMV est un GMMA dérivé de MenB, et l'antigène choisi est un saccharide capsulaire provenant de MenA ou MenC. Dans un mode de réalisation encore supplémentaire, l'invention se rapporte à un GMMA issu de MenB conjugué à un saccharide capsulaire provenant de l'antigène de MenA par l'intermédiaire d'un résidu polysaccharidique, dans lequel ledit GMMA est également conjugué à un antigène de MenC par l'intermédiaire d'un résidu polysaccharidique différent, obtenant ainsi une vésicule GMMA fonctionnalisée double, comme il est décrit ci-dessous plus en détail.

Dans tous les cas, et comme il a été susmentionné, les antigènes choisis pourront être conjugués à des nOMV dérivées de la même souche bactérienne et même d'une souche bactérienne différente, fournissant ainsi un conjugué multivalent. A cet égard, dans un mode de réalisation davantage préféré de l'invention, la nOMV et l'antigène saccharidique sont dérivés de souches bactériennes différentes.

D'autres antigènes saccharidiques préférés sont des β -glucanes, particulièrement utiles pour la protection contre *C. albicans* (pour une référence générale, voir Sandlin *et al.* (1995) *Infect. Immun.*, 63: 229-37).

5 D'autres antigènes saccharidiques préférés sont des oligosaccharides de poly-rhamnose pour la protection contre *Streptococcus* du groupe A (GAS). Le saccharide de GAS natif a un squelette de poly-rhamnose substitué par NAcGlcN. Des oligosaccharides synthétiques de poly-
10 rhamnose, ou des oligomères avec la structure du saccharide de GAS natif, peuvent être conjugués à des nOMV selon l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré, les conjugués de nOMV de l'invention comprennent une fraction
15 saccharidique de surface de nOMV connectée directement à un antigène choisi, où la connexion directe peut être obtenue par activation de la fraction saccharidique suivie d'une réaction directe (par exemple, par l'intermédiaire d'une amination réductrice) avec
20 l'antigène choisi, comme il est illustré dans le présent exemple 4. Dans un mode de réalisation préféré de façon égale, la nOMV est connectée à l'antigène choisi indirectement, c'est-à-dire, par l'intermédiaire d'une fraction de lieur, comme il est décrit ici plus en détail
25 et tel qu'illustré dans l'exemple 3.

Les conjugués de l'invention sont immunogènes, comme il est démontré par les études chez des souris et supporté par la partie expérimentale incluse ici. De façon avantageuse, en dehors d'être capables d'induire
30 une réponse immunitaire contre l'antigène conjugué, les conjugués de l'invention sont également capables

d'induire une réponse immunitaire contre le composant nOMV, étant ainsi des bons candidats pour la préparation d'une composition immunogène multivalente de ceux-ci. En fait, il a été observé de façon surprenante que la conjugaison des antigènes choisis par l'intermédiaire de la fraction saccharidique présente sur la surface des nOMV n'a pas d'impact négatif sur la capacité des nOMV à induire leur propre réponse immunitaire, à la différence des dOMV. Par conséquent, les conjugués de l'invention peuvent être utiles, par exemple, en tant qu'agent immunogène bivalent, appropriés pour la préparation de vaccins, avec la nOMV et l'antigène hétérologue conjugué présentant tous les deux une bonne immunogénicité. En outre, il a été découvert de façon avantageuse que les conjugués de l'invention induisent une réponse élevée en IgG spécifiques anti-antigène chez les souris, sans aucun impact sur la réponse des IgG anti-OAg, comme il est supporté par exemple dans les présents exemples 5 et 6. Les conjugués de l'invention offrent plusieurs autres avantages comparativement aux antigènes non conjugués, comme il est présenté par exemple dans les exemples 3 à 6.

Comme il a été présenté auparavant, dans un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé de préparation des conjugués décrits ci-dessus, comprenant une première étape d'activation d'une fraction saccharidique de surface des nOMV, et une seconde étape de connexion de la vésicule activée ainsi obtenue à au moins un antigène choisi, éventuellement par l'intermédiaire d'un lieu bivalent.

Selon le présent procédé, au moins une fraction saccharidique sur une nOMV est conjuguée à un antigène choisi (comme il a été décrit ci-dessus) pour former un conjugué de l'invention. Selon un mode de réalisation différent, deux fractions saccharidiques ou plus sont conjuguées à deux antigènes choisis différents ou plus, fournissant ainsi un dérivé de nOMV conjugué avec deux antigènes différents ou plus, ce qui est particulièrement approprié pour la préparation de compositions immunogènes polyvalentes. Comme il a été indiqué ci-dessus, l'étape de connexion implique généralement l'activation de la fraction saccharidique de surface des nOMV et/ou de l'antigène choisi. De façon similaire, l'étape de connexion peut impliquer l'introduction d'un lieur entre la fraction saccharidique des nOMV et l'antigène choisi, comme il est détaillé ci-dessous. Ainsi, dans un mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes : (i) l'activation d'une fraction saccharidique sur la surface des nOMV ; et (ii) la connexion directe de la fraction activée avec un antigène choisi, pour obtenir les conjugués de nOMV de l'invention.

Comme variante de mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes : (i) l'activation d'une fraction saccharidique sur la surface des nOMV ; (ii) la connexion de la fraction activée à un groupe lieur bivalent pour former un conjugué vésicule-lieur ; et (iii) la connexion d'un antigène choisi au conjugué vésicule-lieur pour former les conjugués de nOMV de l'invention.

Comme autre variante de mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes : (i) l'activation d'une fraction saccharidique sur la surface des nOMV ; (ii) la connexion d'un antigène
5 choisi à un groupe lieur bivalent pour former un conjugué antigène-lieur ; et (iii) la connexion de la fraction activée de l'étape (i) au conjugué antigène-lieur pour former les conjugués de nOMV de l'invention.

Comme autre variante de mode de réalisation, le
10 procédé de l'invention comprend les étapes suivantes : (i) l'activation d'une fraction saccharidique sur la surface de la nOMV ; (ii) la connexion de la fraction activée à un groupe lieur bivalent pour former un conjugué vésicule-lieur ; (iii) la connexion d'un
15 antigène choisi à un groupe lieur bivalent pour former un conjugué antigène-lieur ; et (iv) la connexion de la fraction du lieur de l'étape (ii) au conjugué antigène-lieur de l'étape (iii) pour former les conjugués de nOMV de l'invention.

20 Tant que la fraction saccharidique de nOMV est considérée, il faut noter qu'elle peut faire partie de la fonctionnalité -OAg, ou de la région du noyau naturellement présente sur la surface de la nOMV (par exemple, dans le LPS ou le LOS), ou elle peut être
25 présente au sein d'une partie différente de la surface de la nOMV, par exemple, un PSC. Dans tous ces cas préférés, le procédé de l'invention permet la connexion de ladite fraction saccharidique avec un antigène choisi d'une façon simple et efficace, menant ainsi aux
30 conjugués de nOMV finals de l'invention, dotés d'une activité immunogène remarquable. De façon avantageuse,

la présence de l'-OAg n'interfère sensiblement pas avec la réponse contre l'antigène choisi. Les exemples comparatifs 9a à c montrent que lorsque le présent procédé est appliqué à des dOMV, il ne se produit aucune
5 conjugaison avec l'antigène, prévenant ainsi la formation du conjugué vésicule-antigène souhaité.

Selon l'espèce à partir de laquelle les nOMV sont préparées, diverses fractions saccharidiques (y compris des sucres tétraoses, pentoses et hexoses) peuvent être
10 utilisées pour l'activation et la conjugaison subséquente. De préférence, des lipopolysaccharides, par l'intermédiaire de la partie -OAg ou de la région du noyau, ou des saccharides capsulaires peuvent être utilisés pour l'activation et la conjugaison subséquente.

15 Les fractions saccharidiques préférées sont choisies parmi au moins l'un des : glucose, galactose, fructose, mannose, ribose, abéquose, galactosamine, glucosamine, mannosamine, acide sialique, sulfoquinovose, érythrose, thréose, arabinose, rhamnose, sorbose, ribulose, xylose,
20 xylulose, lyxose, tagatose ou céto-désoxy-octulosonate. Une fraction saccharidique sur la nOMV est activée de préférence par oxydation d'un groupe hydroxyle du saccharide pour former une fonctionnalité aldéhyde carbonylé, en présence d'un agent oxydant approprié, tel
25 que le TEMPO ou un sel periodé. Ce dernier est choisi de préférence parmi un periodate ou un métaperiodate d'alcali, de façon davantage préférée le NaIO_4 . L'agent oxydant est utilisé de préférence sous la forme d'une solution aqueuse dans une concentration située dans la
30 plage de 0,5 mM à 20 mM, de préférence de 3 mM à 20 mM, où les concentrations de 10 à 20 mM et de 0,5 à 5 mM ou

de 3 à 5 mM sont encore davantage préférées. D'autres réactions d'activation selon certains modes de réalisation surviennent en présence de : réactifs de cyanylation tels que le CDAP (par exemple, le
5 tétrafluoroborate de 1-cyano-4-diméthylamino-pyridinium), des carbodiimides, des hydrazides, des esters actifs, le norborane, l'acide p-nitrobenzoïque, le N-hydroxysuccinimide, le S-NHS, l'EDC et le TSTU.

En général, lorsque les polysaccharides sont oxydés,
10 il n'est pas nécessaire d'oxyder tous les sucres disponibles. En effet, il peut être souhaitable de conserver au moins une partie des structures de sucres naturels, particulièrement lorsque ceux-ci constituent un antigène utile. Il faut également noter le fait que,
15 à cause de la composition et de la conformation particulières des nOMV telles que détaillées ci-dessus, la fraction polysaccharidique peut être activée de façon pratique par le présent procédé menant à la formation d'une espèce intermédiaire de nOMV oxydée hautement
20 réactive. Dans un mode de réalisation préféré, pour une fraction saccharidique donnée d'intérêt, la proportion des résidus oxydés peut se situer dans la plage de 1 % à 100 %, de préférence de 10 à 50 %, ou de 20 à 40 %, ou de 20 à 35 %, tandis que l'oxydation de 20 à 35 % au
25 sein d'une structure d'-OAg est particulièrement préférée. Dans cette direction, il a été découvert que lesdites plages permettent une conjugaison efficace avec un impact mineur ou sensiblement absent sur l'intégrité structurale de l'-OAg. En outre, il a été noté qu'un
30 degré d'oxydation supérieur de la nOMV correspond à une taille inférieure de l'-OAg, ce qui signifie qu'il y a

un impact majeur sur la structure native de l'-OAg et sa capacité à induire une réponse immunitaire spécifique. La proportion des résidus oxydés peut être déterminée par une chromatographie avec échange d'anions haute performance avec une détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD), en comparant les résidus de sucre intacts de la nOMV, de même que le pH peut influencer la conduite globale de l'étape d'oxydation, comme par exemple il est indiqué dans le présent exemple 2, tableau 2c. Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, l'agent oxydant est utilisé en excès par rapport à la nOMV de départ, où un excès molaire de 3/1 ou de 2/1 par rapport au nombre de monosaccharides qui peuvent être soumis à l'oxydation est particulièrement préféré. L'agent oxydant est utilisé de préférence sous la forme d'une solution aqueuse dans une concentration située dans la plage de 0,5 mM à 20 mM, de préférence de 3 mM à 20 mM, où des concentrations de 10 à 20 mM et de 0,5 à 5 ou de 3 à 5 mM sont encore davantage préférées.

La concentration des nOMV est comprise de préférence entre 0,2 et 5 mg/ml.

De préférence, le pH est compris entre 4 et 8, tandis que des valeurs de 5 et 7 sont particulièrement préférées. De cette façon, le pH peut être ajusté en utilisant un agent tampon, tel que l'acétate/phosphate et analogues.

Lesdits paramètres peuvent être fixés de façon pratique afin d'obtenir un degré d'oxydation préféré compris entre 20 % et 35 % sur la fraction saccharidique soumise. Ceci permet une autre conjugaison efficace avec

l'antigène choisi, sans impact sensible sur la structure de la fraction saccharidique.

Par exemple, les résidus Rha dans une fonctionnalité -OAg peuvent être oxydés, par exemple, comme il est indiqué sur le schéma 2 ci-dessous en utilisant du NaIO_4 .

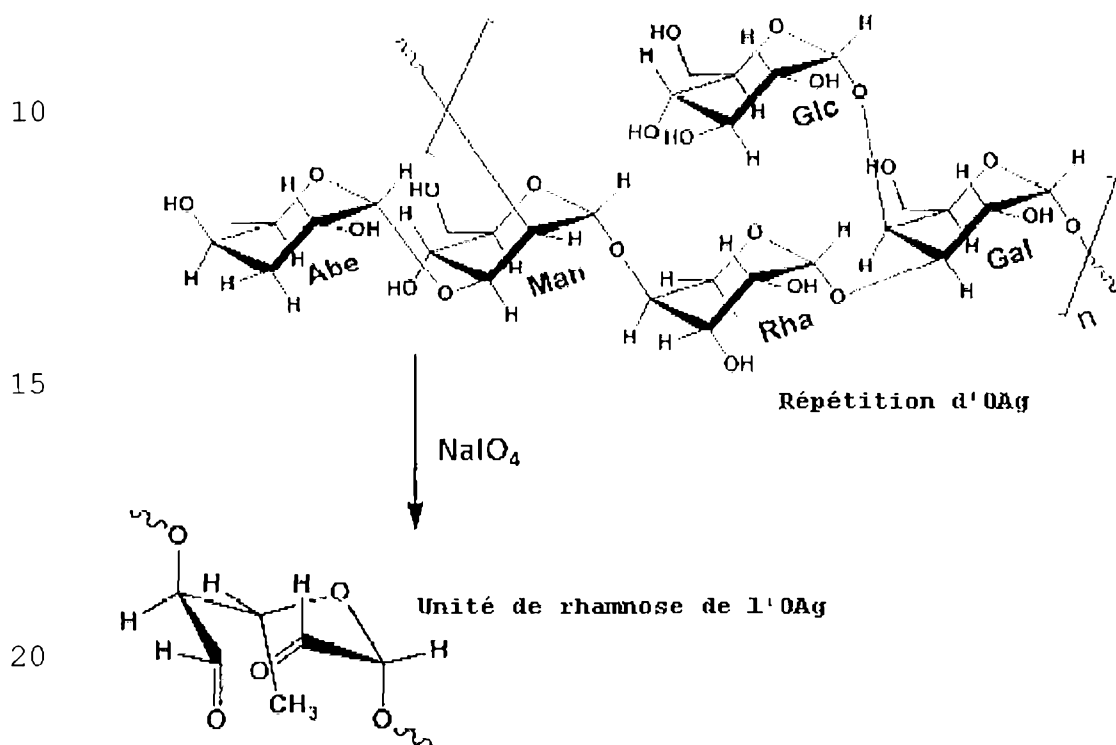


Schéma 2

25 L'étape d'oxydation est généralement effectuée à température ambiante (par exemple, d'environ 15 °C à environ 40 °C), pendant un temps approprié, par exemple compris entre 30 min et 3 h, selon, par exemple, la quantité et le type des nOMV considérées. Dans tous les cas, il a été découvert qu'il ne se produisait aucune

30 réticulation et/ou agrégation sensible des nOMV. Ceci est de la plus haute importance également pour

l'efficacité de l'étape de conjugaison subséquente avec l'antigène choisi tel que décrit ici en détail.

Après l'oxydation, les nOMV peuvent être éventuellement soumises à une étape de réduction, par exemple, avec du NaBH_4 , pour stabiliser les nOMV oxydées par élimination des groupes CHO formés. Les nOMV oxydées stabilisées peuvent être ensuite stockées et/ou en outre caractérisées.

Généralement, après l'étape d'activation du présent procédé, les nOMV oxydées obtenues sont isolées et purifiées, par exemple, par ultracentrifugation à 4°C à 110 000 tr/min pendant 30 min, et ensuite mises à réagir avec l'antigène choisi.

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré, le procédé comprend les étapes suivantes :

(i) l'activation de la fraction saccharidique sur la surface des nOMV, de préférence par oxydation ;

(i-bis) l'isolement des nOMV oxydées ainsi obtenues ; et

(ii) la connexion des nOMV oxydées de l'étape (i-bis) avec au moins un antigène choisi, éventuellement par l'intermédiaire d'un lieur bivalent.

Dans un mode de réalisation encore préféré, le procédé est effectué en présence d'un sulfite alcalin, de préférence le Na_2SO_3 . Ceci est particulièrement avantageux parce qu'en neutralisant la réaction d'oxydation avec du Na_2SO_3 , il est possible d'effectuer le procédé en une étape, c'est-à-dire d'éviter l'isolement des nOMV oxydées intermédiaires (étape (i-bis) ci-dessus), comme il est illustré dans l'exemple 5. Ceci permet de gagner du temps, en obtenant

ainsi le conjugué final d'une façon simple et efficace. En pratique, et selon le mode de réalisation illustré, après l'étape d'activation (i) la réaction est neutralisée avec une quantité correcte du sulfite alcalin, et laissée réagir pendant une durée correcte (généralement comprise entre 5 et 20 minutes) afin de de neutraliser l'excès de l'agent oxydant. Après cela, l'antigène choisi est ajouté directement au mélange (c'est-à-dire, sans isolement des nOMV oxydées), selon l'étape (ii), obtenant ainsi les conjugués de nOMV de l'invention.

Comme variante, le groupe aldéhyde carbonyle de la fraction saccharidique obtenu par l'étape d'oxydation peut être en outre modifié pour former une fonctionnalité correcte qui peut ensuite être mise à réagir avec l'antigène choisi ou avec un lieur comme cela peut être le cas (dans ce cas pour donner un conjugué vésicule-lieur qui peut être ensuite couplé à l'antigène choisi).

L'antigène choisi est généralement ajouté dans un rapport de 1/1 p/p par rapport aux nOMV utilisées, à température ambiante, pendant une durée correcte, par exemple, comprise entre 2 heures et 24 heures. Lorsque l'antigène est dérivatisé avec un lieur, la réaction est réalisée de façon pratique en utilisant un excès de l'antigène par rapport aux nOMV, de préférence dans un rapport de 2/1 ou de façon davantage préférée de 3/1 p/p, comme il est indiqué par exemple dans le présent exemple 3.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes : (i) l'oxydation d'une fraction

saccharidique ; et (ii) la réaction de la fraction oxydée avec un groupe amino sur un résidu de l'antigène choisi. De façon même davantage préférée, ledit résidu de l'antigène choisi est un groupe amino -NH₂ sur un résidu de lysine au sein d'un antigène polypeptidique

5 résidu de lysine au sein d'un antigène polypeptidique choisi.

