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

(11) 1025443 A1

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 21/02/2019

(21) Numéro de demande : BE2017/5856

(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 47/69

(30) Données de priorité :

25/11/2016 GB 1619949.9

27/07/2017 GB 1712101.3

(71) Demandeur(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

(72) Inventeur(s) :

DI BENEDETTO Roberta
53100 SIENA
Italie

MICOLI Francesca
53100 SIENA
Italie

SAUL Allan James
53100 SIENA
Italie

(54) CONJUGUES nOMV-ANTIGENE 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, 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.

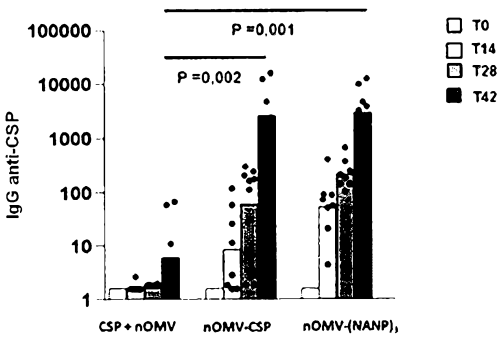


Fig. 1A

BE2017/5856

CONJUGUES nOMV-ANTIGENE ET LEUR UTILISATION

Domaine technique

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 polysaccharides. Par exemple, les polysaccharides capsulaires bactériens (PSC) 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 un 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.

Un support connu dans de tels conjugués est le complexe des protéines de membrane externe « OMPC », formé de vésicules de *N. meningitidis* (par exemple, voir le document EP-0467714), 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. Par exemple, Wu *et al.* (PNAS USA 2006 ; 103(48): 18243-18248) rapportent que la conjugaison de la Pfs25H 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 qu'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 (voir, par exemple, le document WO 2006/124712), comme il est représenté sur le schéma 1.

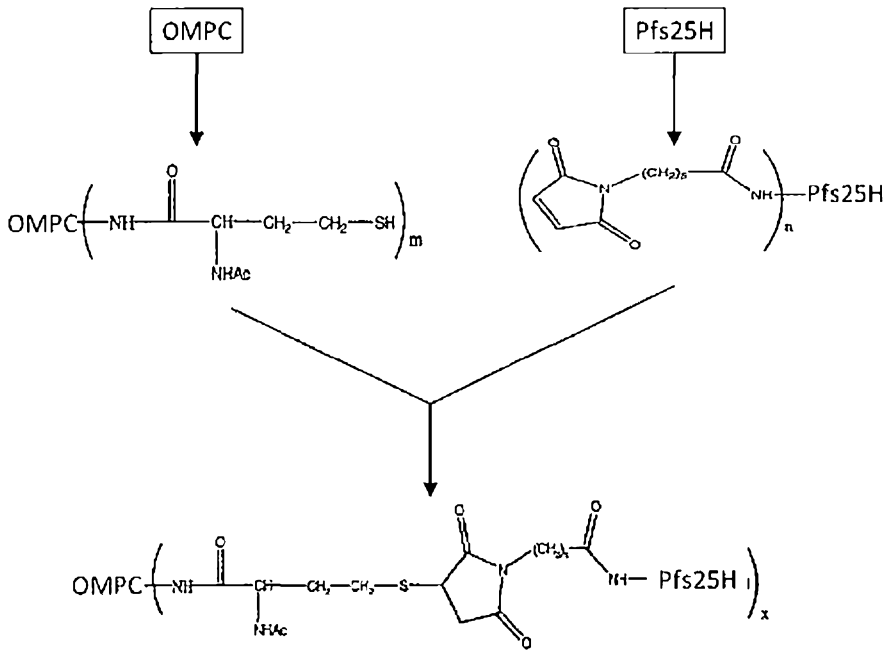


Schéma 1

Comme il est représenté sur le schéma 1 ci-dessus et selon des procédures générales de l'art antérieur, les procédés de conjugaison et leurs conjugués envisagent l'utilisation d'un lieur hétérobifonctionnel bivalent, c'est-à-dire, un groupement lieur ayant les extrémités terminales portant des groupes fonctionnels

différents. C'est principalement pour éviter la réticulation de l'intermédiaire vésicule-lieur avec une autre particule de vésicule plutôt qu'avec l'antigène choisi. Dans la pratique, selon l'art antérieur, les différentes extrémités du lieur sont choisies selon les groupes réactifs sur la vésicule et l'antigène choisi impliqués dans le procédé, afin d'avoir une réaction sélective avec la partie prévue, à savoir la vésicule d'un côté et l'antigène de l'autre côté terminal. Toutefois, ces méthodologies souffrent de certains désavantages, principalement associés à la sélection et à la fonctionnalisation des lieurs, posant ainsi une certaine limitation sur le choix de la vésicule et de l'antigène à coupler ensemble. Le demandeur a découvert à présent que lorsque des vésicules de membrane externe natives (nOMV) non extraites par un détergent sont utilisées comme vésicules de départ, il est possible d'utiliser un lieur bivalent approprié à la connexion avec une protéine de la surface des nOMV d'un côté et avec un antigène choisi sur l'autre extrémité, fournissant ainsi un conjugué final qui présente toujours l'activité immunogène à la fois de la nOMV et de l'antigène. De façon surprenante, même lorsque le lieur utilisé dans la présente invention présente des groupes fonctionnels terminaux identiques, la conjugaison de la nOMV avec l'antigène choisi est obtenue sensiblement sans la formation d'agrégats de vésicules ou de produits secondaires, délétères pour la réaction de conjugaison.

Résumé de l'invention

Dans un premier aspect, l'invention se rapporte à un conjugué immunogène nOMV-lieur-antigène, comprenant une vésicule de membrane externe native (nOMV) obtenue par un procédé dépourvu de détergent, comportant au moins un résidu de protéine de surface connecté à au moins un antigène étranger choisi par un lieur bivalent.

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

i) la réaction d'au moins un résidu de protéine de surface de nOMV avec la première partie terminale d'un lieur bivalent pour obtenir un intermédiaire nOMV-lieur, et

ii) la réaction dudit intermédiaire nOMV-lieur avec au moins un antigène choisi par l'intermédiaire de la seconde partie terminale du lieur bivalent, obtenant ainsi le conjugué nOMV-lieur-antigène de l'invention.

Selon un mode de réalisation, le lieur est un lieur homobifonctionnel bivalent, c'est-à-dire, comportant les mêmes fonctionnalités terminales. Dans un mode de réalisation encore préféré, le lieur est un lieur hétérobifonctionnel bivalent, c'est-à-dire, comportant des fonctionnalités terminales différentes.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à l'intermédiaire nOMV-lieur obtenu (ou pouvant être obtenu) par l'étape i) indiquée ci-dessus, et son utilisation pour la préparation du conjugué nOMV-lieur-antigène de l'invention.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte également au conjugué nOMV-lieur-antigène ci-dessus pour

une utilisation en tant que composé immunogène, particulièrement pour la préparation d'une composition immunogène ou d'un vaccin.

Dans un autre aspect, les conjugués immunogènes selon l'invention comprennent une nOMV comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à un premier antigène par un lieur bivalent, où ledit premier antigène est en outre connecté à un second antigène différent.

Dans encore un autre aspect, les conjugués immunogènes de l'invention comprennent une nOMV comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à un premier antigène par un lieur bivalent, et au moins un autre groupement protéique de surface connecté à un second antigène différent par un lieur bivalent, où le lieur bivalent connectant le premier antigène et le lieur bivalent connectant le second antigène sont indépendamment identiques ou différents l'un de l'autre.

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, 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 à l'utilisation de nOMV pour la préparation de conjugués nOMV-lieur-antigène polyvalents immunogènes.

Brève description des dessins

La figure 1 représente les titres en IgG anti-CSP (1A) et anti-OAg (1B) après immunisation avec la CSP ou son fragment $(NANP)_3$ conjugué à des nOMV de *S. typhimurium* par la chimie SH-maléimido, comparativement à la CSP mélangée physiquement avec lesdites nOMV (formulées sans aucun adjuvant). Des souris CD1 femelles, âgées de 5 semaines (8 par groupe) ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec 2 µg de CSP/$(NANP)_3$ par dose. Les titres ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42.

Figure 2 : Réponse en IgG anti-Pfs25 induite chez des souris (200 µl par dose injectés en SC aux jours 0 et 28, saignées 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, par l'intermédiaire du lieur BS3.

Figure 3 : Réponse en IgG anti-fHbp induite chez des souris (200 µl par dose injectés en SC aux jours 0 et 28, saignées 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 fHbp, par l'intermédiaire du lieur BS3.

Figure 4 : Réponse en IgG anti-MenA induite chez des souris par des conjugués de nOMV de l'invention produits par conjugaison de nOMV de MenB avec l'antigène MenA, par l'intermédiaire du lieur SIDEA, comparativement au conjugué bivalent MenA-MenC-GMMA de MenB, aux GMMA, au conjugué de CRM et au mélange de MenA et de GMMA (non conjugués).

Figure 5 : Réponse en IgG anti-MenC induite chez des souris par des conjugués de nOMV de l'invention produits par conjugaison de nOMV de MenB avec l'antigène MenC, par l'intermédiaire du lieur SIDEA, comparativement au conjugué bivalent MenA-MenC-GMMA de MenB, aux GMMA, au conjugué de CRM et au mélange de MenC et de GMMA (non conjugués).

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).

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.

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 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 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.

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 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, pour une nOMV, 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 progiciel 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.

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

Le terme « oligosaccharide » comprend dans sa signification des polysaccharides comportant de 3 à 10 unités monosaccharidiques, comme il est connu de façon générale dans l'art (voir, par exemple, https://en.wikipedia.org/wiki/Oligosaccharide).

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 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 « -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. 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 « 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.

Le terme « suspension » comprend dans sa signification un milieu liquide présentant quelques précipités, particules ou particules floculantes, à la différence d'une solution où le milieu est sensiblement dépourvu de toute particule solide.

Sauf disposition contraire, le terme « conjugaison » indique la connexion ou la liaison des entités soumises, particulièrement en référence à la nOMV et aux groupements antigéniques choisis, par l'intermédiaire d'un lieur bivalent.

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 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 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 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 des vésicules isolées du milieu et/ou détachées à partir de cellules, et il s'agit 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 et orientation correcte dans l'environnement membranaire naturel, et auxquelles il manque habituellement les composants cytoplasmatiques.

Au contraire, le terme « OMV » ou « dOMV » englobe diverses vésicules protéoliposomiques obtenues par 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 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 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 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 lumière DDL), 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 DDL) provoquée par une agrégation des vésicules induite par le détergent (voir 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 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 *et al.* J. Prot. Res. 12(4) (2013) 1898-1908 "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".

Le terme « lieur homobifonctionnel bivalent » ou « lieur homologue » indique une unité de liaison présentant deux extrémités terminales portant le même groupe fonctionnel, et capable de réagir avec la protéine de nOMV d'un côté, et avec l'antigène choisi de l'autre côté, où la protéine de nOMV et l'antigène choisi sont tels que décrits ci-dessous en détail.

De façon similaire, le terme « lieur hétérobifonctionnel bivalent » ou « lieur hétérologue » indique une unité de liaison présentant deux extrémités terminales portant des groupes fonctionnels différents, et capable de réagir spécifiquement avec la protéine de nOMV d'un côté, et avec l'antigène choisi de l'autre côté, où la protéine de nOMV et l'antigène choisi sont tels que décrits ci-dessous en détail.

Le terme « groupe alkyle ou alcényle en C_1 à C_x bivalent » comprend dans sa signification un groupe alkyle ou alcényle saturé ou insaturé bivalent comportant 1 à x atomes de carbone, tel que les groupes méthylène, éthylène, vinyle, allyle et analogues.

Comme il a été introduit ci-dessus, l'invention se rapporte à des conjugués nOMV-lieur-antigène obtenus par une connexion covalente d'au moins une unité de protéine sur la surface de la nOMV à un ou plusieurs antigènes étrangers choisis, par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs lieurs bivalents appropriés. En d'autres termes, et selon un aspect, l'invention se rapporte à des conjugués nOMV-lieur-antigène obtenus (ou pouvant

être obtenus) par le procédé de l'invention tel que décrit ci-dessous plus en détail.