De préférence, le couplage de la fraction saccharidique oxydée de la nOMV avec le groupe amino, de préférence un groupe -NH₂ libre, de l'antigène est obtenu

10 par amination réductrice, de façon davantage préférée en utilisant du NaBH₃CN, par exemple, selon une procédure connue dans l'art. Le NaBH₃CN est utilisé dans des quantités en poids (p/p) comprises entre 3 et 1/3, de préférence de 1 sur 1, par rapport aux nOMV oxydées. De

15 façon pratique, le NaBH₃CN peut être ajouté conjointement avec l'antigène choisi, directement au produit intermédiaire des nOMV oxydées, comme il est illustré de façon générale sur les schémas 3 et 4 ci-dessous, en utilisant, à titre d'exemple, une nOMV qui est conjuguée

20 par l'intermédiaire d'une unité de rhamnose oxydée aux protéines membranaires paludéennes Pfs25 ou R06C, respectivement.

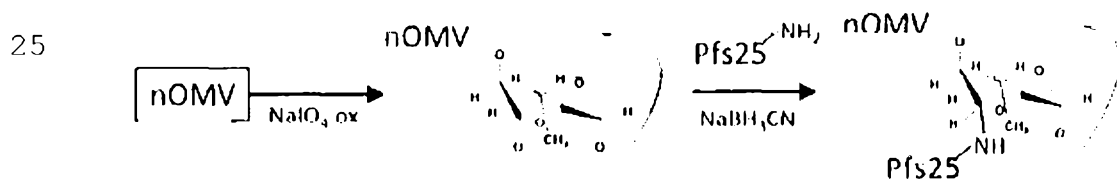
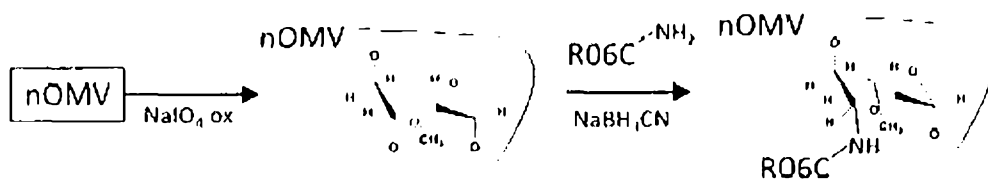


Schéma 3

30



5

Schéma 4

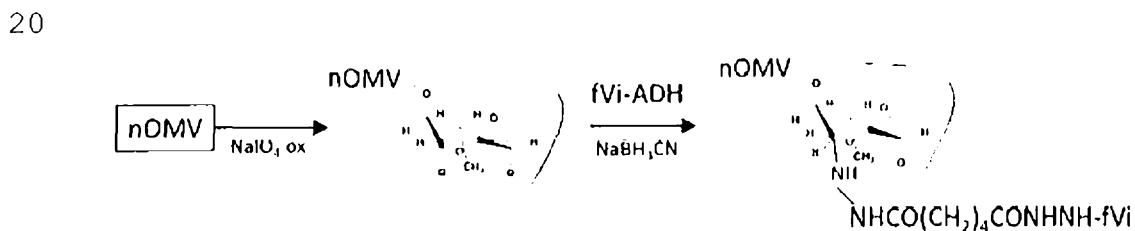
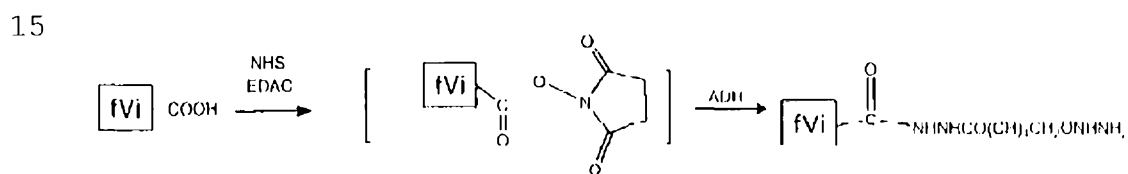
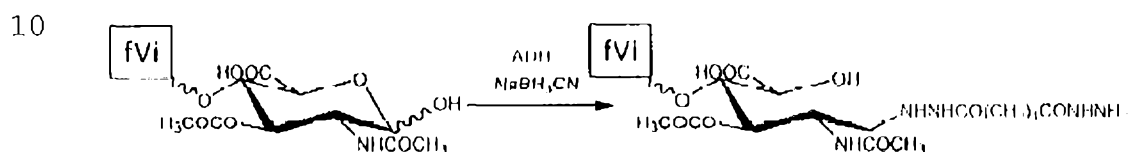
Comme variante de mode de réalisation, l'antigène
 choisi peut être modifié, soit par l'introduction d'un
 groupe lieur soit par conversion d'un groupe fonctionnel
 sur l'antigène en un autre groupe fonctionnel approprié
 pour la réaction avec la fraction saccharidique activée
 sur la nOMV, ou avec un lieur du conjugué vésicule-lieur
 lorsqu'il est utilisé. En particulier, si l'antigène
 choisi est un saccharide, il peut être modifié par
 réaction avec un lieur soit de façon aléatoire (r), ce
 qui signifie que le lieur est introduit à des points
 multiples tout le long de la chaîne de sucre, soit
 sélectivement (s), ce qui signifie que le lieur est
 introduit à l'extrémité réductrice de la chaîne de sucre
 (c'est-à-dire, au niveau d'une seule position). Dans un
 mode de réalisation préféré, le lieur est introduit de
 façon sélective au niveau de la position terminale de
 l'antigène choisi, comme il est indiqué par exemple dans
 l'exemple 3.

25

La modification sélective de l'antigène est obtenue
 de préférence par réaction avec du dihydrazide de l'acide
 adipique (ADH) en présence de NaBH₃CN, comme il est
 représenté de façon générale sur le schéma 5 en utilisant
 le fVi comme antigène. La modification aléatoire de
 l'antigène est obtenue de préférence par activation d'un
 ou de plusieurs groupes acide carboxylique sur

30

l'antigène, par exemple en utilisant du NHS/EDAC, et une réaction subséquente avec de l'ADH, comme il est représenté sur le schéma 6 en utilisant le fVi comme antigène. Ce type de réaction de conjugaison est illustré sur le schéma 7 ci-dessous, en utilisant, à titre d'exemple, une nOMV qui est conjuguée par l'intermédiaire d'une unité de rhamnose oxydée au fVi modifié pour inclure un $-NH_2$ par réaction avec de l'ADH.



25

Une variante de mode de réalisation de l'invention se rapporte à un procédé comprenant les étapes suivantes :

a) la modification d'un antigène choisi pour inclure un groupe amino, de préférence $-NH_2$; b) l'activation d'une nOMV par oxydation d'un groupe hydroxyle d'une fraction saccharidique comme il a été discuté ci-dessus, et c) la

30

connexion de la fraction saccharidique oxydée à l'antigène modifié de l'étape a), de préférence, par amination réductrice, comme il a été discuté ci-dessus.

Une variante de mode de réalisation se rapporte à un procédé de fabrication d'un conjugué nOMV-antigène comprenant la connexion d'une fraction saccharidique oxydée d'une nOMV activée à un antigène modifié, fabriquant de cette façon les conjugués de nOMV de l'invention, où l'antigène a été modifié pour inclure un groupe amino, de préférence $-NH_2$, et où la nOMV a été activée par oxydation d'un groupe hydroxyle d'une fraction saccharidique. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'étape de réaction est une amination réductrice.

Comme il a été présenté ci-dessus en détail, les conjugués de nOMV de l'invention comprennent une fraction saccharidique de surface de la nOMV activée connectée directement à un antigène choisi.

Dans un mode de réalisation préféré de façon égale, la fraction saccharidique de surface de nOMV activée est connectée à l'antigène choisi indirectement, par exemple, par l'intermédiaire d'une unité de lieur. Ce dernier sera généralement un lieur bifonctionnel, utilisant un groupe fonctionnel pour réagir avec la nOMV (par l'intermédiaire de la fraction saccharidique activée) et un autre groupe fonctionnel pour réagir avec l'antigène choisi. Le lieur peut être un lieur hétérobifonctionnel ou un lieur homobifonctionnel de formule générale (I) :

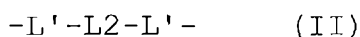
30



dans lequel :

les groupes X et X' sont indépendamment identiques ou différents l'un de l'autre, et réagissent avec la fraction saccharidique de surface de la nOMV activée et
5 l'antigène choisi respectivement ; et

L représente un espaceur de liaison, de préférence de formule générale (II) :



10

dans lequel :

les deux groupes L' sont indépendamment identiques ou différents l'un de l'autre et sont choisis parmi : un groupe carbonyle (C=O), ester (-C(O)O-) ou amido (-
15 C(O)NR1-), où R1 représente H ou un groupe linéaire, ou, lorsqu'il comprend au moins 3 atomes de carbone, un groupe alkyle cyclique ramifié en C1 à C10 comportant 1 à 10 atomes de carbone (par exemple, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10) ; et

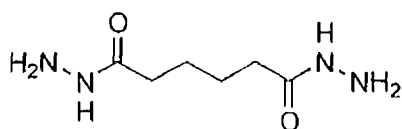
20 L2 représente un groupe alkyle en C1 à C10 linéaire ou ramifié comportant 1 à 10 atomes de carbone, de préférence comportant 4 atomes de carbone, de façon même davantage préférée sous la forme d'une chaîne linéaire.

Le groupe X est choisi de préférence parmi : -NH₂,
25 -NH-NH₂, -O-NH₂, un résidu sulfo-N-hydroxysuccinimide et N-oxysuccinimide éventuellement substitué.

Lorsque les réactions avec à la fois la nOMV et l'antigène choisi impliquent les mêmes groupes fonctionnels, il est préféré d'utiliser un lieu
30 bifonctionnel de formule générale (I), où les deux groupes X sont identiques.

Lorsque les groupes fonctionnels sur la fraction saccharidique de la nOMV et sur l'antigène choisi sont tous les deux des aldéhydes, il est préféré d'utiliser un lieur homofonctionnel ayant X choisi parmi : un groupe réactif -NH₂, -NH-NH₂ ou -O-NH₂. Dans un mode de réalisation encore préféré, le lieur est le dihydrazide de l'acide adipique (ADH) de formule générale :

10



ADH

Le lieur peut être ensuite mis à réagir avec la nOMV et/ou l'antigène par amination réductrice comme il a été présenté ci-dessus.

Les lieurs bifonctionnels préférés particulièrement utiles pour la réaction avec des groupes amines de l'antigène choisi, sont choisis parmi : des halogénures d'acryloyle, de préférence le chlorure, le glutarate de disuccinimidyle, le subérate de disuccinimidyle et l'éthylène glycol bis[succinate de succinimidyle].

D'autres lieurs encore préférés sont choisis parmi : le groupe β -propionamido, la nitrophényl-éthylamine, des halogénures d'halogénoacyle, des liaisons de dérivés glycosidiques, l'acide 6-aminocaproïque.

Dans un mode de réalisation encore préféré, le lieur est choisi parmi : le N-hydroxysuccinimide, le N-oxysuccinimide, de façon même davantage préférée à partir du diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide adipique (SIDEA).

Lorsque la réaction avec la nOMV et l'antigène implique des groupes fonctionnels différents (tels qu'une amine sur la nOMV et un thiol sur l'antigène), il faudra comprendre qu'il sera utilisé un lieu

5 hétérobifonctionnel capable de réagir sélectivement avec les deux groupes fonctionnels différents. Dans ce cas, les lieux hétérobifonctionnels préférés sont choisis parmi au moins l'un de :

10 le 3-(2-pyridyldithio)propionate de succinimidyle (SPDP), le 6-(3-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoate de succinimidyle (LC-SPDP), le 6-(3'-(2-pyridyldithio)propionamido)-hexanoate de sulfosuccinimidyle (sulfo-LC-SPDP), le 4-succinimidylloxycarbonyl- α -méthyl- α -(2-pyridyldithio)-

15 toluène (SMPT), le 6-[α -méthyl- α -(2-pyridyldithio)-toluénamido]hexanoate de sulfosuccinimidyle (sulfo-LC-SMPT), le 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate de succinimidyle (SMCC), le 4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate de sulfosuccinimidyle (sulfo-SMCC), l'ester de m-maléimidobenzoyl-N-

20 hydroxysuccinimide (MBS), l'ester de m-maléimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-MBS), le (4-iodoacétyl)aminobenzoate de N-succinimidyle (SIAB), le (4-iodoacétyl)aminobenzoate de sulfosuccinimidyle (sulfo-SIAB), le 4-(N-maléimidophényl)butyrate de

25 succinimidyle (SMPB), le 4-(N-maléimidophényl)butyrate de sulfosuccinimidyle (sulfo-SMPB), l'ester de N- γ -maléimidobutyryl-oxysuccinimide (GMBS), l'ester de N- γ -maléimidobutyryl-oxysulfosuccinimide (sulfo-GMBS), le

30 6-(((4-(iodoacétyl)amino)méthyl)cyclohexane-1-carbonyl)amino)hexanoate de succinimidyle (SIACX), le 6-[6-(((iodoacétyl)amino)hexanoyl)amino]hexanoate de

succinimidyle (SIAXX), le 4-(((iodoacétyl)amino)-méthyl)cyclohexane-1-carboxylate de succinimidyle (SIAC), et le 6-[(iodoacétyl)amino]hexanoate de succinimidyle (SIAX) et l'iodoacétate de p-nitrophényle (NPIA).

Dans un autre mode de réalisation, le procédé englobe la possibilité de recycler l'antigène choisi qui n'a pas réagi particulièrement lorsqu'il est sous la forme de polypeptide. De cette façon, il a été découvert que l'antigène qui n'a pas réagi à partir du mélange de conjugaison peut être recyclé de façon pratique dans l'étape de conjugaison, améliorant ainsi l'efficacité globale de la production des conjugués de l'invention, et obtenant des conjugués finals toujours dotés d'une remarquable immunogénicité (voir le présent exemple 6).

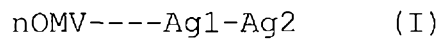
Comme il a été expliqué ci-dessus en détail, le présent procédé permet la préparation des conjugués de nOMV de l'invention d'une façon simple et pratique, nécessitant également moins d'étapes comparativement aux procédés antérieurs pour la préparation de dérivés conjugués similaires (par exemple, en démarrant à partir de dOMV). Ainsi, l'invention se rapporte également à un conjugué de nOMV obtenu (ou pouvant être obtenu) par le procédé de l'invention, selon les modes de réalisation décrits ci-dessus. En particulier, le présent procédé ne nécessite pas nécessairement l'étape coûteuse de dérivatisation d'un antigène polypeptidique, ainsi que l'absence de réalisation d'une extraction (par exemple, en utilisant un détergent) ou d'une dénaturation des vésicules de départ. La production et la purification des nOMV de l'invention sont en fait moins coûteuses que

pour les protéines de support classiques et plus robustes et homogènes que la production des dOMV. Les nOMV utilisées dans l'invention peuvent être produites à des rendements élevés en utilisant, par exemple, deux étapes
5 simples de filtration à flux tangentiel, et en évitant des procédures d'extraction par un détergent. En outre, l'antigène choisi qui n'a pas réagi peut être recyclé à partir du mélange de conjugaison pour une utilisation dans le procédé, améliorant l'efficacité de la
10 préparation des conjugués, comme il est illustré dans l'exemple 6. En outre, la présente invention offre une façon aisée de préparer un vaccin polyvalent, c'est-à-dire, un vaccin qui comprend des immunogènes multiples (provenant généralement de différents pathogènes) en
15 choisissant correctement les nOMV et l'antigène choisi comme il est décrit ici plus en détail. En fait, grâce à sa versatilité, le présent procédé peut être appliqué de façon pratique et efficace aux nOMV de différentes sources (par exemple, *Salmonella*, *Shigella* et
20 méningococciques), en étant appliqué avec succès aux antigènes à la fois protéiniques et saccharidiques. Finalement, il faut noter que le présent procédé ne permet pas seulement la préparation de conjugués hautement immunogènes, mais ils changent également de
25 façon sensible l'intégrité et la distribution des tailles des nOMV. Ceci est particulièrement apprécié de l'homme du métier, parce que l'absence d'agrégats de nOMV permet un meilleur rendement et une homogénéité globale et une robustesse du présent procédé.

30 La présente invention est également utile pour la préparation de conjugués de nOMV fonctionnalisés de

diverses façons, permettant une présentation multivalente de différents antigènes sur la surface de la vésicule choisie.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, l'invention se rapporte à un conjugué comprenant une vésicule de membrane externe native telle que présentée ci-dessus, comportant au moins une fraction saccharidique de surface connectée à au moins un premier antigène, où ledit premier antigène est connecté à un second antigène différent selon la formule générale (I) :



Dans cette direction, les deux antigènes choisis (indiqués ici par Ag1 et Ag2) peuvent être couplés ensemble pour donner un dérivé antigène-antigène (Ag1-Ag2), qui peut être ensuite connecté à la fraction saccharidique de surface de la nOMV choisie par l'intermédiaire d'une procédure d'amination réductrice comme il a été décrit ci-dessus.

En variante, le saccharide de surface de la nOMV peut être d'abord connecté à l'Ag1 choisi par l'intermédiaire d'une procédure d'amination réductrice telle que décrite ci-dessus, pour donner un conjugué nOMV-Ag1, et ensuite un second Ag2 est connecté au dit conjugué nOMV-Ag1, pour donner le conjugué de la formule générale (I) ci-dessus.

Dans tous les cas, les vésicules de membrane externe natives préférées sont les vésicules GMMA, de façon davantage préférée issues de Neisseria MenB. Les Ag1 et Ag2 peuvent être choisis parmi les antigènes préférés

tels que décrits ci-dessus, étant des fractions protéiniques ou polysaccharidiques. De préférence, les antigènes utilisés pour la multi-fonctionnalisation telle qu'envisagée ici sont tous les deux des protéines
 5 ou tous les deux des polysaccharides, voire même une protéine ou un saccharide.

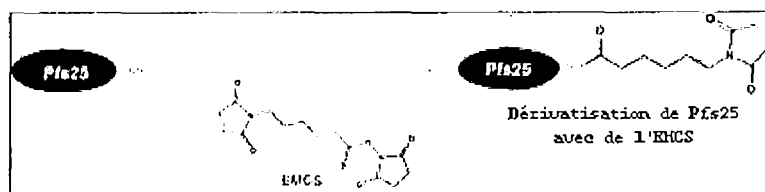
Dans tous les cas, la connexion entre les antigènes et la fraction saccharidique de la nOMV peut être réalisée directement, ou en utilisant des agents
 10 d'activation, ou des lieurs appropriés selon le mode de réalisation préféré décrit ici.