Il faut noter que les présents conjugués sont dotés d'une remarquable activité immunogène, comme il est en outre supporté par la partie expérimentale ici. En fait, tout en étant capables d'induire une réponse immunitaire contre l'antigène conjugué, les conjugués de l'invention sont également capables d'induire une réponse immunitaire contre le composant nOMV, à la différence des conjugués de l'art dOMV-antigène où l'activité immunitaire repose principalement sur la partie antigène et pas sur la vésicule extraite par un détergent. Au contraire, selon la présente invention, la conjugaison de l'antigène choisi au composant protéine de nOMV, n'a pas d'impact significatif sur la capacité de la nOMV à induire sa propre réponse immunitaire. Il faut noter que lorsque des nOMV et le ou les antigènes choisis proviennent de sources différentes, les conjugués de l'invention peuvent être utiles, par exemple, pour la préparation de compositions immunogènes ou de vaccins multivalents basés sur l'activité à la fois de la nOMV et du ou des antigènes choisis.

Plus encore, la présente invention montre de façon surprenante qu'un lieur homobifonctionnel peut être utilisé dans la préparation des conjugués nOMV-lieur-antigène, sans encourir les problèmes de l'art antérieur associés, par exemple, à une réaction croisée ou une agrégation des vésicules. Dans la pratique, la nOMV de départ est fonctionnalisée avec le lieur homobifonctionnel en faisant réagir les groupes fonctionnels corrects d'au moins une protéine de surface

de vésicule avec une extrémité du lieur. Par ceci, un intermédiaire nOMV-lieur est formé de façon covalente, ayant toujours l'autre extrémité du lieur disponible pour la réaction subséquente avec l'antigène choisi. Ainsi, la seconde extrémité du lieur réagira avec l'antigène choisi, d'une façon spécifique et sélective, menant au conjugué final nOMV-lieur-antigène, et évitant sensiblement les réactions croisées ou les agrégations des intermédiaires. Comme il est indiqué dans l'exemple 8a, la même réaction lorsqu'elle est réalisée en considérant une dOMV comme vésicule de départ mène à la formation d'agrégats de vésicule-lieur-vésicule, qui ne sont pas appropriés pour une réaction subséquente avec l'antigène choisi. De façon surprenante, il a été découvert à présent que non seulement l'utilisation de la nOMV comme vésicule de départ peut surmonter les problèmes d'agrégation de l'art antérieur, mais également il est à présent possible d'utiliser divers lieurs bifonctionnels qui mènent à la préparation de toute une série de conjugués nOMV-lieur-antigènes selon l'invention, conservant le profil immunogène des composants conjugués.

Les conjugués de l'invention offrent plusieurs avantages comparativement aux antigènes non conjugués, par exemple, la capacité d'agir comme un agent immunogène ou un vaccin bivalent ou multivalent comme il a été discuté ci-dessus, et une immunogénicité améliorée par rapport aux antigènes non conjugués (voir les exemples 5 et 7). En outre, les conjugués de l'invention présentent plusieurs avantages par rapport aux conjugués vésicule-protéine qui ont été utilisés jusqu'à aujourd'hui. En

premier, les nOMV peuvent être préparées avec moins d'étapes comparativement aux conjugués de dOMV dans lesquels les antigènes ont été couplés aux protéines de dOMV, et en particulier sans nécessiter l'étape coûteuse et fastidieuse de dérivatisation des protéines. En second, la production des nOMV peut être plus fiable et pratique que la préparation des dOMV par extraction par un détergent. Encore plus, l'antigène qui n'a pas réagi à partir du mélange de conjugaison peut être recyclé pour une utilisation dans une autre étape de conjugaison, améliorant l'efficacité de la production des conjugués comme il est illustré dans l'exemple 3.

Dans un premier aspect, l'invention se rapporte à un conjugué comprenant un ou plusieurs antigènes étrangers différents choisis, chacun connecté à un résidu de protéine d'une vésicule de membrane externe native non extraite par un détergent (nOMV), par l'intermédiaire d'un lieur bivalent. A noter, les nOMV peuvent être 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 zwittérioniques comme Empigen BB (voir, par exemple, le document US 4 707 543) ou similaires.

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 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 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 production de nOMV peuvent être généralement choisies sur la base de la quantité de nOMV produite en culture. Comme il a été présenté ci-dessus, 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 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 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 (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 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.

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

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

Les souches virulentes de *Shigella* possèdent un 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 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 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.

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 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 sérogroupe B, mais il est également préféré de les préparer à partir de sérogroupes autres que B, comme l'un de : A, C, W135 ou Y. 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 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 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 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 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 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, 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 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 ΔTolR).

Dans des modes de réalisation préférés, au moins 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 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+.

Dans certains modes de réalisation, la bactérie exprime les cinq protéines Tol-Pal, mais au moins l'une est mutée pour provoquer un hyper-bourgeonnement. Par exemple, la protéine TolA, TolQ, TolR et/ou Pal peut être mutée de telle façon que la protéine conserve sa 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 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 déficientes en OAg, telles que ΔgalU, ΔgalE ou ΔwbaP 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 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 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 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 qu'il a été observé (par exemple, des nOMV provenant de *Salmonella* 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 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 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 lpxl1. De cette façon, les nOMV résultantes 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, GalE, HtrB/MsbB, LbpA, LbpB, LpxK, Opa, Opc, PilC, PorB, SiaA, SiaB, SiaC, SiaD, TbpA, et/ou TbpB ; (b) CtrA, CtrB, CtrC, CtrD, FrpB, GalE, 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, GalE, 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.