Ainsi, selon un mode de réalisation davantage préféré, l'invention se rapporte à un conjugué de la formule générale (I) ci-dessus, dans lequel Ag1 comprend
 15 l'antigène protéinique (NANP)₃, Ag2 comprend l'antigène protéinique Pfs25, de façon davantage préférée en ayant la particule de nOMV obtenue à partir de *S. typhimurium*.

De façon plus détaillée, ledit conjugué est préparé de préférence par un procédé comprenant les étapes
 20 suivantes :

a) l'activation de l'antigène Pfs25 en utilisant de l'EMCS, pour donner l'intermédiaire de Pfs25 activé indiqué ci-dessous :

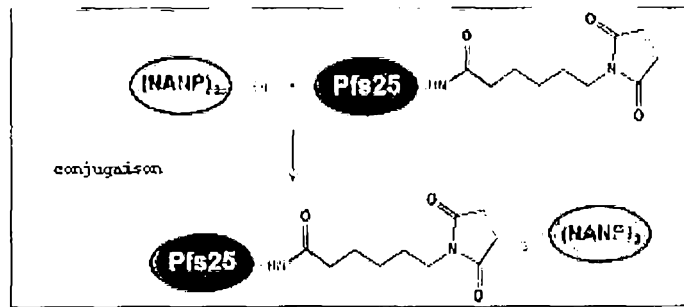
25



30

b) la connexion dudit intermédiaire de Pfs25 activé avec (NANP)₃ pour donner le dérivé Pfs25-EMCS-(NANP)₃ :

5

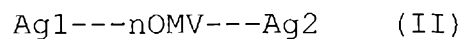


10 c) la réaction de la partie Pfs25 d'un tel dérivé avec l'intermédiaire de la vésicule de membrane externe native, par l'intermédiaire d'une réaction d'amination réductrice selon les modes de réalisation décrits ci-dessus pour donner le conjugué GMMA-Pfs25-(NANP)₃.

15 L'analyse Western blot a confirmé la formation du conjugué où le Pfs25 est connecté à la fraction saccharidique de surface de GMMA, et aucune agrégation n'est détectée.

20 Selon un autre mode de réalisation, la présente invention se rapporte à un conjugué immunogène comprenant une vésicule de membrane externe native, comportant au moins une fraction saccharidique de surface connectée à un premier antigène (Ag1) par l'intermédiaire d'une procédure d'amination réductrice telle que décrite ci-dessus, et au moins une fraction
25 saccharidique de surface connectée à un second antigène différent (Ag2) par l'intermédiaire d'une procédure d'amination réductrice telle que décrite ci-dessus pour donner un conjugué indiqué par la formule générale (II) :

30



Selon un mode de réalisation préféré, dans la formule générale (II) ci-dessus, la nOMV est un GMMA provenant de MenB, Ag1 est un polysaccharide capsulaire méningococcique du séro-groupe C, et Ag2 est un polysaccharide capsulaire méningococcique du séro-groupe C.

Les conjugués de formule (II) peuvent fournir de façon avantageuse une multi-fonctionnalisation sélective des nOMV, en utilisant un profil de fonctionnalisation spécifique, en utilisant la procédure d'amination réductrice selon l'invention. L'homme du métier comprendra, à la lumière de la versatilité de la technologie proposée, que la présente invention peut être utilisée de façon appropriée pour la multi-fonctionnalisation des nOMV, de préférence des GMMA, même avec plus de 2 antigènes différents. En dehors de la possibilité de choisir des antigènes différents, la présente invention permet également l'introduction de différentes quantités d'antigènes, modulant ainsi le rapport antigène/nOMV selon, par exemple, l'antigène choisi ou la nOMV.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte au conjugué nOMV-antigène décrit ci-dessus pour une utilisation en tant que médicament, particulièrement en tant qu'agent immunogène, de façon même davantage préférée pour un ou plusieurs des pathogènes tels qu'indiqués ici. En d'autres termes, l'invention se rapporte à l'utilisation des présents conjugués de nOMV pour la fabrication d'une composition immunogène.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte ainsi à une composition immunogène, de préférence un

vaccin, comprenant un conjugué de l'invention et au moins un support, un excipient ou un adjuvant supplémentaire pharmaceutiquement acceptable. Généralement, le support ou l'excipient pharmaceutiquement acceptable peut être
5 toute substance qui n'induit pas elle-même la production d'anticorps nocifs envers le patient recevant la composition, et qui peut être administrée sans toxicité excessive. Les supports et les excipients pharmaceutiquement acceptables sont ceux utilisés dans
10 l'art, et ils peuvent comprendre des liquides tels que l'eau, le sérum physiologique, le glycérol et l'éthanol. Des substances auxiliaires, telles que des agents de mouillage ou émulsifiants, des substances tampons du pH, et analogues, peuvent être également présentes dans de
15 tels véhicules, selon l'art antérieur.

L'invention fournit également un procédé pour produire une réponse immunitaire chez un vertébré, de préférence un mammifère, comprenant l'administration d'un conjugué de l'invention au mammifère ou à un autre
20 vertébré. L'invention fournit également des conjugués de l'invention pour une utilisation dans de tels procédés. La réponse immunitaire est de préférence protectrice et de préférence implique des anticorps. Le procédé peut produire une réponse de rappel. Le mammifère est de
25 préférence un être humain. Le sujet chez lequel la maladie est prévenue peut ne pas être le même que le sujet qui reçoit le conjugué de l'invention. Par exemple, un conjugué peut être administré à une femme (avant ou durant une grossesse) afin de protéger sa descendance
30 (la dite « immunisation maternelle »). Les conjugués de l'invention peuvent être également utilisés pour

immuniser d'autres mammifères, par exemple, des bovins, des moutons et des porcs (spécialement contre *Salmonella sp.*), et d'autres vertébrés non mammifères y compris des poissons et des volailles.

5 L'invention fournit des conjugués pour une utilisation en thérapie (par exemple, en tant que compositions immunogènes ou en tant que vaccins). L'invention fournit également un conjugué pour une utilisation dans un procédé de production d'une réponse
10 immunitaire chez un vertébré, de préférence un mammifère. L'invention fournit également l'utilisation d'un conjugué dans la fabrication d'un médicament pour produire une réponse immunitaire chez un vertébré, de préférence un mammifère. Les utilisations et les
15 procédés sont particulièrement utiles pour prévenir/traiter diverses maladies, selon les antigènes et les nOMV au sein des conjugués tels que présentés ci-dessus. Les conjugués préférés de l'invention peuvent conférer un titre en anticorps chez un patient qui est supérieur
20 au critère pour une séroprotection pour chaque composant antigénique pour un pourcentage acceptable de sujets humains. Les antigènes avec un titre en anticorps associé au-dessus duquel un hôte est considéré comme avoir subi une séroconversion contre l'antigène sont bien connus,
25 et de tels titres sont publiés par des organisations telles que l'OMS. De préférence plus de 80 % d'un échantillon statistiquement significatif de sujets présente une séroconversion, de façon davantage préférée plus de 90 %, de façon encore davantage préférée plus de
30 93 % et de façon préférée entre toutes de 96 à 100 %.

Les compositions immunogènes de l'invention seront généralement administrées directement à un patient. L'administration directe peut être accomplie par injection parentérale (par exemple, par voie sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, ou dans l'espace interstitiel d'un tissu), ou par administration rectale, orale, vaginale, topique, transdermique, intranasale, oculaire, auriculaire, pulmonaire ou autre mucoale.

10 L'administration intramusculaire est préférée, par exemple, dans la cuisse ou le haut du bras. L'injection peut être effectuée à l'aide d'une aiguille (par exemple, une aiguille hypodermique), mais une injection sans aiguille peut être utilisée en variante. Une dose

15 intramusculaire classique est d'environ 0,5 ml. L'invention peut être également utilisée pour déclencher une immunité systémique et/ou mucoale. Le traitement posologique peut être un calendrier d'une seule dose ou un calendrier de doses multiples. Les doses multiples

20 peuvent être utilisées dans un calendrier d'immunisation primaire et/ou dans un calendrier d'immunisation de rappel. Un calendrier de dose primaire peut être suivi d'un calendrier de dose de rappel. Le temps approprié entre les doses de sensibilisation (par exemple, entre

25 4 à 16 semaines), et entre la sensibilisation et le rappel, peut être déterminé en routine.

Les infections touchent diverses zones du corps et ainsi les compositions de l'invention peuvent être préparées sous diverses formes. Par exemple, les

30 compositions peuvent être préparées sous la forme d'injectables, soit des solutions liquides soit des

suspensions. Des formes solides appropriées pour une solution, ou une suspension, dans des véhicules liquides avant une injection peuvent être également préparées. La composition peut être préparée pour une administration
5 topique, par exemple, sous la forme d'une pommade, d'une crème ou d'une poudre. La composition peut être préparée pour une administration orale, par exemple, sous la forme d'un comprimé ou d'une capsule, ou sous la forme d'un sirop (éventuellement aromatisé). La composition peut
10 être préparée pour une administration pulmonaire, par exemple, sous la forme d'un inhalateur, en utilisant une poudre fine ou une pulvérisation. La composition peut être préparée sous la forme d'un suppositoire ou d'un ovule. La composition peut être préparée pour une
15 administration nasale, auriculaire ou oculaire, par exemple, sous la forme de gouttes. Les compositions appropriées pour une injection parentérale sont préférées entre toutes. La composition est de préférence stérile. Elle est de préférence apyrogène. Elle est de
20 préférence tamponnée, par exemple, entre pH 6 et pH 8, généralement autour de pH 7. Les compositions de l'invention peuvent être isotoniques par rapport aux êtres humains. Les compositions immunogènes comprennent une quantité immunologiquement efficace d'un conjugué de
25 l'invention, ainsi que l'un quelconque d'autres composants spécifiés, selon les besoins. Le traitement posologique peut être un calendrier d'une seule dose ou un calendrier de doses multiples (par exemple, y compris des doses de rappel). La composition peut être
30 administrée conjointement avec d'autres agents immunorégulateurs.

Les adjuvants qui peuvent être éventuellement utilisés dans des compositions de l'invention comprennent, mais n'y sont pas limités, des sels de métaux insolubles, des émulsions huile dans l'eau (par exemple, MF59 ou AS03, les deux contenant du squalène),
5 des saponines, des dérivés non toxiques de LPS (tels que le monophosphoryl-lipide A ou le MPL 3-O-désacylé), des oligonucléotides immunostimulants, des toxines ADP-ribosylantes bactériennes détoxifiées, des
10 microparticules, des liposomes, des imidazoquinolones, ou leurs mélanges. D'autres substances qui agissent comme des agents immunostimulants sont divulguées, par exemple, dans Watson, *Pediatr. Infect. Dis. J.* (2000) 19: 331-332. L'utilisation d'un adjuvant d'hydroxyde
15 d'aluminium et/ou de phosphate d'aluminium est particulièrement préférée. Ces sels comprennent des oxyhydroxydes et des hydroxyphosphates. Les sels peuvent prendre toute forme appropriée (par exemple, gel, cristalline, amorphe, etc.).

20 Les conjugués de l'invention qui comprennent des nOMV provenant d'un pathogène et un antigène choisi provenant d'un second pathogène peuvent être utiles en tant que vaccins multivalents. Les paires de pathogènes qui peuvent être combinés (l'un comme antigène, et
25 l'autre comme vésicule nOMV) comprennent, mais n'y sont pas limitées : *N. meningitidis* et *Salmonella* non typhoïde (par exemple, *Salmonella typhimurium* ou *Salmonella enteritidis*) ; *P. falciparum* et *Salmonella* non typhoïde ; *Salmonella typhi* et *Salmonella* non
30 typhoïde ; ETEC et *Shigella* sp. ; *Streptococcus* du

groupe A (GAS) et *N. meningitidis* ; et GAS et *Salmonella* non typhoïde.

Les appariements préférés de l'invention sont indiqués dans le tableau A suivant.

5

10

15

20

25

30

Tableau A
 Combinaisons nOMV-antigène préférées

	nOMV	Antigène
5	<i>Salmonella typhimurium</i>	fHbp de <i>Neisseria meningitidis</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CSP de <i>Plasmodium falciparum</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Pfs25 de <i>Plasmodium falciparum</i>
10	<i>Salmonella typhimurium</i>	RO6C de <i>Plasmodium falciparum</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>	RO10C de <i>Plasmodium falciparum</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CTF1232 d' <i>Escherichia coli</i>
15	<i>Salmonella typhimurium</i>	Saccharide Vi de <i>S. typhimurium</i>
	<i>Neisseria meningitidis</i>	fHbp de <i>Neisseria meningitidis</i>
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Oligosaccharide poly-rhamnose
20	<i>Shigella</i> , de préférence <i>sonnei</i>	CTF1232 d' <i>Escherichia coli</i>
	<i>Neisseria meningitidis B</i>	Saccharide capsulaire de <i>MenA</i>
25	<i>Neisseria meningitidis B</i>	Saccharide capsulaire de <i>MenC</i>

Ainsi, les présents conjugués nOMV-antigène sont particulièrement utiles en tant qu'agents immunogènes contre les pathogènes énumérés dans le tableau A.

30 Les conjugués de l'invention qui comprennent des nOMV provenant d'un pathogène et un antigène choisi

provenant d'un second pathogène peuvent être utiles en tant que composés immunogènes pour la préparation de vaccins multivalents. Ainsi, l'invention fournit une composition comprenant un conjugué de l'invention et un

5 ou plusieurs des autres antigènes suivants :

- un antigène saccharidique provenant de *N. meningitidis* du séro groupe A, C, W135 et/ou Y,

- un antigène saccharidique provenant de *Streptococcus pneumonia*,

10 - un antigène provenant du virus de l'hépatite A, tel qu'un virus inactivé,

- un antigène provenant du virus de l'hépatite B, tel que les antigènes de surface et/ou core,

- un antigène diphtérique, tel que l'anatoxine diphtérique, par exemple, le mutant CRM197,

15

- un antigène tétanique, tel que l'anatoxine tétanique,

- un antigène provenant de *Bordetella pertussis*, tel que l'holotoxine pertussique (PT) et l'hémagglutinine filamenteuse (FHA) provenant de *B. pertussis*, éventuellement aussi en combinaison avec la pertactine et/ou les agglutinogènes 2 et 3,

20

- un antigène saccharidique provenant d'*Haemophilus influenzae* A ou B,

25 - un ou plusieurs antigènes polio tels que l'IPV,
- des antigènes de la rougeole, des oreillons et/ou de la rubéole,

- un ou plusieurs antigènes de la grippe, tels que les protéines de surface hémagglutinine et/ou neuraminidase,

30

- un antigène provenant de *Moraxella catarrhalis*,

- un antigène protéinique provenant de *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B),

- un antigène saccharidique provenant de *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B),

5 - un antigène provenant de *Streptococcus pyogenes* (streptocoque du groupe A),

- un antigène provenant de *Staphylococcus aureus*.

L'invention va être à présent décrite par la partie expérimentale suivante, sans poser aucune limitation à son étendue.

10

Partie expérimentale

Exemple 1 - Production des nOMV

15 Les nOMV préférées utilisées dans la présente partie expérimentale sont des GMMA préparés à partir de souches Δ tolR de *S. typhimurium* ou *S. sonnei*, par exemple, comme il est divulgué dans Clin Vaccine Immunol. Avril 2016 ; 23(4): 304314 et PLoS One. 2015 ; 10(8):
20 e0134478 respectivement.

Les caractéristiques desdites nOMV étaient telles qu'indiquées dans le tableau 2 suivant.

25

30

Tableau 2

Caractéristiques des nOMV purifiées préparées à partir de souches Δ tolR de *S. typhimurium* ou *S. sonnei*

	<i>S. typhimurium</i> 1418 (Δ tolR)	<i>S. sonnei</i> 1790 (Δ tolR Δ htrB)
Diamètre (nm)	131,5	140
Charge de surface (mV)	-14,1	-9,87
Lipide A/mg de vésicules	172,8	155,4
Rapport pondéral OAg/protéines totales	0,84	0,039

Exemple 2 - Oxydation des nOMV

Diverses conditions d'oxydation ont été testées. Par exemple, pour l'oxydation des nOMV Δ tolR 1418, des concentrations de NaIO₄ dans la plage de 5 à 20 mM ont été testées. L'effet de l'oxydation sur la longueur de la chaîne de l'-OAg a été estimé. La longueur de la chaîne a été réduite avec la progression de l'oxydation. Des concentrations supérieures de NaIO₄ ont eu tendance à réduire la taille de l'OAg. Il a été vérifié que l'augmentation de la molarité du NaIO₄ a non seulement conduit à des taux d'oxydation supérieurs, de 5 à 45 % (avec le rhamnose, sucre principal impliqué dans le procédé), mais a également réduit la longueur de la chaîne de l'-OAg. En même temps, il n'y a eu aucun changement dans la distribution des tailles des vésicules, et l'intégrité des vésicules a été maintenue.

Ceci a été vérifié par la diffusion dynamique de la lumière (DLS), l'analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA) et la chromatographie liquide d'exclusion haute performance/diffusion de la lumière selon des angles multiples (HPLC-SEC/MALS ; voir le

tableau 2a). Il a été également vérifié que les groupes NH₂ sur les nOMV n'ont pas réagi avec les groupes CHO produits dans des conditions d'amination réductrice produisant des particules réticulées plus grosses (tableau 2b).

Tableau 2a

Analyse des nOMV oxydées (obtenues par réaction avec 10 et 20 mM de NaIO₄) par DLS et HPLC-SEC/MALS

Echantillon	Diamètre (z-moyen) (Pdl) (nm par DLS)	Rw (nm par MALS)
nOMV 1418 ΔtolR	131,5 (0,219)	30,5
nOMVox 1418 ΔtolR 10 mM	129,5 (0,273)	27,4
nOMVox 1418 ΔtolR 20 mM	135,8 (0,224)	30,5

Tableau 2b

Aucune réaction des nOMV dans des conditions d'amination réductrice, vérifié par DLS et HPLC-SEC/MALS

Echantillon	Diamètre (z-moyen) (Pdl) nm par DLS	Rw (nm par MALS)
nOMVox 1418 ΔtolR 20 mM de NaIO ₄	135,8 (0,224)	30,5
nOMVox 1418 ΔtolR 20 mM de NaIO ₄ après réaction avec du NaBH ₃ CN	131,7 (0,291)	31,2

Dans des conditions d'amination réductrice, sans nOMV, l'antigène étranger à conjuguer ne donne aucune agrégation, vérifié pour plusieurs antigènes (par exemple, fHbp, Pfs25 et CTF1232).

En outre, il a été vérifié que le NaBH₃CN ne réduit pas les liaisons S-S, ce qui pourrait autrement affecter la conformation des protéines telles que la Pfs25. La Pfs25 a été traitée avec du NaBH₃CN dans des conditions mimant une conjugaison, et la même réaction a été effectuée avec du DTT en tant qu'agent réducteur pour une comparaison. Après mélange pendant une nuit à température ambiante, l'analyse par SDS-PAGE et HPLC-SEC de la Pfs25 traitée avec du NaBH₃CN, au contraire de la Pfs25 traitée avec du DTT, n'a montré aucun changement de la protéine comparativement à la Pfs25 fraîche. Les mêmes résultats ont été confirmés par une analyse MALDI-MS, lorsque la protéine a été traitée avec de l'iodoacétamide (IAA) en présence de NaBH₃CN ou de DTT.

D'autres expériences sur des nOMV de *S. typhimurium* triple mutant (nOMV de *S. typhimurium* 2192 Δ tolR Δ PagP Δ msbB) ont montré que de faibles concentrations de NaIO₄ (3 à 5 mM) étaient également suffisantes pour obtenir de bons taux d'oxydation. Des exemples de résultats sont présentés dans le tableau 2c, en utilisant une concentration de nOMV dans la plage de 0,2 à 4 mg/ml, un pH dans la plage de 5 à 8, et une concentration de NaIO₄ dans la plage de 0,5 à 5 mM. Les vésicules résultantes ont été estimées pour le % de récupération des nOMV, le % d'oxydation du rhamnose, la taille des nOMV, et la taille de l'OAg.

Tableau 2c

Oxydation des nOMV de *S. typhimurium* triple mutant

Série	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Réponse 1	Réponse 2	Réponse 3	Réponse 4
	A: [nOMV]	B: [NaIO ₄]	C: pH	% de récupération des nOMV (micro BCA)	% d'oxydation de Rha (HPAEC-PAD)	Taille des nOMV (r moyen par DLS)	Taille de l'OAg (MP DRI)
	µg/ml	mM		%	%	nm	kDa
1	2100	2,75	6,5	72	10	50,28	20907
2	2100	2,75	8	75	6	50,77	24215
3	4000	0,5	5	79	0	51,52	31148
4	2100	2,75	5	80	13	48,09	17935
5	200	5	5	87	58	42,39	6826
6	2100	2,75	6,5	77	7	50,4	20276
8	4000	2,75	6,5	81	3	50,89	25221
9	2100	5	6,5	82	23	47,56	10170
10	2100	2,75	6,5	80	10	49,8	18493
11	2100	0,5	6,5	85	1	50,39	30592
12	200	0,5	5	83	7	50,19	25131
13	2100	2,75	6,5	82	9	50,85	18493
14	2100	2,75	6,5	78	10	49,07	20589
15	200	0,5	8	77	2	51,42	30347
16	200	5	8	72	20	47,69	10980
17	2100	2,75	6,5	83	8	49,09	20536

18	4000	5	8	80	11	48,44	18212
19	4000	0,5	8	78	1	50,86	30208
20	4000	5	5	86	15	48,6	16611

5

Des taux similaires de récupération de nOMV ont été observés pour toutes les conditions réactionnelles, testés par le micro-dosage des protéines à l'acide bicinchoninique (micro BCA). Il a été en outre vérifié qu'aucune des conditions réactionnelles testées ne donnait naissance à la réticulation ou à l'agrégation des nOMV.

Le pourcentage d'oxydation du rhamnose a été affecté à la fois par la concentration des nOMV et la concentration du NaIO_4 , avec une concentration inférieure de nOMV et une concentration supérieure de NaIO_4 ayant tendance à donner des taux supérieurs d'oxydation du rhamnose. Par conséquent, en général, la concentration des nOMV et/ou la concentration du NaIO_4 peuvent être manipulés pour obtenir le taux souhaité d'oxydation du rhamnose (ou d'un autre sucre).

Pour comparer les vésicules avec une taille d'-OAg et des taux d'oxydation du rhamnose différents, les vésicules des séries 5, 14 et 16 du tableau 5 ont été traitées avec du NaBH_4 pour éliminer les groupes aldéhyde (CHO) et stabiliser les vésicules nOMV, et le taux d'oxydation du rhamnose et la taille de l'-OAg ont été estimés à nouveau après traitement. Les résultats sont présentés ci-dessous dans le tableau 2d.

30

Tableau 2d

Traitement avec du NaBH_4 des séries 5, 14 et 16

Conditions pour l'oxydation	% d'oxydation de Rha attendu	Taille de l'OAg attendu	Pré-réduction		Post-réduction	
			% d'oxydation de Rha attendu	Taille de l'OAg attendu	% d'oxydation de Rha attendu	Taille de l'OAg attendu
5 Série 5	58	6826 Da	58	7481 Da	53	6039 Da
Série 16	20	10980 Da	14,4	18162 Da	16	16528 Da
Série 14	10	20589 Da	13	24224 Da	12	21163 Da

10 Les résultats montrent que l'étape de réduction n'a pas affecté la longueur de l'-OAg ou le degré d'oxydation des nOMV. Des résultats similaires ont été obtenus dans une expérience séparée.

15 Exemple 3 - Etape de conjugaison nOMV-Ag (fVi-nOMV de *S. typhimurium* ; conjugaison indirecte par l'intermédiaire d'un lieu)

20 Le fVi a été modifié par réaction avec un lieu d'ADH, soit de façon aléatoire (r) soit de façon sélective (s). Le fVi modifié a été ensuite conjugué à des nOMV de *S. typhimurium* oxydées en utilisant une amination réductrice. Lorsque le fVi a été activé de façon aléatoire avec l'ADH, un rapport pondéral fVi sur nOMV de 1/1 a été utilisé dans la conjugaison, alors qu'un rapport pondéral de 3/1 a été utilisé lorsque le fVi a été dérivatisé à son extrémité avec l'ADH. Les conjugués ont été caractérisés en utilisant le test micro BCA/Lowry pour déterminer la teneur en protéines totales (récupération des nOMV) ; la chromatographie avec échange d'anions haute performance avec détection par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) a été utilisée pour déterminer la teneur en Vi total (aucune interférence

25

30

des nOMV) ; la chromatographie liquide haute performance-chromatographie d'exclusion (HPLC-SEC en utilisant une colonne de gel TSK 3000 PWxl) a été utilisée pour estimer le % de Vi libre en utilisant l'indice de réfraction différentiel (dRI) et la diffusion dynamique de la lumière-chromatographie liquide haute performance-chromatographie d'exclusion-diffusion statique de la lumière selon des angles multiples (DLS/HPLC-SEC-MALS) a été utilisée pour déterminer la taille. L'effet des conditions de conjugaison de ce procédé de conjugaison sur le nombre final des chaînes de fVi par nOMV a été estimé en considérant les données recueillies par HPAEC-PAD ainsi que le nombre des nOMV par l'analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA).

Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3

Influence de la concentration du NaIO₄ et du pH sur les conjugués fVi-nOMV

Série	MM moyenne du fVi/ kDa	r/s	% de RU de fVi activées (r) / % de chaînes de fVi activées (s)	[NaIO ₄] pour l'oxydation des nOMV	pH de la conjugaison	% de récupération des nOMV	Rapport p/p fVi/ nOMV	Chaînes de fVi/ particule de nOMV
1.	48,5	r	24,4	20	4,5	30,7	0,45	97
2.	48,5	r	24,4	20	6	43,8	0,35	76
3.	48,5	r	30,4	20	7,2	58,8	0,2	43
4.	48,5	s	> 95	10	7,2	69	0,08	17
5.	48,5	s	> 95	20	4,5	48,9	0,44	95
6.	48,5	s	> 95	10	4,5	80	0,43	93
7.	23	r	11	20	4,5	80	0,08	37

8.	23	r	11	10	4,5	89,4	0,07	32
9.	23	r	11	10	6	77	0,04	18
10.	8	r	23,8	10	4,5	100	0,12	158
11.	3,8	r	15,5	20	4,5	100	0,05	138
12.	3,8	r	15,5	10	4,5	67,6	0,07	194
13.	3,8	r	15,5	10	6	82	0,02	55
14.	3,8	r	16,2	10	7,2	74	0,01	30

5

r : introduction aléatoire du lieur (ADH) le long de l'antigène fVi.

s : introduction sélective du lieur (ADH) à l'extrémité terminale de l'antigène fVi.

RU : unités répétitives.

MM moyenne : mesurée par HPLC-SEC en utilisant des étalons de dextrane.

10 La réalisation de l'amination réductrice à pH 4,5 avec du fVi à 48,5 kDa, a produit des rapports supérieurs de fVi/nOMV et plus de chaînes de fVi par nOMV à la fois à 10 mM et 20 mM de NaIO₄, par rapport à un pH supérieur. Avec le fVi modifié de façon aléatoire, la précipitation est survenue à pH 4,5 ; la précipitation a été évitée en 15 travaillant avec le fVi modifié sélectivement. En général, la chimie sélective a été identifiée comme moyen pour améliorer la récupération des nOMV et pour éviter la précipitation. Il n'a pas été observé de précipitation pour le fVi avec une MM moyenne \leq 23 kDa à pH bas avec 20 des chaînes de fVi modifié de façon aléatoire.

25 L'oxydation des nOMV avec 10 mM de NaIO₄ à la place de 20 mM a abouti à une récupération améliorée des conjugués. L'augmentation de la concentration du NaIO₄ n'a pas eu d'impact sur les caractéristiques des conjugués finals.

30 Lors de l'utilisation de fVi à 23 kDa, des rapports inférieurs de fVi sur nOMV ont été obtenus, qui ont pu être associés au pourcentage de dérivatisation inférieur de fVi-ADH utilisé pour la conjugaison (11 % d'unités répétitives de fVi).

Le pH et le degré d'activation de fVi-ADH ont été identifiés comme des variables pour la modulation du nombre des chaînes de fVi liées par nOMV.

5 Exemple 3a - Conjugués Vi-nOMV de *S. typhimurium*
(conjugaison indirecte par l'intermédiaire d'un lieur)

Les conjugués 1 et 5 selon le tableau 3 ci-dessus, ayant des rapports Vi/nOMV p/p de 0,45 et 0,44 respectivement ont été testés chez des souris. Pour
10 comparaison, le CRM197 a été également utilisé en tant que support, et un mélange simple de fVi + nOMV a été également testé.

Des souris ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec les conjugués (dose de 1 µg de
15 Vi) et un adjuvant Alhydrogel. Les titres en IgG anti-Vi ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42, et les résultats sont présentés sur la figure 2A. La nOMV n'a pas été inférieure au CRM197, mais elle a été significativement meilleure que le mélange non conjugué.

20 Les titres en IgG contre l'-OAg ont été également estimés. La figure 2B représente les titres anti-OAg pour la vésicule seule ou conjugée au Vi. La conjugaison a réduit la réponse à l'-OAg d'une petite quantité, mais les réponses sont demeurées significatives.

25

Exemple 4 - Etape de conjugaison de nOMV-Ag (CTF1232 d'EPEC-nOMV de *S. typhimurium* ΔtolR 1418 ou *S. sonnei* 1790 ; conjugaison directe sans lieur)

CTF1232 est un antigène d'*E. coli* (SEQ ID NO : 14
30 avec un marqueur C-terminal d'hexa-histidine qui a été conjugué aux deux types de vésicules nOMV. Le polypeptide

comprend cinq résidus de lysine qui peuvent être utilisés pour la liaison aux saccharides oxydés dans les vésicules.

Pour la conjugaison à CTF1232, les vésicules ont été oxydées dans 100 mM d'acétate de sodium (pH 5) avec
5 du periodate de sodium (20 mM pour *S. typhimurium*, 40 mM pour *S. sonnei*) pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'oxydation dans *S. typhimurium* a été préférentielle dans les résidus de rhamnose (Rha), avec environ 30 % des unités Rha oxydées (calculé par
10 rapport au mannose). L'oxydation dans *S. sonnei* a eu un impact sur la région du noyau des molécules de LPS.

500 µg des vésicules oxydées (protéines totales mesurées) provenant de nOMV soit de *S. typhimurium* ΔtolR 1418 soit de *S. sonnei* 1790 ont été mis à réagir avec
15 500 µg de CTF1232 avec 1 à 2 mg de NaBH₃CN à température ambiante sur un week-end. En se basant sur la quantification de l'antigène qui n'a pas réagi après la conjugaison, la présence de l'antigène sur la surface des nOMV a été calculée comme étant < 36 % dans
20 *S. typhimurium* et < 31 % dans *S. sonnei*.

Les résultats ont montré que la chimie de l'amination réductrice est appropriée pour la conjugaison d'antigènes polypeptidiques aux vésicules. L'antigène CTF1232 a été conjugué au LPS oxydé des
25 deux vésicules.

Des souris ont été immunisées avec la protéine seule, un mélange de la protéine et des nOMV de *Shigella*, ou les conjugués. L'adjuvant Alhydrogel a été utilisé dans tous les groupes. Les immunisations ont été administrées
30 par voie intranasale aux jours 0, 21 et 38 et les réponses immunitaires ont été estimées aux jours 0, 14,

35 et 52. Les titres en IgG anti-CTF1232 sont présentés sur la figure 3.

Au jour 14, le conjugué nOMV 1418-CTF1232 a été capable d'induire une réponse significativement
5 supérieure à la protéine seule ($p = 0,0005$) ou mélangée physiquement avec des nOMV ($p = 0,042$) (test de Kruskal-Wallis avec analyse post-hoc de Dunn). En plus de l'amélioration des titres anti-CTF1232, le conjugué a
10 présenté l'avantage supplémentaire d'être un vaccin bivalent. Il n'a été observé aucune différence majeure entre les conjugués nOMV 1790-CTF1232 et nOMV 1418-CTF1232, signifiant que les nOMV à la fois de *Salmonella* et de *Shigella* peuvent fonctionner comme de bons supports pour l'antigène d'ETEC.

15

Exemple 5 - Etape de conjugaison de nOMV-Ag (conjugaison de Pfs25-nOMV de *S. typhimurium* en présence de Na_2SO_3)

L'antigène paludéen Pfs25 a été conjugué aux vésicules nOMV de *S. typhimurium* par deux chimies
20 différentes : aux protéines par l'intermédiaire de groupes SH-maléimido ou chimie click ; ou à l'OAg oxydé par le NaIO_4 . Pour la liaison à l'-OAg oxydé, un rapport de 1/1 de nOMV/Pfs25 a été utilisé, à une concentration de Pfs25 de 2,6 mg/ml dans du PBS avec une incubation
25 pendant une nuit à température ambiante. La formation de conjugués a été également obtenue lorsque l'excès de NaIO_4 a été neutralisé avec du Na_2SO_3 (une concentration de 10 mM a été utilisée dans cette expérience, pendant 10 minutes), ceci suivi de l'addition directe de Pfs25
30 dans le même récipient (concentration finale de 0,2 mg/ml). La figure 4A représente les titres en IgG

anti-Pfs25 en réponse à : les trois conjugués ; la Pfs25 seule ; ou la Pfs25 mélangée physiquement avec les vésicules. Toutes les constructions ont été formulées avec de l'Alhydrogel. Les souris ont été immunisées par
5 voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 à 0,1 µg de Pfs25/dose. Les titres en IgG anti-Pfs25 ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42.

La Pfs25 seule a induit une réponse en anticorps IgG anti-Pfs25 significativement inférieure aux
10 conjugués nOMV-SH-Pfs25 ($p = 0,001$) et nOMV-ox-Pfs25 ($p = 0,0095$). La Pfs25 mélangée physiquement avec des nOMV a induit de façon similaire une réponse inférieure par rapport aux nOMV-SH-Pfs25 et nOMV-ox-Pfs25 ($p = 0,0038$ et $p = 0,0282$ respectivement) (test de Kruskal-
15 Wallis avec analyse post-hoc de Dunn). De façon intéressante, la Pfs25 liée par l'intermédiaire du composant de sucre sur les nOMV (conjugué nOMV-ox-Pfs25) a induit une réponse en anticorps similaire à la Pfs25 liée aux protéines sur les nOMV (nOMV-SH-Pfs25 et nOMV-
20 click-Pfs25) et supérieure à la Pfs25 seule ou mélangée physiquement aux nOMV.

Les sérums issus des conjugués Pfs25-nOMV ont montré une activité de blocage de la transmission lorsqu'ils ont été analysés par le test SFMA (standard
25 membrane-feeding assay ; activité de réduction de la transmission > 90 % à une dilution au 1/8 et maintenue à une dilution au 1/16 pour les nOMV-SH-Pfs25 et nOMV-ox-Pfs25).

La liaison à la Pfs25 sur les nOMV n'a pas eu
30 d'impact sur la réponse en IgG anti-OAg. En outre, le conjugué obtenu par amination réductrice, où la chimie

utilisée a un impact sur la structure et la longueur de l'-OAg, a maintenu des titres élevés en IgG anti-OAg. Par conséquent, la présence d'un antigène étranger sur les nOMV de *S. typhimurium* n'a pas d'impact sur les
5 réponses en IgG anti-OAg (voir la figure 4C).

Dans une seconde étude, l'immunogénicité du conjugué Pfs25-nOMV (produit par amination réductrice) a été comparée à la Pfs25 mélangée physiquement aux nOMV à une dose de 1 µg de Pfs25 sans Alhydrogel.

10 La figure 4B représente la réponse en IgG anti-Pfs25 induite chez des souris par le conjugué Pfs25-nOMV comparativement à la Pfs25 mélangée physiquement aux nOMV sans Alhydrogel, en utilisant le même calendrier d'immunisation que pour la figure 4A.

15 Le conjugué a été capable d'induire une réponse en IgG anti-Pfs25 significativement supérieure à la protéine mélangée avec les nOMV ($p = 0,0002$; analyse bilatérale de Mann-Whitney).

20 Exemple 6 - Conjugués RO6C-nOMV de *S. typhimurium* (étape de recyclage)

L'antigène RO6C de *Plasmodium* a été conjugué à des vésicules nOMV oxydées de *S. typhimurium* en utilisant l'amination réductrice. Un autre conjugué a été produit
25 en recyclant le RO6C qui n'a pas réagi à partir du premier lot de conjugaison et en le réutilisant pour la conjugaison. Le rapport du RO6C sur les protéines totales a été mesuré par un test ELISA de compétition, et il a été de 7,2 % pour le conjugué non recyclé et de 11,1 %
30 pour le conjugué recyclé. Pour comparaison, le RO6C seul

a été utilisé. Toutes les constructions ont été formulées avec de l'Alhydrogel.