Comme il a été susmentionné, les nOMV sont liées de façon covalente au lieur bifonctionnel au moyen d'au moins un résidu de protéine, généralement localisé sur la surface de la vésicule. Dans cette direction, les protéines réagiront de préférence avec une extrémité terminale du lieur au moyen d'une ou de plusieurs fonctionnalités amino, thiol ou hydroxyle d'acides aminés, cette dernière étant un groupe alpha-hydroxyle ou une partie de la fonctionnalité carboxy d'acide aminé. De préférence, le groupe fonctionnel de la protéine est un groupe amino, de façon davantage préférée une amine primaire ($-NH_2$). Ces groupes fonctionnels peuvent être naturellement présents dans les parties d'acides aminés d'intérêt, ou même introduits artificiellement pour les objectifs de la conjugaison.

Lorsque le lieur choisi est un lieur homobifonctionnel bivalent, il faudra comprendre que le groupe fonctionnel de la protéine et le groupe fonctionnel de l'antigène qui réagiront respectivement avec les parties terminales du lieur seront de préférence identiques. A titre d'exemple, un résidu d'acide aminé lysine d'une ou de plusieurs protéines de nOMV réagira avec le lieur (par exemple, BS3) par l'intermédiaire du groupe fonctionnel $-NH_2$ correspondant. De la même façon, également un antigène choisi (par exemple, Pfs25) réagira avec la partie terminale libre restante du lieur par l'intermédiaire de groupes amino ($-NH_2$) pertinents.

A noter, et comme il est bien expliqué dans la présente description, la réaction survient sans réaction croisée ou formation d'agrégation sensible, menant ainsi au produit final, utile, par exemple, pour la préparation de vaccins multivalents, d'une façon très fiable et versatile, et différemment de l'utilisation de dOMV, comme il est indiqué dans les exemples 8 et 8a (comparatif).

Les résidus d'acides aminés préférés comprennent, mais n'y sont pas limités : l'arginine, la lysine, l'asparagine, la glutamine, l'acide aspartique ou glutamique, la cystéine et l'histidine. De préférence, les protéines des nOMV sont celles comportant un ou plusieurs groupements acides aminés présentant des groupes amino libres, de préférence des groupes $-NH_2$. De façon même davantage préférée, ledit groupement acide aminé est l'arginine et/ou la lysine, grâce à quoi différents groupes $-NH_2$ provenant de protéines différentes à arginine et/ou lysine sont capables de réagir sélectivement avec le lieur selon la présente invention.

Tant que le lieur bivalent est concerné, il s'agit généralement d'une molécule d'une certaine longueur, présentant une solubilité dans l'eau et une polarité appropriées, capable de lier de façon covalente les protéines des nOMV et l'antigène par ses extrémités terminales respectivement. Afin d'optimiser la solubilité du lieur choisi, il peut être opportun d'introduire un ou plusieurs groupes polaires tels que des groupes sulfate, sulfite, phosphate et analogues, ou même d'utiliser leur sel correspondant, par exemple,

sous la forme d'un sel de métal alcalin ou alcalinoterreux, lorsque c'est possible. Grâce à la versatilité de la présente invention, il est possible d'utiliser différents lieurs, en termes, par exemple, de longueur, de polarité, et d'encombrement stérique, fournissant ainsi une liaison covalente avec à la fois les résidus de protéines des nOMV et l'antigène choisi. Par ceci, l'invention permet la préparation de toute une série de conjugués finals nOMV-lieur-antigène dotés d'un comportement remarquable et spécifique, notamment en ce qui concerne leur immunogénicité et activité.

Le lieur peut être hétérobifonctionnel (c'est-à-dire, portant deux fonctionnalités terminales différentes) ou, de préférence homobifonctionnel (c'est-à-dire, comportant des fonctionnalités terminales égales). De façon même davantage préférée, le lieur est symétrique par rapport à un axe vertical hypothétique.

Ainsi, le lieur bivalent selon la présente invention a une formule générale (I) :

X-L-X' (I)

dans lequel :

X et X' sont différents l'un de l'autre ou identiques, et représentent un groupe fonctionnel capable de réagir sélectivement avec les protéines des nOMV d'une part et avec l'antigène choisi d'autre part, de préférence en formant des groupements ester, amido thioester ;

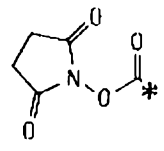
-L- représente un groupe alkyle ou alcényle en C_1 à C_{15} linéaire ou ramifié bivalent éventuellement substitué,

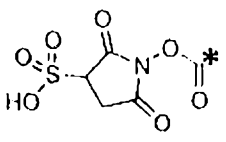
et éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi : l'oxygène (-O-), le soufre (-S-), l'azote (-NH- ou un groupe -N- éventuellement substitué) et analogues.

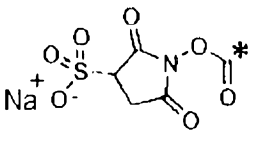
Dans un mode de réalisation, -L- représente de préférence un groupe alkyle en C_3 à C_{12} linéaire bivalent, éventuellement substitué ou interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes d'oxygène (-O-). Dans un mode de réalisation encore davantage préféré, -L- représente un groupe alkyle en C_3 à C_6 linéaire bivalent.

Selon la formule (I), le lieur est en outre caractérisé en ce qu'il a les deux parties terminales portant deux fonctionnalités X et X' qui sont de préférence identiques, fournissant ainsi un lieur homofonctionnel bivalent. Dans un mode de réalisation, les groupes X et/ou X' peuvent être n'importe lesquels formant des esters, des thioesters ou des amides lorsqu'ils sont combinés avec une fonctionnalité hydroxyle, thiol ou amino, respectivement.

De préférence, X et/ou X' représentent des conjugués d'ester de N-hydroxysuccinimide, de façon davantage préférée choisis parmi au moins l'un de :







dans lesquels le * représente le point de contact avec l'espaceur -L- dans la formule (I), telle que définie ci-dessus.

Ainsi, dans un mode de réalisation encore préféré, le lieur est choisi parmi au moins l'un de : le glutarate de disuccinimidyle (DSG), le subérate de disuccinimidyle (DSS), 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-succinimidyl-oxycarbonyl-α-méthyl-α-(2-pyridyldithio)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-hydroxy-succinimide (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 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 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), le 6-[(iodoacétyl)amino]hexanoate de succinimidyle (SIAX) et l'iodoacétate de p-nitrophényle

(NPIA), le N-hydroxysuccinimide, le N-oxysuccinimide et le diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide adipique (SIDEA) et le subérate de bis(sulfosuccinimidyle) (BS3, CAS No. 82436-77-9).

Dans un mode de réalisation, d'autres lieurs bifonctionnels préférés réactifs avec des amines pour une utilisation avec l'invention sont choisis parmi au moins l'un de : des halogénures d'acryloyle (par exemple, le chlorure), l'éthylène glycol bis[succinate de succinimidyle], le bis(sulfosuccinimidyle)-tri(éthylène glycol) (BS(PEG)3), le bis(sulfosuccinimidyle)tétra(éthylène glycol) (BS(PEG)4), le bis(sulfosuccinimidyle)-penta(éthylène glycol) (BS(PEG)5) et le bis(sulfosuccinimidyle)-hexa(éthylène glycol) (BS(PEG)6), où le bis(sulfosuccinimidyle)-penta(éthylène glycol) (BS(PEG)5, CAS No. 756526-03-1) est particulièrement préféré.

Les lieurs homobifonctionnels préférés capables de réagir avec des groupes fonctionnels thiol sur la protéine de la nOMV et l'antigène selon l'invention, sont ceux ayant X et X' choisis parmi au moins l'un de : les résidus 2-pyridyldithio, maléimide ou iodoacétyle.

D'autres lieurs appropriés pour la réaction avec le groupe hydroxyle de la protéine de la nOMV tel que défini ci-dessus, sont choisis parmi au moins l'un de : le dihydrazide de l'acide adipique (ADH), le groupe β-propionamido, la nitrophényl-éthylamine, les halogénures d'halogénoacyle, l'acide 6-aminocaproïque.

Les lieurs préférés sont choisis parmi au moins l'un de : le (BS(PEG)5), le glutarate de disuccinimidyle (DSG)

ou l'un de ses sels, le SIDEA et le BS3, où le BS3 est même davantage préféré (pour une référence générale sur le BS3, voir, par exemple, le brevet US 4 965 338). Selon un mode de réalisation encore préféré, le DSG est particulièrement utile lorsque l'on fonctionne à un pH autour de 9. De façon surprenante, l'efficacité de la réaction de conjugaison peut être augmentée de façon pratique lorsque du (BS(PEG)5) ou du BS3 sont utilisés en tant que lieur bivalent, sensiblement en l'absence de formation d'agrégats de vésicules. A cet égard, il faut souligner que l'utilisation du BS3 selon la présente invention ne fournit pas de réticulation sensible des protéines de surface des nOMV pour former des agrégats de haute masse moléculaire, mais plutôt, une réaction sélective avec les nOMV sur une extrémité terminale, et avec l'antigène choisi sur l'autre extrémité. Ce comportement est en outre supporté par la partie expérimentale incluse ici, dans laquelle l'exemple 8 et l'exemple 8a (comparatif, utilisant des dOMV) sont décrits.

De façon avantageuse, tout antigène correct peut être conjugué à la nOMV pour obtenir les conjugués nOMV-lieur-antigène de l'invention. 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, fournissant ainsi de façon pratique 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 la nOMV est dérivée. 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 la nOMV est dérivée.

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.

Les antigènes polypeptidiques conjugués aux nOMV 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 fungique, 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 (SEQ ID NO : 14), 3526 (SsIE, SEQ ID NO : 15) et 405 (FdeC, SEQ ID NO : 16). Comme exemple *non* limitatif préféré, les nOMV provenant de *Shigella* ou de *Salmonella* peuvent être conjuguées à CTF1232, 3526 ou 405, selon la présente invention, pour produire un vaccin bivalent couvrant à la fois *E. coli* entérotoxigénique (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

L'antigène NHBA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de sérogroupe B MC58 en tant que gène NMB2132 (numéro d'accession 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 : (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, par exemple 100 %) 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 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 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.

Antigène NadA

L'antigène NadA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de sérogroupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin *et al.* (2000) Science 287: 1809-1815) en tant que gène NMB1994 (numéro d'accession 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 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 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus, par exemple 100 %) 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 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 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

L'antigène NspA a été inclus dans la séquence génomique publiée pour la souche de méningocoque de sérogroupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin *et al.* (2000) Science 287: 1809-1815) en tant que gène NMB0663 (numéro d'accession GenBank GI:7225888 ; SEQ ID NO : 4 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 : (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, par exemple 100 %) avec SEQ ID NO : 4 ; et/ou (b) comprenant un fragment d'au moins « n » acides aminés consécutifs de 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 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 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 sérogroupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin *et al.* (2000) Science 287: 1809-1815) en tant qu'antigène NMB0992 (numéro d'accession 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, par exemple 100 %) 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 sérogroupe B MC58 (voir, par exemple, Tettelin *et al.* (2000) Science 287: 1809-1815) en tant qu'antigène NMB1985 (numéro d'accession 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. 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, par exemple 100 %) avec SEQ ID NO : 6 ; et/ou (b) comprenant un fragment 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 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 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

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 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % ou plus, par exemple 100 %.

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 v2, par exemple, contre la souche M01-240355.

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 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 : *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

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 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). 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 RO6C a été capable de déclencher un titre élevé d'anticorps bloquant la transmission chez des rats. RO6C (SEQ ID NO : 11) est un antigène préféré qui peut 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. 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 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, un groupement d'une taille particulière peut être

également choisi de façon avantageuse. Ainsi, les saccharides peuvent être fragmentés à partir de leur longueur naturelle, et éventuellement un groupement de taille de ces fragments peut être utilisé. Même en outre, les saccharides ne sont pas limités à des saccharides purifiés à partir de sources naturelles et des saccharides synthétiques ou semi-synthétiques peuvent être utilisés à la place. L'antigène polysaccharidique à utiliser selon l'invention est généralement fonctionnalisé afin de permettre la réaction avec le lieur bivalent. Ainsi, dans un mode de réalisation, lorsque l'antigène est un polysaccharide, l'invention comprend l'oxydation du groupe hydroxyle anomère dudit antigène en aldéhyde, ceci suivi d'une conversion par amination réductrice en groupe amino, par exemple, en utilisant du $NaIO_4$ et du $NaBH_4$, selon des procédures connues dans l'art. De cette façon, l'antigène polysaccharidique présentera un groupe $-NH_2$ approprié pour la réaction avec la partie terminale du lieur, déjà connecté à la nOMV pour donner le conjugué nOMV-lieur-antigène.