Des souris ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28, et des doses de 1, 4 et 20 μg de R06C ont été utilisées. Le conjugué recyclé a été testé à une dose de 4 μg de R06C. Les titres en IgG anti-R06C ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42, et les résultats sont présentés sur la figure 5A. Au jour 42, une réponse supérieure en IgG anti-R06C a été induite par le conjugué nOMV-R06C comparativement au R06C seul (test de Mann-Whitney, $p = 0,05$ à la dose de 1 μg , $p = 0,03$ à la dose de 4 μg et $p = 0,04$ à la dose de 20 μg). En outre, le conjugué nOMV-R06C a déclenché une réponse en IgG anti-R06C d'une façon dépendante de la dose (rang de Spearman, $p = 0,001$, jour 42). Toutes les constructions (à toutes les doses) ont montré la capacité de stimuler la réponse (jour 14 à jour 42). Les conjugués non recyclés et recyclés à la dose de 4 μg ont été comparés par le test bilatéral de Mann-Whitney, montrant la capacité du conjugué recyclé à induire une réponse qui n'est pas inférieure au non recyclé.

Les titres des IgG dirigées contre l'-OAg ont été également estimés. La figure 5B représente les titres en IgG anti-OAg pour les vésicules non recyclées et recyclées. Les doses des nOMV correspondant aux doses du R06C de 1, 4 et 20 μg ont été de 13 μg , 52 μg et 258 μg , respectivement. Pour le conjugué recyclé, la dose de nOMV a été de 32 μg (correspondant à une dose de R06C de 4 μg).

30

Exemples 7a à c - Exemples comparatifs

Exemple 7a - Réaction de dOMV (issues de *Neisseria meningitidis* B) avec le v3 de fHbp (aucune réaction)

Les dOMV du présent exemple ont été préparées par un procédé d'extraction par un détergent, où le désoxycholate est utilisé comme détergent choisi. Les vésicules extraites par un détergent ainsi obtenues ont été mises à réagir avec l'antigène choisi (fHbp) selon le procédé de la présente invention. En particulier, des dOMV, à la concentration de 0,96 mg/ml, ont été incubées avec du NaIO₄ à 10 mM pendant 30 minutes à température ambiante, dans l'obscurité. L'excès de NaIO₄ a été neutralisé avec du Na₂SO₃ à une concentration finale de 20 mM, pendant 15 minutes à température ambiante. La fHbp (rapport p/p des dOMV sur la fHbp de 1/1 et avec une concentration de dOMV de 0,335 mg/ml) et le NaBH₃CN (3 mg) ont été ajoutés directement au mélange réactionnel. Après mélange délicat pendant une nuit à température ambiante, le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min à 4 °C pendant 1 h), remis en suspension dans du PBS et analysé par SDS PAGE/Western blot.

Exemple 7b - Réaction des nOMV (issues de *Neisseria meningitidis* B) avec le v3 de fHbp (formation du conjugué nOMV-fHbp de l'invention)

Les nOMV du présent exemple ont été préparées sans utiliser un détergent quelconque, comme il est décrit dans Koeberling *et al.* Vaccine (2014) 32: 2688. Les vésicules extraites ainsi obtenues ont été mises à réagir avec l'antigène choisi (fHbp) selon le procédé de la

présente invention. En particulier, des nOMV à la concentration de 0,96 mg/ml ont été incubées avec du NaIO₄ à 5 mM pendant 30 minutes à température ambiante, dans l'obscurité. L'excès de NaIO₄ a été neutralisé avec
5 du Na₂SO₃ à une concentration finale de 20 mM, pendant 15 minutes à température ambiante. La fHbp (rapport p/p des dOMV sur la fHbp de 1/1 et avec une concentration de dOMV de 0,335 mg/ml) et le NaBH₃CN (3 mg) ont été ajoutés directement au mélange réactionnel. Après mélange
10 délicat pendant une nuit à température ambiante, le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min à 4 °C pendant 1 h), remis en suspension dans du PBS et analysé par SDS PAGE/Western blot. L'analyse SDS PAGE/Western blot anti-fHbp a confirmé la
15 formation du conjugué par la chimie de l'amination réductrice uniquement avec des nOMV, mais pas avec des dOMV. Gel de SDS page à 10 %.

Exemple 7c - Réaction des nOMV (issues de *Salmonella*) avec le vl de fHbp, en suivant la procédure de l'exemple 7b

La même expérience que l'exemple 7b a été effectuée en utilisant des nOMV provenant de *Salmonella typhimurium*, et des résultats similaires ont été
25 recueillis, en obtenant le conjugué nOMV-fHbp de l'invention.

Exemple 8 - Préparation de nOMV multi-fonctionnalisées en utilisant le (NANP)₃-SH-Pfs25, selon l'invention

30 La protéine Pfs25 a été dérivatisée avec le lieur EMCS selon la procédure suivante. La Pfs25, dans du

tampon PBS à la concentration de 2,6 mg/ml, a été additionnée du lieur EMCS (rapport molaire du lieur EMCS sur les résidus Lys de la Pfs25 de 0,3). La réaction a été mélangée à température ambiante pendant 4 h. La protéine dérivatisés résultante (Pfs25-EMCS) a été purifiée par colonne PD10 contre du NaH₂PO₄ à 10 mM pH 6. L'analyse par MALDI-TOF MS a révélé une moyenne de 4 lieurs EMCS introduits par molécule de Pfs25. Le (NANP)₃ a été ajouté à la solution de Pfs25-EMCS pour avoir un rapport molaire de (NANP)₃ sur les lieurs EMCS de 3/1 et une concentration de Pfs25 de 0,7 mg/ml. La réaction a été mélangée à température ambiante pendant une nuit. Après ce temps, le dérivé Pfs25-(NANP)₃ a été purifié par Vivaspin 10K contre du tampon PBS. L'analyse par SDS PAGE/Western blot et MALDI-TOF MS a confirmé la formation du produit. Des nOMV de *S. typhimurium* à la concentration de 2,1 mg/ml dans du NaH₂PO₄ à 100 mM pH 6,5 ont été incubées avec du NaIO₄ à 5 mM pendant 30 minutes à 25 °C, dans l'obscurité. L'excès de NaIO₄ a été neutralisé avec du Na₂SO₃ à une concentration finale de 10 mM, pendant 10 minutes à température ambiante. Le Pfs25-(NANP)₃ (rapport p/p des nOMV sur le Pfs25-(NANP)₃ de 1/1 et avec une concentration de nOMV de 0,45 mg/ml) et le NaBH₃CN ont été ajoutés directement au mélange réactionnel. Après mélange délicat pendant une nuit à température ambiante, le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min à 4 °C pendant 30 min), remis en suspension dans du PBS et analysé par SDS PAGE/Western blot, qui a confirmé la formation du conjugué.

Exemple 9 - Données *in vivo* des conjugués de l'invention obtenus par conjugaison d'une particule nOMV de *S. typhimurium* à l'antigène Pfs25 avec ou sans neutralisation, selon les modes de réalisation de l'invention

5 Des souris CD1 femelles ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec 2,5 µg de protéines totales des particules nOMV de *S. typhimurium* conjuguées à l'antigène Pfs25 avec ou sans l'étape de neutralisation
10 (voir l'exemple 5). Les deux conjugués ont montré un rapport p/p de Pfs25 sur les protéines totales proche de 20 % par un test ELISA de compétition et ils ont été adsorbés sur de l'Alhydrogel (0,7 mg/ml d'Al³⁺). Les titres en IgG anti-Pfs5 et anti-OAg ont été mesurés aux
15 jours 0, 14, 27 et 42. A tous les points de temps, les deux conjugués ont induit une réponse similaire en IgG anti-Pfs25 (test de Mann Whitney), comme il est représenté sur la figure 6a. En outre, les conjugués ont été capables d'induire une réponse similaire en IgG anti-
20 OAg, comme il est indiqué sur la figure 10b. L'étape de neutralisation dans la conjugaison par amination réductrice peut être introduite sans aucun impact sur la réponse immunitaire induite chez des souris, évitant ainsi la purification des intermédiaires d'oxydation des
25 GMMA.

Exemple 10 - Réaction des nOMV (issues de *Neisseria meningitidis* B) avec MenC (formation du conjugué nOMV-MenC de l'invention)

30 Le polysaccharide de MenC a été solubilisé dans de l'AcONa à 100 mM pH 4,5 à la concentration de 40 mg/ml.

Le lieur ADH et le NaBH₃CN ont été ajoutés dans un rapport p/p de 1/1,2/1,2 de MenC/ADH/NaBH₃CN respectivement. Le mélange a été chauffé à 30 °C pendant une nuit, et ensuite dessalé par une colonne G10. La caractérisation par le procédé colorimétrique au TNBS et la HPAEC-PAD ont montré 100 % de dérivatisation.

Les GMMA de MenB surexprimant la fHbp, à la concentration de 8,5 mg/ml dans du NaH₂PO₄ à 100 mM pH 6, ont été incubés avec du NaIO₄ à 5 mM pendant 30 minutes à température ambiante, dans l'obscurité. L'excès de NaIO₄ a été neutralisé avec du Na₂SO₃ à une concentration finale de 10 mM, pendant 15 minutes à température ambiante. L'oligosaccharide de MenC, dérivatisé auparavant à son extrémité par le lieur ADH (rapport p/p des GMMA sur MenC de 1/10 et avec une concentration de GMMA de 7,7 mg/ml) et le NaBH₃CN ont été ajoutés directement au mélange réactionnel. Après mélange délicat pendant une nuit à température ambiante, le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min à 4 °C pendant 1 h) et remis en suspension dans du PBS. L'analyse par SDS PAGE/Western blot a confirmé la formation du conjugué et l'analyse par micro BCA et HPAEC-PAD a révélé un rapport pondéral de polysaccharide de MenC sur la protéine égal à 0,11.

25

Exemple 11 - Réaction des nOMV (issues de *Neisseria meningitidis* B) avec MenA (formation du conjugué nOMV-MenA de l'invention)

L'OS de MenA a été solubilisé dans de l'AcONa à 100 mM pH 6,5 à la concentration de 40 mg/ml. Le lieur ADH et le NaBH₃CN ont été ajoutés dans un rapport p/p de

30

1/1,2/1,2 de MenA/ADH/NaBH₃CN respectivement. Le mélange a été chauffé à 30 °C pendant 5 jours, puis dessalé par une colonne G10. La caractérisation par le procédé colorimétrique au TNBS et la HPAEC-PAD ont montré 90 %
5 de dérivatisation. La conjugaison aux GMMA de MenB surexprimant la fHbp a été effectuée comme il a été décrit pour le polysaccharide de MenC.

10 Exemple 11 - Préparation des conjugués de nOMV (issues de *Neisseria meningitidis* B) avec MenA et MenC

Les mêmes conditions de conjugaison décrites pour la synthèse des conjugués MenA et MenC-MenB-GMMA ont été utilisées pour la conjugaison des deux polysaccharides sur la même particule de GMMA. Les GMMA ont été oxydés
15 comme il a été décrit auparavant et, après neutralisation avec du Na₂SO₃, les MenA-ADH et MenC-ADH ont été ajoutés simultanément dans un rapport p/p de 8/8/1 de MenA/MenC/GMMA respectivement.

20

25

30

Liste des séquences

>SEQ ID NO : 1 [v2 de fHbp]

5 VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLLK
DKVSRFDIFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSLGG
EHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEONVELAAAELKA
DEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO : 2 [NHBA]

10 MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGGQ
APSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVAQNMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNM
LAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADGMOGDDPSAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQA
AGSSDPIPASNPAPANGGSNFRVLDLANGVLIDGPSQNILTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKS
EFEKLSADAKISNYKKDKNDKFLVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFAFRFRSARSRRSLP
AEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNRYRLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGE
MLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIIDSGDDLHMGTKQFKAAIDG
NGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD

>SEQ ID NO : 3 [NadA]

15 MKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGTI
TQKDATAADVEADDFKGLGLKVVVTLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALA
DTDAALDETTNALNKLGENITFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKA
DEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIA
TNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETROGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESA
VAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVGVNYEW

20 >SEQ ID NO : 4 [NspA]

MKKALATLIALALPAAALAEGASGFYVQADAAHAKASSSLGSAKGFSPRISAGYRINDLRFVVDY
TRYKNYKAPSTDFKLYSIGASAIYDFDTQSPVKPYLGARLSLNRASVDLGGSDSFSQTSIGLGLV
TGVSYAVTPNVDLDAGYRYNYIGKVNTVKNVRSAGSAGVRVKF

>SEQ ID NO : 5 [NhhA]

25 MNKIYRIIWNALNAWVVVSELTRNHTKRASATVKTAVLATLLFATVQASANNEEQEEDLYLDP
VQRTVAVLIVNSDKEGTGEKEKVEENSOWAVYFNEKGVLTAREITLKAGDNLKIKQNGTNFTYS
LKKDLTDLTSVGTEKLSFANGNKVNITSDTKGLNFAKETAGTNGDTTVHLNGIGSTLTDLLNT
GATTNVTNDNVTDDEKKRAASVKDVLNAGWNIKGVKPGTTASDNVDFVRTYDVEFLSADTKT
TTVNVESKDNGKTEVKIGAKTSVIKEKDGKLVTKGDKGENGSSTDEGEGLVTAKEVIDAVNKA
GWRMKTITANGQTGQADKFETVTSNTVTFASGKGTATVSKDDQGNITVMYDVNVGDALNV
NQLQNSGWNLDKAVAGSSGKVISGNVSPSKGKMDETVNINAGNNIEITRNGKNIDIATSMTPQ
FSSVSLGAGADAPTLSDGDALNVGSKKDNKPVRIITNVAPGVKEGDVTNVAQLKQVAQNLNN
RIDNVDGNARAGIAQAIATAGLVQAYLPGKSMMAIGGGTYRGEAGYAIGYSSISDGGNWIIGT
30 ASGNSRGHFGASASVGYQW

>SEQ ID NO : 6 [App]

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYYRDFEAENKGGKF
 AVGAKDIEVYNKKGELVKGSMKAPMIDFSVSRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNNVDFGAE
 GRNPDOHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAPVEMTSYMDGRKYIDQN
 NYPDRVRIGAGRQYWRSEDEPNNRESSYHIASAYSWLVGGNTFAQNGSGGGTVNLGSEKIK
 HSPYGFLLPTGGSFGDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQTNPNYIGKSNQFQLVRKDFYDEIFA
 5 GDTHSVFYEPQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYH
 AAGGVNSYRPRLNNGENISFIDEGKGELILTSNINOGAGGLYFQGDFTVSPENNETWQGAGVHI
 SEDSTVTWKVNGVANDRLSKIGKGLHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQQADDKGGKQAFSEI
 GLVSGRGTVQLNADNQFNPKLYFGFRGGRLDLNGHSLSFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKEST
 VTITGNKDIATTGNNNSLDSKKEIAYNGWFGEKDTTKNGRLNLVYQPAEDRTLSSGGTNLN
 GNITQTNKGLFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAV
 VSRNVAKVKGDWHLNSNHAQAVFGVAPHQSHTICTRSOWTGLTNCVEKTITDDKVIASLTKTDIS

GNVDLADHAHLNLTGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNT
 SASGNASFNLSDHAVQNGSLTSGNAKANVSHSALNGNVSLADKAVFHFESSRFTGQISGGKD
 10 TALHLKQSEWTLPSGTELGNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRLS
 VTPPTSVESRFNLTVNGKLNQOGTFRFMSELFYGRSDKLLAESSEGYTLAVNNTGNEPAS
 LEQLTVVEGKDNKPLSENLFNLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGFEFRLHNPVKEQELSDKLGKAE
 AKKQAEKDNAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGIMQAEKRVQADKDTALA
 KQREAETRPATTAFPRARRARRDLPLQLPQPQPQRDLISRYANGLSEFSATLNSVFAVQD
 ELDRVFAEDRRNAVWTSGIRDTKHYRSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGSGRVGLFSHNRT
 ENTFFDDGIGNSARLAHGAVFGQYGIDRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRVLYHYIQARYR
 AGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPYLSLS
 YTDAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAAGKGPQLEAQHSAGIKL
 15 GYRW

>SEQ ID NO : 7 [fragment de NadA]

ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKK
 VVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTF
 AEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNV
 20 AKVKAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKDNIKKANSADVTTREESD
 SKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEXIADHDTRLNGLDKTVSOLRKETRQGLAEQAALSGLFQP
 YNVG

>SEQ ID NO : 8 [v1 de fHbp]

VAADIGAGL ADALTAPLDH KDKGLQSLTL DQSVRKNEKL KLAAGGAECT YGNGDSLNTG
 KLKNDKVSFRFDFIRQIEVDG QLITLESGEF QVYKQSHSAL TAFQTEIQD SEHSGKMPVAK
 RQFRIGDIAG EHTSFDKLE GGRATYRGTA FGSDDAGGKL TYTIDFAAQ GNGKIEHLKS
 25 PELNVDLAAA DIKPDGKRHA VISGSVLYNQ AEKGSYSLGI FGGKAEVAG SAEVKTVNGI
 RHIGLAAKQ

>SEQ ID NO : 9 [v3 de fHbp]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTSLAAGGAECTFKAGDKDNSLNTGKL
 KNDKISRDFVQKIEVDGQTITLASGEFQYKQNHSAVVALQIEKINNPKDTSLINQRSFLVSGL
 30 GGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTTKQGYGRIEHLKLEQNVLAAAEL
 KADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO : 10 [Pfs25]

KVTVDTVCKR GFLIQMSGHL ECKCENDLVL VNEETCEEKV LKCDEKTVNK PCGDFSKCIK
IDGNPVSAC KCNLYDMVN NVCIPNECKQ VTCGNGKCIL DTSNPVKTGV CSCNIGKVPN
VQDQNKCSKD GETKCSLKCL KEQETCAVD GIYKCDCKDG FIIDQESSIC T

5 >SEQ ID NO : 11 [RO6C]

AERSTSENRNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIRGSNDKLNKNSDEVLEQSEKSLVSENV
PSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNGSKNESSDIISENNKS NKVQNH
ESLSDLELLENSSDNLDKDTISTEPPFNQKHKDLQQLNDEPLEFPPTQIHKDYKEKNLINEED
SEPFPRQKHKKVDNHNHEEKNVFHENGSAANGQGSLLKSFDEHLKDEKIENEPLVHENLSIPN
DPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPSLDLKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEIN
HVQDHALPKENIIDKLDNQEHEIDQSQHNINVLQENNINNHQLEPOEKPNIESFEPKNIDSEILPE
NVETEEIIDVPSPKHSNHETFEETSESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDG
NVSQNSNNELNENEFVESEKSEHEARSKPKYEKKVIHGCFSSNVSSKHTFTDSDLISLVDDSA
10 HISCNVHLSEPKYNHLVGLNCPGDIIPDCFFQVYQPESEELEPSNIVYLDQINIGDIIEYEDAE
DDKIKLFGIVGSIPKTTSTFCICKKDKKSAYMTVTIDSARSHHHHHH

>SEQ ID NO : 12 [CSP]

MLFQEYQCYGSSSNTRVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENWYSLKKNSRSLGENDDG
NNNNGDNGREGKDEDKROGNNEDNEKLRKPKHKKLKQPGDGNPDPNANPNVDPNANPNVD
15 PNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN
NANPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNAN
ANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNKNNQGNGQGHNMPNDPNRVNDEANANNAVKN
NNNEEPSDKHIEKYLKQISLSTEWSPCSVTGNGIQVRIKPGSANKPKDELDYENDIEKKICK
MEKCSVFNVNVSSIGLILEHHHHHH

>SEQ ID NO : 13 [(NANP)₃]

20 NANPNANPNANP

>SEQ ID NO : 14 [CTF1232]

QDQRYISIRNTDTIWLPGNICAYQFRLDNNGNDEGFGLTITLQLKDKYQTLVTRKMETEAFG
DSNATRRTTDAFLETECVENVATTEIHKATEESNGHRVSLPLSVFDPQDYHPLLITVSGKNVNL
25 HHHHH

30

REVENDICATIONS

1. Conjugué immunogène comprenant une vésicule de membrane externe native (nOMV), comportant au moins une
5 fraction saccharidique de surface connectée à au moins un antigène.