Les antigènes saccharidiques préférés sont des saccharides capsulaires (PSC) bactériens. Ceux-ci 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, où les sérogroupes A et C sont particulièrement préférés ; *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.*

Dans un mode de réalisation préféré, la nOMV est un GMMA provenant de la bactérie *Meningococcus*, de préférence préparé à partir d'une souche du sérogroupe B, et l'antigène choisi est un saccharide capsulaire provenant de *Neisseria meningitidis* des sérogroupes A ou C, de façon même davantage préférée conjugué au GMMA par l'intermédiaire d'un lieur SIDEA.

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).

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-rhamnose, ou des oligomères avec la structure du saccharide de GAS natif, peuvent être conjugués à des nOMV selon l'invention.

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.

Comme il a été présenté ci-dessus, dans un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé de préparation de conjugués nOMV-lieur-antigène, comprenant la réaction d'au moins un résidu de protéine de nOMV avec une première partie terminale d'un lieur bivalent, ceci suivi d'une réaction de la seconde partie terminale d'un tel lieur avec un antigène étranger choisi, comme il est décrit ci-dessous plus en détail.

Ainsi, selon un mode de réalisation, l'invention se rapporte à un procédé pour la préparation de conjugués nOMV-lieur-antigène, comprenant les étapes suivantes :

(i) la réaction d'au moins une protéine sur la surface de la nOMV avec un lieur bivalent pour former un intermédiaire nOMV-lieur ; et

(ii) la réaction de l'intermédiaire nOMV-lieur ainsi obtenu avec au moins un antigène étranger pour former les conjugués nOMV-lieur-antigène de l'invention.

Selon un mode de réalisation, les nOMV sont initialement mises en suspension dans un tampon correct, tel que le tampon MES (acide 2-(N-morpholino)éthane-sulfonique), le tampon borate ou le PBS (solution tampon phosphate), afin de sélectionner un pH compris entre 5 et 9, de préférence de 5 à 7 ou de 7 à 9, selon, par exemple, le lieur choisi ou les conditions de la conjugaison. Les mêmes plages de pH sont également utilisées pour l'étape ii) pour la réaction entre l'extrémité terminale libre du lieur et l'antigène choisi comme il est décrit ci-dessous en détail.

Après l'étape i), le pourcentage de fonctionnalisation des nOMV est compris entre 15 % et 60 %, principalement selon le type de lieur bivalent utilisé. A cet égard, le % de groupes fonctionnels relatifs à l'extrémité terminale libre du lieur est de 15 % à 40 %, de préférence de 30 % à 35 %, selon le type et la stabilité desdits groupes fonctionnels réactifs. Il est en fait remarqué que de telles plages permettent d'établir l'efficacité du procédé, aboutissant ainsi à une quantité supérieure de conjugué d'antigène final de l'invention.

La suspension tamponnée ainsi obtenue a une concentration en nOMV comprise entre 2 et 10 mg/ml, de préférence de 3 à 6 mg/ml. Le lieur choisi est généralement ajouté dans des quantités dépendant, par exemple, des groupes $-NH_2$ sur les nOMV, de préférence en excès, de façon même davantage préférée comprises entre 10 et 20 équivalents par mole de $-NH_2$.

Selon le lieur, il pourra être pratique de le solubiliser de façon préventive dans un solvant sec polaire, tel que le DMSO ou analogues, afin de faciliter la manipulation et l'efficacité, obtenant ainsi des résultats améliorés en termes de rendement global et de reproductibilité.

Le mélange est ensuite incubé à température ambiante (par exemple, d'environ 15 à 40 °C) pendant une période de temps généralement de 30 minutes à 4 heures. Ensuite, l'intermédiaire nOMV-lieur ainsi obtenu est purifié, par exemple, par ultracentrifugation, et ensuite mis à réagir avec l'antigène choisi selon l'étape ii). L'antigène est généralement solubilisé dans

une solution tampon correcte, telle qu'une solution tampon phosphate. L'antigène est ajouté de préférence dans une quantité située dans la plage de rapports de 2/1 à 1/2 p/p par rapport à l'intermédiaire nOMV-lieur, ou de façon davantage préférée dans un rapport de 1/1. La réaction peut être surveillée, par exemple, par HPLC/SEC et la formation du produit final peut être confirmée par une analyse SDS page/Western blot.

Comme variante de mode de réalisation, la réaction de conjugaison comprend les étapes suivantes : (i) la réaction de l'antigène avec un lieur pour former un intermédiaire antigène-lieur ; et (ii) la réaction d'au moins une protéine sur la nOMV avec l'intermédiaire antigène-lieur ainsi formé pour former un conjugué nOMV-lieur-antigène.

Comme autre variante, la réaction de conjugaison comprend les étapes suivantes : (i) la réaction de l'antigène avec un premier lieur pour former un intermédiaire antigène-lieur ; (ii) la réaction d'au moins une protéine sur la nOMV avec un second lieur pour former un intermédiaire nOMV-lieur ; et (iii) la réaction de l'antigène-lieur avec la nOMV-lieur pour former un conjugué nOMV-lieur-antigène.

L'homme du métier comprendra que lorsqu'un lieur homobifonctionnel est utilisé, les groupes fonctionnels de la protéine et de l'antigène impliqués dans la réaction seront la même entité chimique, comme il a été expliqué ci-dessus en détail.

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

(i) la réaction d'un groupe $-NH_2$ d'au moins une protéine de nOMV avec un lieur homobifonctionnel bivalent pour former un intermédiaire nOMV-lieur ; et

(ii) la réaction dudit intermédiaire avec un groupe $-NH_2$ sur un antigène étranger choisi pour former le conjugué nOMV-lieur-antigène de l'invention.

Ce type de réaction de conjugaison est illustré sur le schéma 2 ci-dessous, en utilisant, à titre d'exemple, un GMMA en tant que vésicule native et du BS3 en tant que lieur.

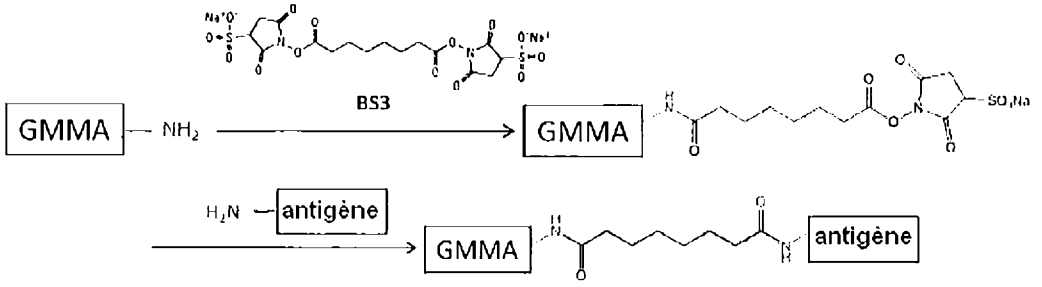


Schéma 2

Lorsque les réactions du lieur avec la protéine sur la surface de la nOMV et l'antigène impliquent des groupes fonctionnels différents (tels qu'une amine sur la protéine sur la vésicule et un thiol sur l'antigène, ou vice versa), il est préféré utiliser un lieur hétérobifonctionnel de la formule générale (I) ci-dessus X-L-X', où X et X' sont différents l'un de l'autre, tels que définis ci-dessus, et L représente un groupement telle que défini ci-dessus. Le groupe X peut réagir avec un groupe fonctionnel, par exemple, une amine sur la protéine de la nOMV ; tandis que le groupe X' peut réagir avec un groupe fonctionnel différent, par exemple, un

thiol sur l'antigène choisi. De préférence, le groupe X représente un N-hydroxy-succinimide ou un N-oxysuccinimide, tandis que le groupe X' est choisi parmi au moins l'un de : les groupes 2-pyridyldithio, maléimide ou iodoacétyle.

Comme variante, le procédé de conjugaison de l'invention comprend la réaction de l'antigène avec un premier lieur et une protéine sur la vésicule avec un second lieur, puis la réaction du premier et du second lieur ensemble pour former le conjugué.

A titre d'exemple, soit l'antigène soit la protéine sur la nOMV peut être mis à réagir avec un lieur se terminant par un groupe maléimide, par exemple en faisant réagir une amine primaire ou soit l'antigène soit la protéine sur la nOMV avec du 4-(N-maléimido-méthyl)cyclohexane-1-carboxylate de succinimidyle (SMCC) ou de l'ester de N-(γ-maléimidobutyryloxy)succinimide (GMBS). Un thiol sur soit l'antigène soit la protéine sur la nOMV peut être ensuite mis à réagir avec le maléimide. Le thiol peut être natif à la protéine sur la nOMV ou à l'antigène ou le thiol peut être le résultat de la réaction de la protéine sur la nOMV ou de l'antigène avec un lieur séparé. Ce type de réaction de conjugaison est illustré sur le schéma 3 ci-dessous, en utilisant, à titre d'exemple, un GMMA et la fHbp en tant qu'antigène :

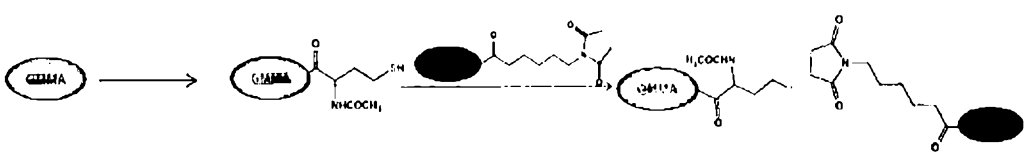


Schéma 3

De façon avantageuse, grâce à sa versatilité, l'invention peut être utilisée pour la préparation de divers conjugués, particulièrement appréciés de l'homme du métier lorsqu'il doit faire face aux problèmes de trouver des méthodologies pratiques et fiables pour l'obtention de conjugués immunogènes.

Comme autre variante, une protéine sur la vésicule peut être liée à l'antigène par (i) modification de la protéine de la vésicule pour inclure un alcyne ; (ii) modification de l'antigène pour inclure un azoture, puis (iii) réaction de l'alcyne et de l'azoture, connue comme la « chimie click », telle qu'illustrée dans l'exemple 6. En variante, l'antigène peut être modifié pour inclure un alcyne et la vésicule peut être modifiée pour inclure un azoture. Ce type de réaction de conjugaison est illustré sur le schéma 4 ci-dessous, en utilisant, à titre d'exemple, un GMMA en tant que vésicule et la fHbp en tant qu'antigène et en utilisant la chimie click dépourvue de cuivre.

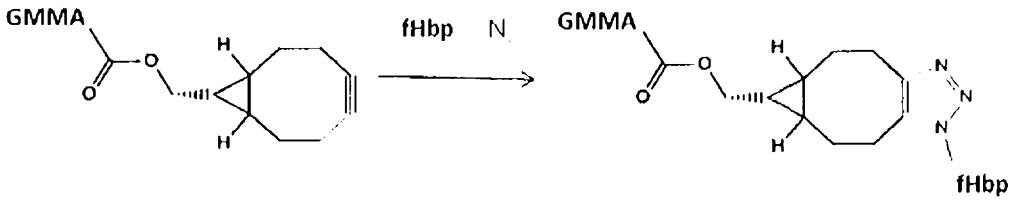


Schéma 4

La présente invention est également utile pour la préparation de nOMV fonctionnalisées 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 immunogène comprenant une nOMV telle que présentée ci-dessus, comportant au moins un groupement protéique connecté à un premier antigène par l'intermédiaire d'un lieur bivalent, où ledit premier antigène est connecté à un second antigène différent. Dans cette direction, les deux antigènes choisis (indiqués ici par Ag1 et Ag2) peuvent être couplés ensemble pour donner un dérivé antigène 1-antigène 2 (Ag1-Ag2), qui peut être ensuite connecté au groupement protéique de surface de la nOMV choisi par un lieur bivalent approprié tel que décrit ci-dessus, pour donner un conjugué indiqué par la formule générale (I) :

nOMV-lieur-Ag1-Ag2 (I)

En variante, le résidu de protéine de la nOMV peut être d'abord connecté à l'Ag1 choisi par l'intermédiaire d'un lieur tel que décrit ci-dessus, et ensuite un second Ag2 est en outre connecté au dit résidu Ag1, pour donner les conjugués de la formule générale (I) ci-dessus.