2. Conjugué immunogène selon la revendication 1, comprenant une nOMV comportant au moins une fraction saccharidique de surface connectée à un premier antigène,
10 dans lequel ledit premier antigène est connecté à un second antigène différent.

3. Conjugué immunogène selon la revendication 1, comprenant une nOMV comportant au moins une fraction saccharidique de surface connectée à un premier antigène,
15 et au moins une autre fraction saccharidique de surface connectée à un second antigène différent.

4. Conjugué immunogène selon les revendications 1 à 3, dans lequel ladite nOMV est obtenue par un procédé dépourvu de détergent, étant libérée dans le bouillon de
20 fermentation et purifiée en utilisant une centrifugation et une filtration subséquente ; ou étant libérée dans le bouillon de fermentation et purifiée en utilisant deux étapes consécutives de filtration à flux tangentiel (FFT).

25 5. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ladite nOMV est produite à partir de bactéries de type sauvage ou à partir de souches bactériennes modifiées génétiquement qui sont mutées pour amplifier la production de vésicules, et
30 éventuellement aussi pour éliminer ou modifier des antigènes et/ou pour surexprimer des antigènes

homologues ou des antigènes provenant d'autres organismes.

6. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ladite nOMV est obtenue à partir
 5 d'une bactérie choisie parmi : *Neisseria*, *Shigella*, des sérovars de *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis BCG*, *Escherichia coli*, *Bacteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*,
 10 *Brucella melitensis* *Campylobacter jejuni*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Xenorhabdus nematophilus*, *Moraxella catarrhalis*, ou *Borrelia burgdorferi*.

7. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel l'antigène est un polypeptide
 15 immunogène ou un polysaccharide capsulaire.

8. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ladite nOMV et l'antigène sont dérivés de la même souche bactérienne ou de souches bactériennes différentes.

20 9. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ladite nOMV et au moins un antigène sont choisis comme suit :

nOMV	Antigène choisi
<i>Salmonella typhimurium</i>	fHbp de <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	CSP de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	Pfs25 de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	RO6C de <i>Plasmodium falciparum</i>

<i>Salmonella typhimurium</i>	RO10C de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	CTF1232 d' <i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	Saccharide Vi de <i>S. typhimurium</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	fHbp de <i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	Oligosaccharide poly-rhamnose
<i>Shigella</i>	CTF1232 d' <i>Escherichia coli</i>
<i>Neisseria meningitidis B</i>	Saccharide capsulaire de <i>MenA</i>
<i>Neisseria meningitidis B</i>	Saccharide capsulaire de <i>MenC</i>

10. Conjugué immunogène selon la revendication 9, dans lequel ladite nOMV et au moins un antigène sont choisis comme suit :

5

nOMV	Antigène choisi
<i>Neisseria meningitidis B</i>	Saccharide capsulaire de <i>MenA</i>
<i>Neisseria meningitidis B</i>	Saccharide capsulaire de <i>MenC</i>

11. Conjugué immunogène selon la revendication 2, dans lequel ledit premier antigène est la Pfs25, et ledit second antigène est le (NANP)₃.

10

12. Conjugué immunogène selon la revendication 11, dans lequel la nOMV est obtenue à partir de *Salmonella typhimurium*.

13. Conjugué immunogène selon la revendication 2, dans lequel ledit premier antigène est un saccharide capsulaire issu de MenA, et ledit second antigène est un saccharide capsulaire issu de MenC.

5 14. Conjugué immunogène selon la revendication 13, dans lequel la nOMV est obtenue à partir d'une souche de *Meningococcus* du sérogroupe B, exprimant de préférence les v1 et 2 de fHbp.

10 15. Conjugué immunogène selon les revendications 1 à 14, dans lequel la fraction saccharidique de la nOMV et le au moins un antigène sont connectés ensemble par l'intermédiaire d'un lieu bivalent.

15 16. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ladite nOMV est une vésicule GMMA.

17. Procédé de préparation du conjugué immunogène selon les revendications 1 à 16, comprenant les étapes suivantes :

20 i) l'activation d'au moins une fraction saccharidique de surface de la nOMV, et

ii) la connexion du saccharide activé ainsi obtenu à au moins un antigène, éventuellement par l'intermédiaire d'un lieu bivalent.

25 18. Procédé selon la revendication 17, dans lequel l'étape d'activation i) comprend l'oxydation d'un ou de plusieurs groupes hydroxyle de ladite fraction saccharidique de ladite nOMV en fonctionnalité aldéhyde.

30 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18 en présence d'un bisulfite alcalin.

20. Composition immunogène comprenant un conjugué immunogène selon les revendications 1 à 16 et au moins un support ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

5 21. Conjugué ou composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 ou 20, pour une utilisation en tant que médicament.

22. Conjugué ou composition immunogène pour une utilisation selon la revendication 21 pour induire une réponse immunitaire chez un vertébré.

10 23. Vaccin comprenant le conjugué ou la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 ou 20.

24. Utilisation de nOMV pour la préparation de conjugués immunogènes.

15 25. Utilisation de nOMV selon la revendication 24, où lesdits conjugués immunogènes sont tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 16.

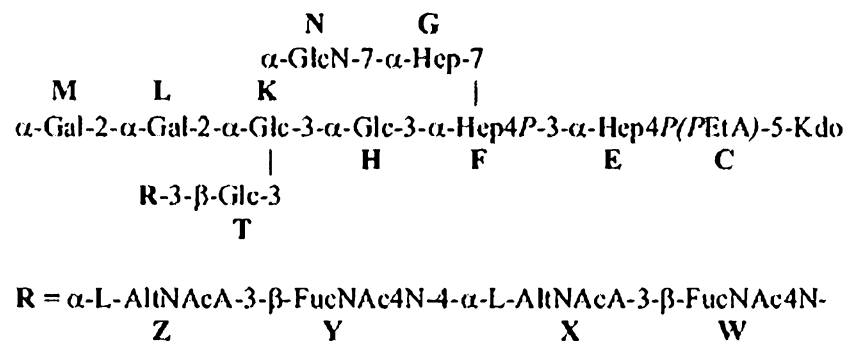


FIG. 1

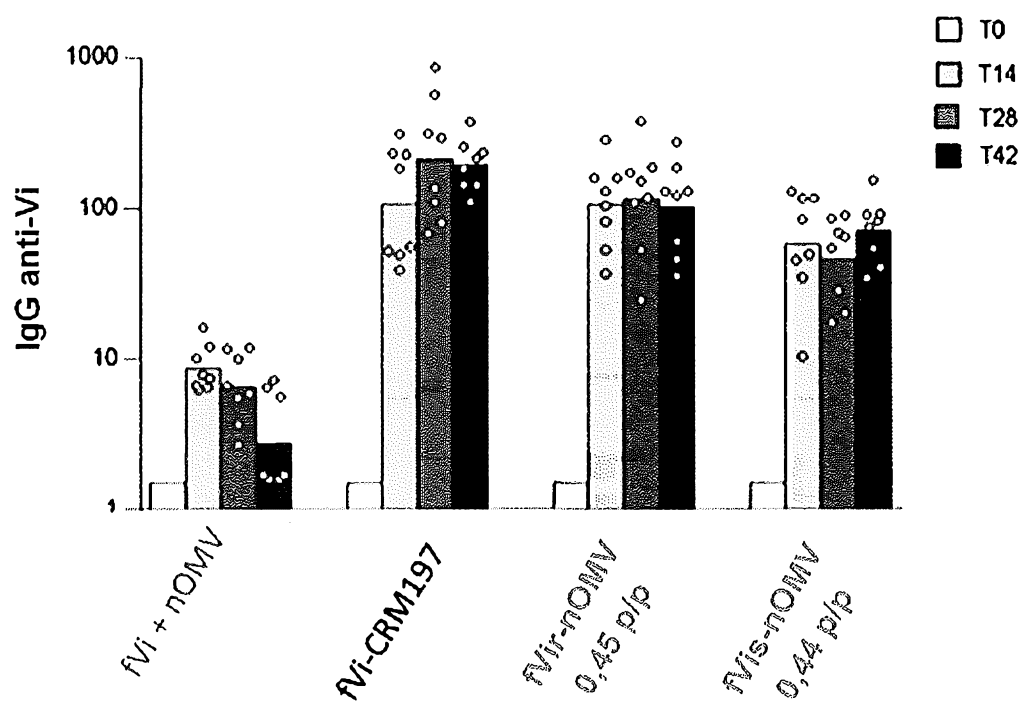


FIG. 2A

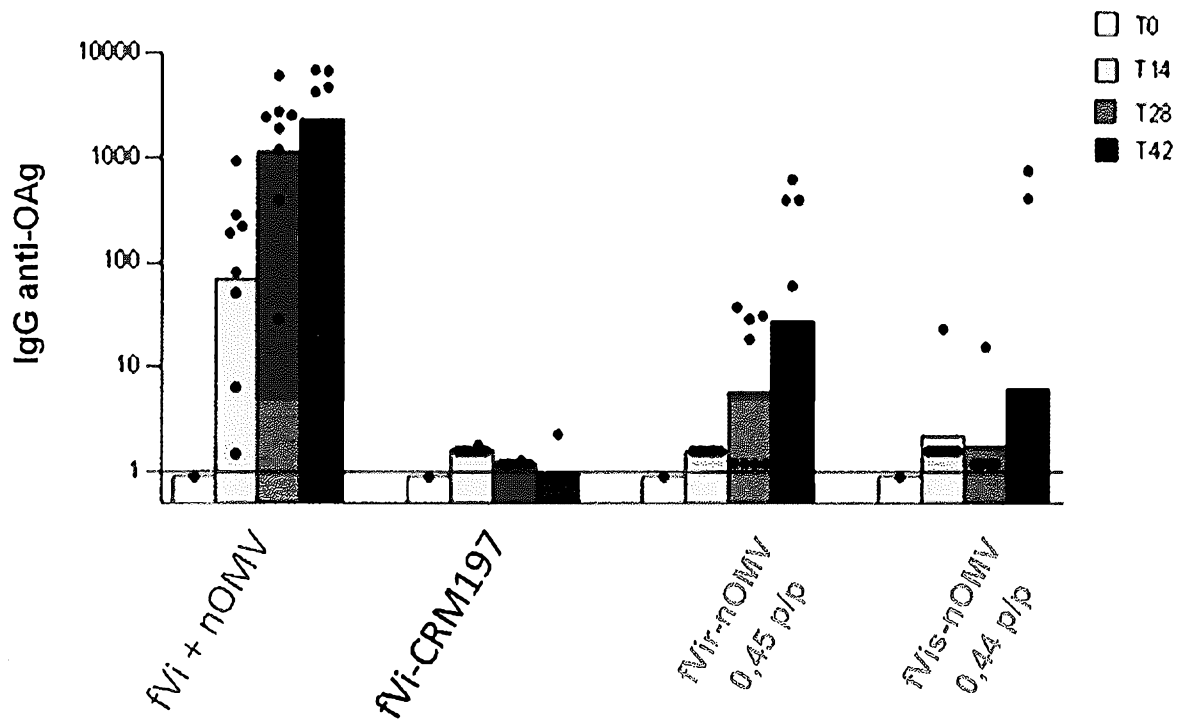


FIG. 2B

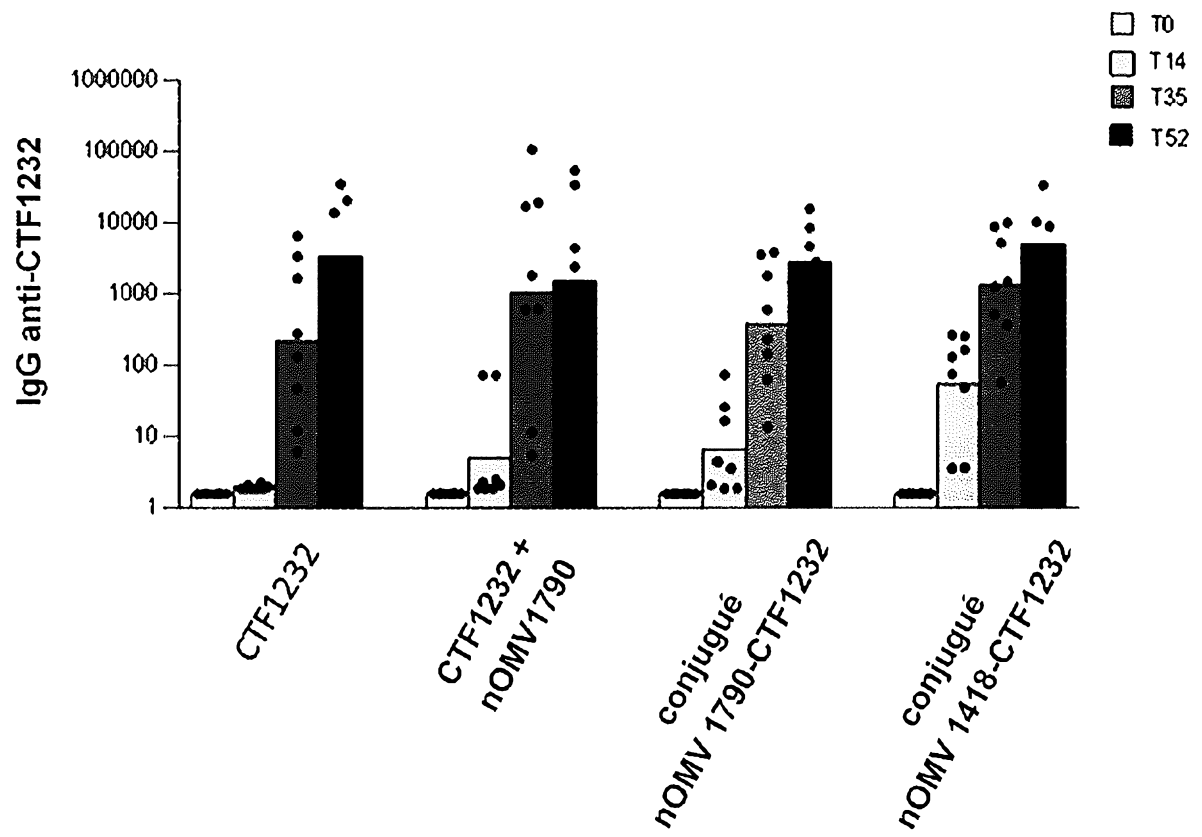


FIG. 3

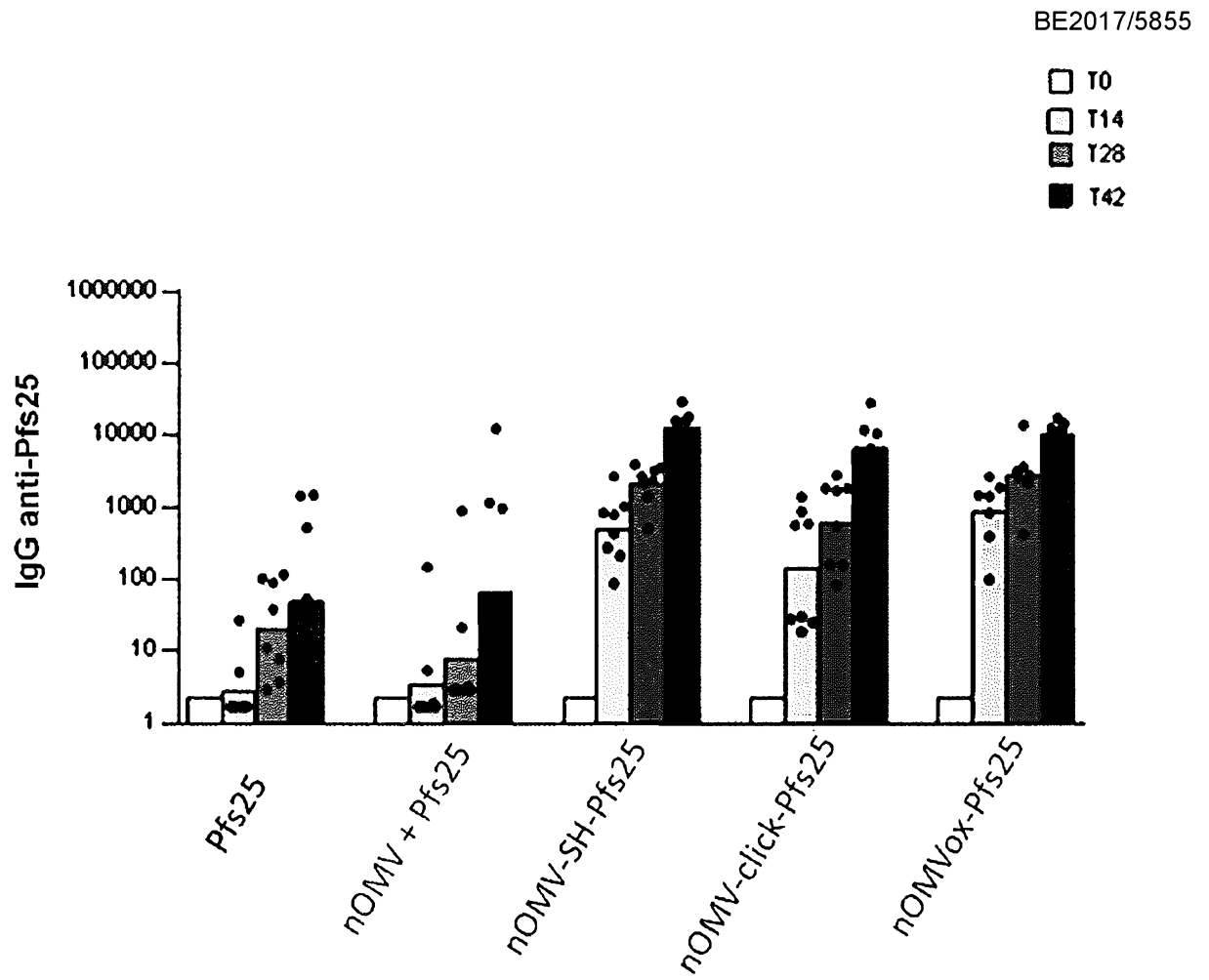


FIG. 4A

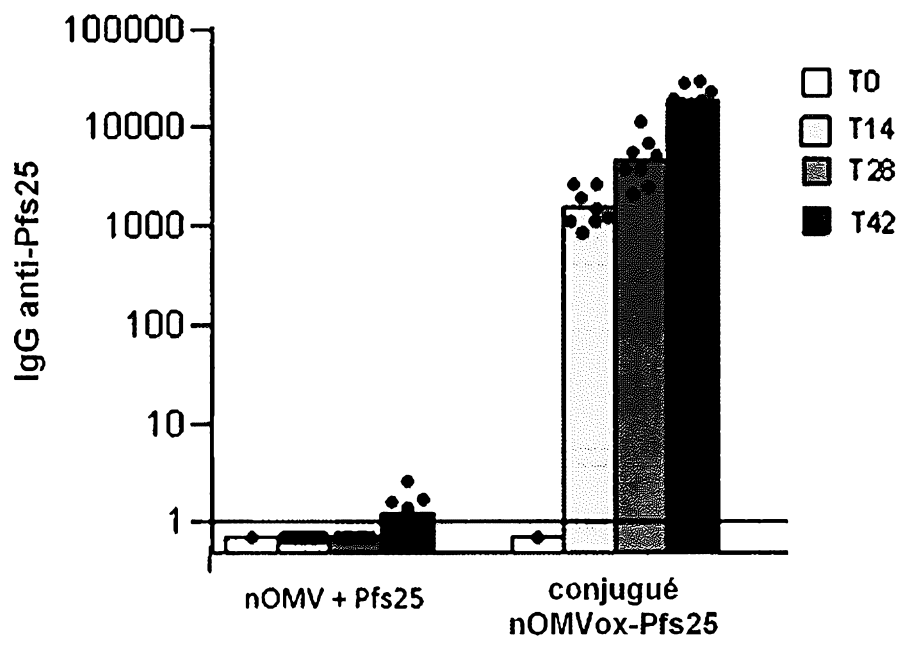


FIG. 4B

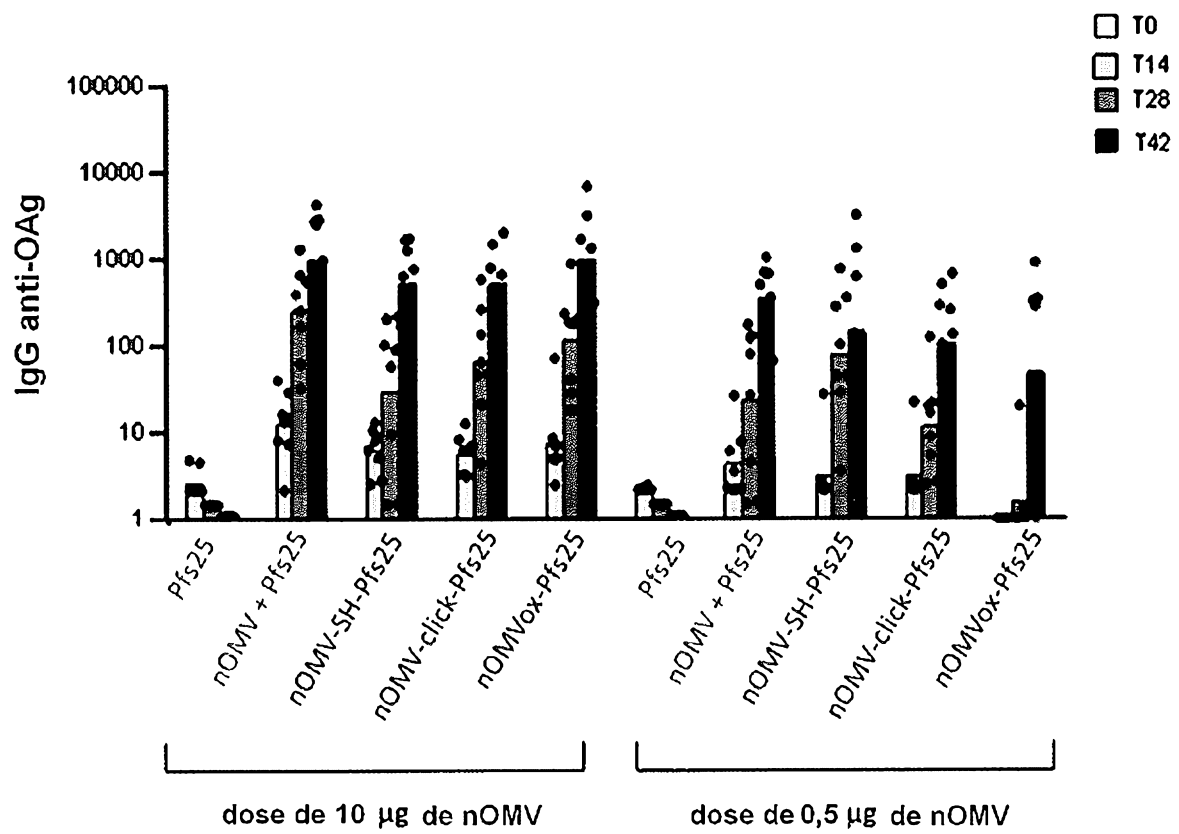


FIG. 4C

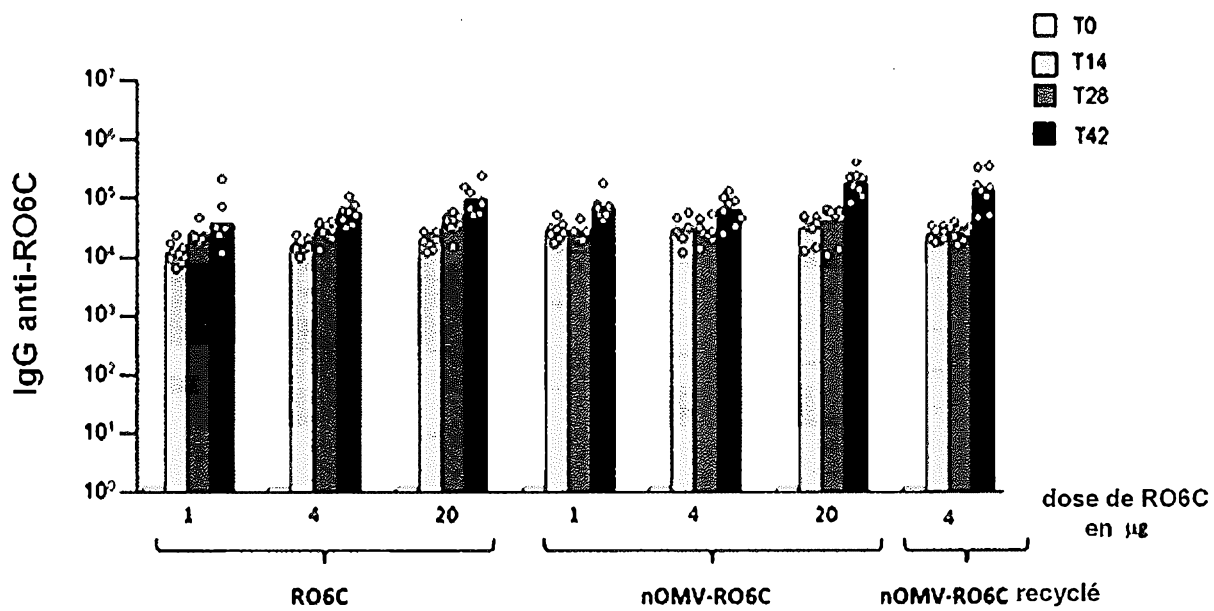


FIG. 5A

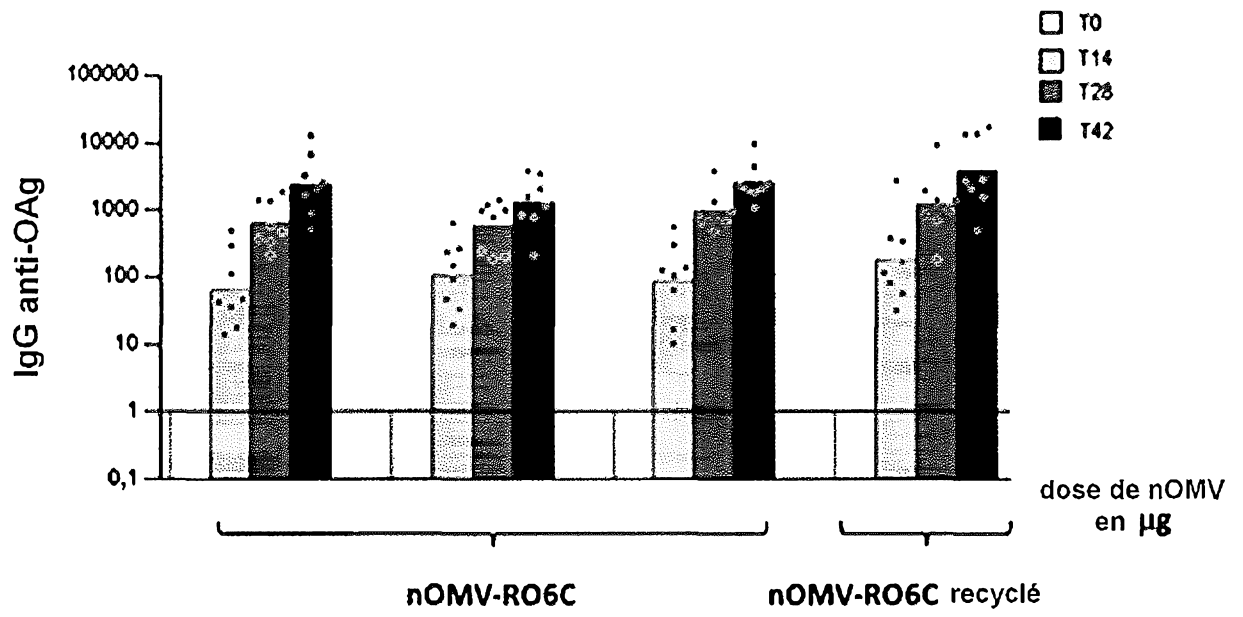


FIG. 5B

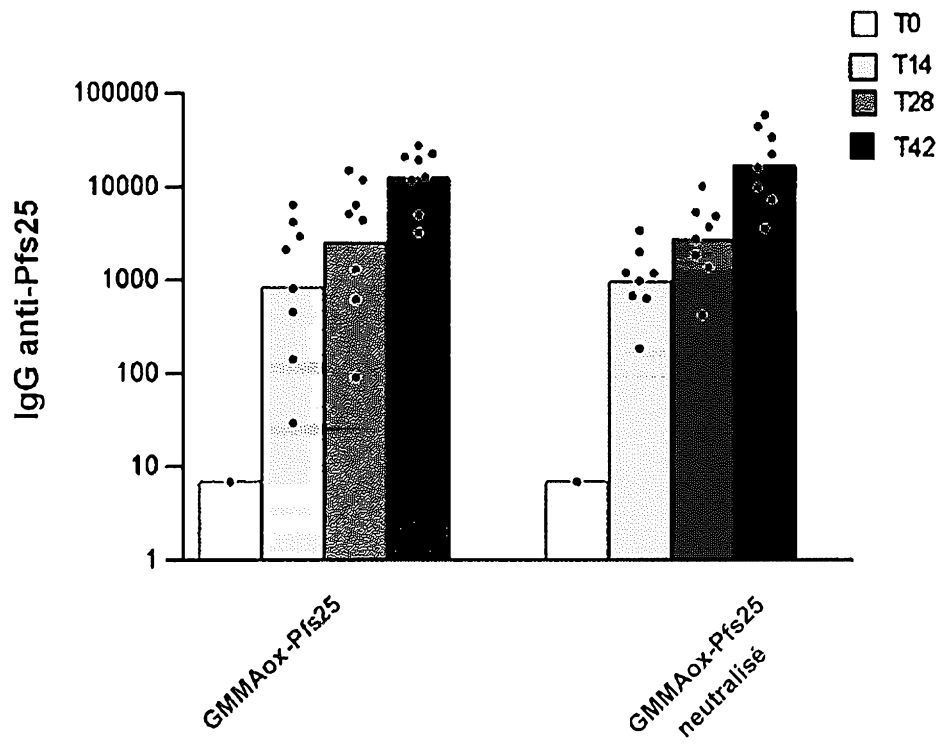


Fig. 6A

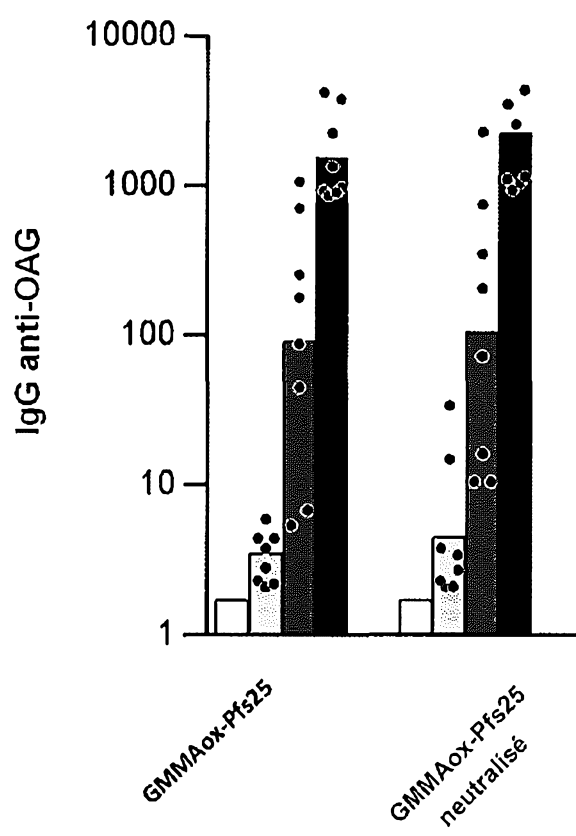


FIG. 6B



Numero de la demande nationale

RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
 du Code de droit économique belge

BO 11588
 BE 201705855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	SEYED DAVAR SIADAT ET AL: "Preparation and Evaluation of a New Lipopolysaccharide-based Conjugate as a Vaccine Candidate for Brucellosis", OSONG PUBLIC HEALTH AND RESEARCH PERSPECTIVES,, vol. 6, no. 1, 1 février 2015 (2015-02-01), pages 9-13, XP009503435, ISSN: 2210-9099, DOI: 10.1016/J.PHRP.2014.10.012 [extrait le 2014-12-18] * résumé, p. 10 colonne de droite dernier paragraphe en entier - p. 11 colonne de gauche dernier paragraphe en entier, discussion et Tableau 1 *	1-25	INV. A61K39/00 A61K39/095 A61K39/116 A61K39/385 A61K39/108 A61K39/112 A61K39/04 A61K39/05 A61K39/02 A61K39/015
Y	S. D. SIADAT ET AL: "Evaluation of Serum Bactericidal Activity Specific for Neisseria meningitidis Serogroup A and B: Effect of Immunization with Neisseria meningitidis Serogroup A Polysaccharide and Serogroup B Outer Membrane Vesicle Conjugate as a Bivalent Meningococcus Vaccine Candidate", RESEARCH JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 2, no. 5, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 436-444, XP055478324, * résumé, p. 437 dernière 2 lignes - p. 438 deuxième paragraphe entier, p. 439 premier paragraphe entier, p. 441 premier paragraphe entier - p. 442 premier paragraphe entier et fig. 2 *	1-25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 mai 2018		Hermann, Patrice	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)



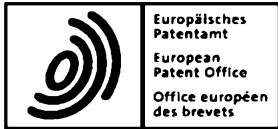
Numero de la demande nationale

RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
 du Code de droit économique belge

BO 11588
 BE 201705855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	<p>DEVI S J N ET AL: "Binding diversity of monoclonal antibodies to alpha(2-->8) polysialic acid conjugated to outer membrane vesicle via adipic acid dihydrazide", FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 14, no. 4, 1 juillet 1996 (1996-07-01), pages 211-220, XP002315243, ISSN: 0928-8244 * résumé, p. 212 colonne de droite premier paragraphe entier - p. 213 colonne de gauche ligne 11, p. 214 colonne de gauche 2 dernières lignes - p. 218 colonne de gauche trois premières lignes, Tableaux 1-4 et Fig. 1-3 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25	
Y	<p>DEVI S J N ET AL: "PRECLINICAL EVALUATION OF GROUP B NEISSERIA MENINGITIDIS AND ESCHERICHIA COLI K92 CAPSULAR POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE VACCINES IN JUVENILE RHESUS MONKEYS", INFECTION AND IMMUNITY,, vol. 65, no. 3, 1 mars 1997 (1997-03-01), pages 1045-1052, XP000872520, ISSN: 0019-9567 * résumé, p. 1046 colonne de gauche deuxième et troisième paragraphes entiers, p. 1047 colonne de droite premier paragraphe entier - p. 1048 colonne de droite premier paragraphe entier, tableaux 1-3 et Fig. 1 et 2 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-25	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 mai 2018		Hermann, Patrice	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>..... & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
 EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)



RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
 du Code de droit économique belge

BO 11588
 BE 201705855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	<p>W D Zollinger ET AL: "Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B Neisseria meningitidis capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines", Infection and Immunity, 1 mars 1997 (1997-03-01), pages 1053-1060, XP055478620, UNITED STATES Extrait de l'Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC175087/pdf/651053.pdf * résumé, p. 1054 colonne de gauche deuxième et troisième paragraphes entiers, p. 1055 colonne de gauche premier paragraphe entier - p. 1058 colonne de gauche premier paragraphe entier, Tableaux 1-3 et fig. 1-3 *</p>	1-25	
Y	<p>----- LUCILA O FUKASAWA ET AL: "Adjuvant can improve protection induced by OMV vaccine against Neisseria meningitidis serogroups B/C in neonatal mice", FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY., vol. 41, no. 3, 1 juillet 2004 (2004-07-01), pages 205-210, XP055478327, NL ISSN: 0928-8244, DOI: 10.1016/j.femsim.2004.03.005 * résumé, p. 206 colonne de gauche 11 dernières lignes - colonne de droite premier paragraphe entier, résultats et discussion, Tableaux 1 et 2 *</p> <p>----- -/--</p>	1-25	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 mai 2018		Hermann, Patrice	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>----- & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
 EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)



RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
 du Code de droit économique belge

BO 11588
 BE 201705855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	FUKASAWA LUCILA O ET AL: "OPTIMIZATION OF THE CONJUGATION METHOD FOR A SEROGROUP B/C MENINGOCOCCAL VACCINE", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMI, ACADEMIC PRESS, US, vol. 45, no. PT3, 1 octobre 2006 (2006-10-01), pages 141-146, XP009081494, ISSN: 0885-4513 * résumé, p. 142 colonne de gauche dernier paragraphe entier - colonne de droite deuxième paragraphe entier, Tableaux 1 et 2 et Fig. 1 *	1-25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
Y	ALI FARJAH ET AL: "Immunological evaluation of an alginate-based conjugate as a vaccine candidate against Pseudomonas aeruginosa", ACTA PATHOLOGICA, MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA SCANDINAVICA, vol. 123, 3 décembre 2014 (2014-12-03), pages 175-183, XP055478624, * résumé, p. 176 colonne de droite deuxième paragraphe entier - p. 177 colonne de gauche ligne 9, p. 178 colonne de gauche dernier paragraphe - p. 180 colonne de gauche ligne 11 et Fig. 1-5 *	1-25	
Y	WO 2013/006055 A1 (NEDERLANDEN STAAT [NL]; VAN DE WATERBEEMD BAS [NL]; VAN DER POL LEONAR) 10 janvier 2013 (2013-01-10) * résumé, p. 2 ligne 6 - p. 3 ligne 15, p. 11 ligne 16 - p. 18 ligne 30, exemples et revendications *	1-25	
		----- -/--	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		29 mai 2018	Hermann, Patrice
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)



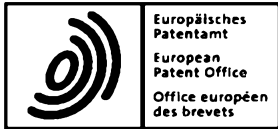
Numero de la demande nationale

RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
 du Code de droit économique belge

BO 11588
 BE 201705855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	ZHANG LAN ET AL: "Improving the immunogenicity of a trivalent <i>Neisseria meningitidis</i> outer membrane vesicle vaccine by genetic modification", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 35, 2 juillet 2016 (2016-07-02), pages 4250-4256, XP029644903, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2016.05.049 * résumé, p. 4250 colonne de droite 5 dernières lignes - p. 4251 dernier paragraphe entier, matériel et méthodes (section matériel en supplément), le paragraphe reliant la p. 4253 à la p. 4254 - p. 4254 colonne de droite ligne 34, p. 4255 colonne de droite premier paragraphe entier, Tableaux 1-3 et fig. 1-4 * -----	1-25	
Y	WO 2016/184860 A1 (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRENTO [IT]) 24 novembre 2016 (2016-11-24) * résumé, p. 4 ligne 24 - p. 7 ligne 6, p. 18 ligne 27 - p. 25 ligne 8, p. 37 ligne 24 - p. 69 ligne 28 et revendications * ----- -/--	1-25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 mai 2018		Hermann, Patrice	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	

1
 EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)



Numero de la demande nationale

RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
 du Code de droit économique belge

BO 11588
 BE 201705855

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Y	NATHAN J ALVES ET AL: "Emerging therapeutic delivery capabilities and challenges utilizing enzyme/protein packaged bacterial vesicles", THERAPEUTIC DELIVERY, vol. 6, no. 7, 1 juillet 2015 (2015-07-01), pages 873-887, XP55386958, GB ISSN: 2041-5990, DOI: 10.4155/tde.15.40 * résumé, p. 878 colonne de gauche dernier paragraphe - p. 883 colonne de gauche premier paragraphe, le paragraphe reliant la p. 883 à la p. 884, Fig. 4 et 5 et Tableau 1 *	1-25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
A	NANCY L. PRICE ET AL: "Glycoengineered Outer Membrane Vesicles: A Novel Platform for Bacterial Vaccines", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 22 avril 2016 (2016-04-22), XP055478616, DOI: 10.1038/srep24931 * le document en entier *	1-25	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 mai 2018		Hermann, Patrice	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1
 EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

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

B0 11588
BE 201705855

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

29-05-2018

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2013006055 A1	10-01-2013	AU 2012278407 A1	16-01-2014
		CA 2840096 A1	10-01-2013
		CN 103687612 A	26-03-2014
		DK 2729167 T3	30-04-2018
		EP 2729167 A1	14-05-2014
		IL 230326 A	29-03-2018
		JP 6002763 B2	05-10-2016
		JP 2014520801 A	25-08-2014
		NZ 618918 A	30-10-2015
		RU 2014104241 A	20-08-2015
		US 2014147469 A1	29-05-2014
		US 2016303214 A1	20-10-2016
		WO 2013006055 A1	10-01-2013
		WO 2016184860 A1	24-11-2016
EP 3298031 A1	28-03-2018		
WO 2016184860 A1	24-11-2016		



OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11588	Date du dépôt (<i>jour/mois/année</i>) 23.11.2017	Date de priorité (<i>jour/mois/année</i>) 25.11.2016	Demande n° BE201705855
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/00 A61K39/095 A61K39/116 A61K39/385 A61K39/108 A61K39/112 A61K39/04 A61K39/05 A61K39/02 A61K39/015			
Déposant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA			

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

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

	Examineur Hermann, Patrice
--	-------------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201705855

Cadre n° I Base de l'opinion

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

voir feuille séparée

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	1-25
	Non :	Revendications	
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-25
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-25
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Ad point I

Base du rapport

Les séquences nucléotidiques et peptidiques référencées sous les numéros SEQ ID NO 1-14, fournies dans la liste de séquences sont incluses dans la base de cette opinion écrite.

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 Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 SEYED DAVAR SIADAT ET AL: "Preparation and Evaluation of a New Lipopolysaccharide-based Conjugate as a Vaccine Candidate for Brucellosis", OSONG PUBLIC HEALTH AND RESEARCH PERSPECTIVES, vol. 6, no. 1, 1 février 2015 (2015-02-01), pages 9-13, XP009503435
- D2 S. D. SIADAT ET AL: "Evaluation of Serum Bactericidal Activity Specific for Neisseria meningitidis Serogroup A and B: Effect of Immunization with Neisseria meningitidis Serogroup A Polysaccharide and Serogroup B Outer Membrane Vesicle Conjugate as a Bivalent Meningococcus Vaccine Candidate", RESEARCH JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 2, no. 5, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 436-444, XP055478324
- D3 DEVI S J N ET AL: "Binding diversity of monoclonal antibodies to alpha(2--8) polysialic acid conjugated to outer membrane vesicle via adipic acid dihydrazide", FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 14, no. 4, 1 juillet 1996 (1996-07-01), pages 211-220, XP002315243
- D4 DEVI S J N ET AL: "PRECLINICAL EVALUATION OF GROUP B NEISSERIA MENINGITIDIS AND ESCHERICHIA COLI K92 CAPSULAR POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE VACCINES IN JUVENILE RHESUS MONKEYS", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 3, 1 mars 1997 (1997-03-01), pages 1045-1052, XP000872520

- D5 W D Zollinger ET AL: "Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B Neisseria meningitidis capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines", Infection and Immunity, 1 mars 1997 (1997-03-01), pages 1053-1060, XP055478620
- D6 LUCILA O FUKASAWA ET AL: "Adjuvant can improve protection induced by OMV vaccine against Neisseria meningitidis serogroups B/C in neonatal mice", FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY., vol. 41, no. 3, 1 juillet 2004 (2004-07-01), pages 205-210, XP055478327
- D7 FUKASAWA LUCILA O ET AL: "OPTIMIZATION OF THE CONJUGATION METHOD FOR A SEROGROUP B/C MENINGOCOCCAL VACCINE", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMI, ACADEMIC PRESS, US, vol. 45, no. PT3, 1 octobre 2006 (2006-10-01), pages 141-146, XP009081494
- D8 ALI FARJAH ET AL: "Immunological evaluation of an alginate-based conjugate as a vaccine candidate against Pseudomonas aeruginosa", ACTA PATHOLOGICA, MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA SCANDINAVICA, vol. 123, 3 décembre 2014 (2014-12-03), pages 175-183, XP055478624
- D9 WO 2013/006055 A1 (NEDERLANDEN STAAT [NL]; VAN DE WATERBEEMD BAS [NL]; VAN DER POL LEONAR) 10 janvier 2013 (2013-01-10)
- D10 ZHANG LAN ET AL: "Improving the immunogenicity of a trivalent Neisseria meningitidis native outer membrane vesicle vaccine by genetic modification", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 35, 2 juillet 2016 (2016-07-02), pages 4250-4256, XP029644903
- D11 WO 2016/184860 A1 (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRENTO [IT]) 24 novembre 2016 (2016-11-24)
- D12 NATHAN J ALVES ET AL: "Emerging therapeutic delivery capabilities and challenges utilizing enzyme/protein packaged bacterial vesicles", THERAPEUTIC DELIVERY, vol. 6, no. 7, 1 juillet 2015 (2015-07-01), pages 873-887, XP55386958

D13 NANCY L. PRICE ET AL: "Glycoengineered Outer Membrane Vesicles: A Novel Platform for Bacterial Vaccines", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 22 avril 2016 (2016-04-22), XP055478616

2 Les documents D1 à D8, chacun étant pris séparément en considération, décrivent tous des vésicules de membrane externes (OMV) sur lesquelles ont été conjugué des antigènes saccharidiques. Ces conjugués sont ensuite utilisés dans des compositions vaccinales qui sont dites polyvalentes puisqu'elles permettent l'obtention d'une réponse immunitaire non seulement contre les antigènes ainsi présentés mais aussi contre les antigènes présents de façon naturelle à la surface des OMV.

2.1 Le document D1 par exemple décrit des antigènes lipopolysaccharidiques dérivés de *Brucella abortus* S99 conjugués sur des OMV provenant de *Nesseiria meningitidis* de séro groupe B puis l'immunisation de souris par voie sous-cutanée avec les conjugués ainsi obtenus (cf. D1 résumé, p. 10 colonne de droite dernier paragraphe en entier - p. 11 colonne de gauche dernier paragraphe en entier, discussion et Tableau 1).

2.2 Le document D2 par exemple décrit des antigènes polysaccharidiques de capsule méningococciques de séro groupe A conjugués sur des OMV provenant de *Nesseiria meningitidis* de séro groupe B puis l'immunisation de lapins par voie intramusculaire avec les conjugués ainsi obtenus (cf. D2 résumé, p. 437 dernière 2 lignes - p. 438 deuxième paragraphe entier, p. 439 premier paragraph entier, p. 441 premier paragraphe entier - p. 442 premier paragraph entier et fig. 2).

2.3 Les documents D3 et D4 par exemple décrivent des antigènes polysaccharidiques de capsule méningococciques de séro groupe B modifiés conjugués sur des OMV provenant de *Nesseiria meningitidis* de séro groupe B puis l'immunisation soit de souris par voie intra-péritonéale (D3) soit de singes rhésus juvéniles par voie intramusculaire (D4 et D5) avec les conjugués ainsi obtenus (cf. D3 résumé, p. 212 colonne de droite premier paragraphe entier - p. 213 colonne de gauche ligne 11, p. 214 colonne de gauche 2 dernières lignes - p. 218 colonne de gauche trois premières lignes, Tableaux 1-4 et Fig. 1-3; D4 résumé, p. 1046 colonne de gauche deuxième et troisième paragraphes entiers, p. 1047 colonne de droite premier paragraphe entier - p. 1048 colonne de droite premier paragraphe entier, tableaux 1-3 et Fig. 1 et 2; D5 résumé, p. 1054 colonne de gauche deuxième et troisième

- paragraphs entiers, p. 1055 colonne de gauche premier paragraphe entier - p. 1058 colonne de gauche premier paragraphe entier, Tableaux 1-3 et fig. 1-3).
- 2.4 Les document D6 et D7 par exemple décrivent des antigènes polysaccharidiques de capsule méningococciques de séro groupe C conjugués sur des OMV provenant de *Nesseiria meningitidis* de séro groupe B puis l'immunisation soit de souris néonatales (D6) soit de souris adultes (D7) par voie intrapéritonéale avec les conjugués ainsi obtenus (cf. D6 résumé, p. 206 colonne de gauche 11 dernières lignes - colonne de droite premier paragraphe entier, résultats et discussion, Tableaux 1 et 2; et D7 résumé, p. 142 coonne de gauche dernier paragraphe entier - colonne de droite deuxième paragraphe entier, Tableaux 1 et 2 et Fig. 1).
- 2.5 Le document D8 par exemple décrit de l'alginate conjugué sur des OMV provenant de *Nesseiria meningitidis* de séro groupe B puis l'immunisation de souris par voie sous-cutanée avec les conjugués ainsi obtenus (cf. D8(résumé, p. 176 colonne de droite deuxième paragraphe entier - p. 177 colonne de gauche ligne 9, p. 178 colonne de gauche dernier paragraphe - p. 180 colonne de gauche ligne 11 et Fig. 1-5).
- 3 Aucun de ces documents ne décrit l'utilisation de vésicule de membrane externe native (nOMV) dans leur protocoles expérimentaux, l'objet des revendications 1-25 apparaît donc répondre conformément aux critères de nouveauté requis.
- 4 Cependant, l'objet des revendications 1-25 ne semble pas basé sur une quelconque activité inventive pour les raisons suivantes:
- 4.1 N'importe quel document choisi parmi le groupe de documents comprenant D1-D8 peut-être considéré séparément comme représentant l'art antérieur le plus proche pour l'objet de la revendication indépendante 1 qui diffère de l'enseignement de ce document par le fait que les OMV conjuguées revendiquées sont obtenues avant conjugaison à l'antigène, par des étapes de purification qui ne comprennent pas l'utilisation d'un détergent. En effet les OMV conjuguées revendiquées sont qualifiées comme étant natives.
- 4.2 Cependant il est important de souligner que la demande en présence ne présente pas de données expérimentales qui permettent à la présente autorité de savoir si cette différence conduit à un effet surprenant par rapport à l'effet déjà connu dans l'art dû à l'utilisation d'OMV natives en tant que composé vaccinal. L'absence de telles données expérimentales ne permet pas non plus à la présente autorité chargée d'examiner la demande, de

savoir si cette différence permet de résoudre un problème technique objectif dans l'art encore inconnu à la date de dépôt relevante pour la demande en question. En effet l'utilisation de détergent dans les étapes de purification des OMV est reconnue et nécessaire pour l'élimination des lipopolysaccharides toxiques de certaines souches bactériennes. Cependant cette utilisation de détergent conduisait également à la perte ou à la destruction d'antigènes nécessaires pour l'induction d'une réponse immunitaire efficace et protectrice (cf. D9 p. 2 premier paragraphe entier). Les auteurs du document D9 ont en effet démontré qu'il était possible de produire des OMV natives à l'aide d'un protocole de purification dépourvu d'utilisation de détergent, à partir de souche bactériennes génétiquement modifiées dont la production de lipopolysaccharides de surface toxique est réduite voire inexistante (cf. D9 résumé, p. 2 ligne 6 - p. 3 ligne 15, p. 11 ligne 16 - p. 18 ligne 30, exemples et revendications).

- 4.3 Au vu de l'enseignement de n'importe quel document D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7 ou D8 pris en compte séparément comme représentant l'art antérieur le plus proche, le problème technique objectif que se propose de résoudre l'objet de la revendication 1 peut-être considéré comme étant l'approvisionnement en OMV conjuguées améliorées.
- 4.4 La solution proposée par l'objet de la revendication 1, i.e. l'utilisation d'OMV natives pour la fabrication d'OMV conjuguées, ne peut cependant pas être considérée comme étant basée sur une quelconque activité inventive, car comme déjà expliqué plus haut (voir paragraphe 4.2) les avantages des OMV natives sont connues dans l'art. Ainsi, l'homme du métier aurait utilisé ces OMV natives, moins toxiques et plus immunogènes, dans les étapes de fabrication des OMV conjuguées rapportées dans l'un de ces documents de l'art antérieur considéré comme le plus proche, et serait arrivé à l'objet revendiqué sans faire appel à une quelconque activité inventive.
- 4.5 Un raisonnement identique équivalent est aussi atteint s'il est considéré que l'homme du métier peut combiner l'enseignement de D10 ou celui de D11 qui, tous deux rapportent la production et la purification d'OMV natives polyvalentes, i.e. présentant des antigènes de différentes souches bactériennes (cf. D10 résumé, p. 4250 colonne de droite 5 dernières lignes - p. 4251 dernier paragraphe entier, matériel et méthodes (section matériel en supplément), le paragraphe reliant la p. 4253 à la p. 4254 - p. 4254 colonne de droite ligne 34, p. 4255 colonne de droite premier paragraphe entier, Tableaux 1-3 et fig. 1-4; et D11 résumé, p. 4 ligne 24 - p. 7 ligne 6, p. 18 ligne 27 - p. 25 ligne 8, p. 37 ligne 24 - p. 69 ligne 28 et revendications), avec les

enseignements de n'importe quel document d'art antérieur considéré comme étant le plus proche sélectionné dans le groupe de documents comprenant les documents D1-D8.

- 4.6 Pour des raisons identiques à celles exposées ci-dessus (voir paragraphes 4.1-4.5), l'objet des revendications indépendants 17, 20, 21, 23 et 24 ne paraît pas non plus être basé sur une quelconque activité inventive. En effet les conjugués obtenus à partir d'OMV selon l'enseignement de D1-D8 sont tous utilisés dans des compositions vaccinales pour leur utilisation à des fins thérapeutiques de traitement ou de prévention des infections par les souches bactériennes qui expriment ces mêmes antigènes soit conjugués aux OMV soit présents dans les OMV avant conjugaison (voir paragraphes 2.1-2.5 ci-dessus).
- 4.7 Au vu de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche, les revendications dépendantes 2-16, 18, 19, 22 et 25 n'apparaissent pas contenir des caractéristiques essentielles additionnelles qui, en combinaison avec les caractéristiques essentielles de l'objet des revendications indépendantes auxquelles elles se réfèrent, satisfont aux conditions requises pour reconnaître une activité inventive. Ces caractéristiques additionnelles semblent en effet être conventionnelles et ne provoquent apparemment pas d'effet technique surprenant ou l'obtention de résultats inattendus par l'homme du métier. En outre, il est intéressant de noter que le document D12 décrit une liste non exhaustive de fonctionnalisations possibles par réactions chimiques ou couplage simples permettant de conjuguer les antigènes de la surface des OMV à d'autres antigènes ou molécules cibles et d'obtenir ainsi des OMV conceptualisées en fonction des besoins requis par le projet de leur utilisation à but thérapeutique, vaccinal ou diagnostic (cf. D12 résumé, p. 878 colonne de gauche dernier paragraphe - p. 883 colonne de gauche premier paragraphe, le paragraphe reliant la p. 883 à la p. 884, Fig. 4 et 5 et Tableau 1).