Dans tous les cas, les nOMV préférées sont les vésicules GMMA. Les Ag1 et Ag2 dans la formule (I) peuvent être choisis parmi les antigènes préférés tels que décrits ci-dessus, des groupements soit protéiques soit polysaccharidiques. De préférence, les antigènes utilisés pour la multi-fonctionnalisation telle qu'envisagée ici sont tous les deux des protéines ou tous les deux des polysaccharides.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention se rapporte à un conjugué immunogène comprenant une nOMV, comportant au moins groupement protéique de surface connecté à un premier antigène (Ag1) par un lieur bivalent, et au moins un autre groupement protéique de surface connecté à un second antigène différent (Ag2) par un lieur bivalent, pour donner un conjugué indiqué par la formule générale (II) :

Ag1-lieur-nOMV-lieur-Ag2 (II)

Tels qu'indiqués dans la formule (II), Ag1 et Ag2 sont chacun individuellement connectés à la nOMV par un lieur bivalent. Dans cette direction, le lieur pour la connexion de la protéine de la nOMV à l'Ag1 ou l'Ag2 peut être indépendamment le même ou différer l'un de l'autre.

Les conjugués de formule (II) peuvent fournir de façon avantageuse une multi-fonctionnalisation sélective des nOMV, de préférence des GMMA, en utilisant un profil de fonctionnalisation spécifique. Les Ag1 et Ag2 dans la formule (II) peuvent être choisis parmi les antigènes préférés tels que décrits ci-dessus, des groupements soit protéiques soit polysaccharidiques. De préférence, les antigènes utilisés pour la multi-fonctionnalisation telle qu'envisagée ici sont tous les deux des protéines ou tous les deux des polysaccharides.

Ainsi, selon un mode de réalisation davantage préféré, l'invention se rapporte à un conjugué de formule (II) dans lequel Ag1 comprend le saccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe A

(MenA) et Ag2 comprend le saccharide capsulaire de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe C (MenC), de façon même davantage préférée ayant la nOMV qui est une vésicule GMMA, de façon davantage préférée obtenue à partir de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe B, de façon même davantage préférée exprimant les v2 et v3 de fHbp.

De façon même davantage préférée, les deux lieurs, chacun connectant Ag1 et Ag2, de préférence de MenA et MenC respectivement, sont identiques, de façon davantage préférée le SIDEA. A cet égard, le GMMA multi-fonctionnalisé ainsi obtenu peut être utilisé en tant qu'agent immunogène contre la bactérie *Neisseria* de MenB, MenA ou MenC, comme il est supporté par les données de SBA recueillies dans la présente partie expérimentale.

Dans un mode de réalisation, lesdits conjugués sont préparés par un procédé comprenant l'addition d'un mélange de polysaccharides activés de MenA et MenC au GMMA, selon la présente procédure telle que décrite ci-dessus. Les polysaccharides de MenA et MenC sont de préférence activés par réaction avec le SIDEA, fournissant ainsi des dérivés SIDEA-MenA et SIDEA-MenC appropriés, capables de réagir avec les groupes $-NH_2$ de la protéine de la nOMV par l'intermédiaire de la partie terminale du groupement du SIDEA, menant ainsi aux conjugués de la formule générale (II) ci-dessus.

L'analyse Western blot et HPAEC-PAD confirme la formation des conjugués où les saccharides de MenA et de MenC sont connectés de façon aléatoire aux protéines de la surface des GMMA par l'intermédiaire du lieur, et aucune agrégation des nOMV n'est détectée par DDL.

L'homme du métier comprendra qu'à la lumière de la versatilité de la technologie proposée, 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 tels qu'indiqués ci-dessus, la présente invention permet également l'introduction de différentes quantités de différents antigènes, modulant ainsi le rapport antigène/nOMV selon, par exemple, l'antigène choisi ou la nOMV utilisée.

Ainsi, selon des modes de réalisation supplémentaires, l'invention se rapporte à des conjugués de formule générale (II) dans lesquels Ag1 comprend le Hib et Ag2 comprend le Hia, où lesdits Ag1 et Ag2 sont chacun individuellement conjugués à un GMMA, de préférence un GMMA pertussique, de façon même davantage préférée par un lieur BS3. Dans encore d'autres modes de réalisation, l'invention se rapporte à des conjugués de formule générale (II) dans lesquels Ag1 comprend l'antigène 405 d'ETEC (FdeC, SEQ ID NO : 16) et Ag2 comprend l'antigène 3526 d'ETEC (SsIE, SEQ ID NO : 15), où lesdits Ag1 et Ag2 sont chacun indépendamment conjugués à un GMMA, de préférence un GMMA de *Shigella sonnei*, de façon même davantage préférée par un lieur BS3.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte aux conjugués de l'invention 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 pour la fabrication d'une composition immunogène.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à une composition immunogène, de préférence un vaccin, comprenant un conjugué de l'invention est au moins un support, un excipient ou un adjuvant pharmaceutiquement acceptable supplémentaire. Généralement, le support, l'excipient ou l'adjuvant pharmaceutiquement acceptable peut être toute substance qui n'induit pas elle-même la production d'anticorps nocifs envers le patient recevant la composition, et qui peut être administrée. Les supports et les excipients pharmaceutiquement acceptables sont ceux utilisés dans 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 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 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 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 (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.

L'invention fournit des conjugués de l'invention pour une utilisation en thérapie (par exemple, en tant que compositions immunogènes ou en tant que vaccins). L'invention fournit également un conjugué de l'invention pour une utilisation dans un procédé de production d'une réponse immunitaire chez un vertébré, de préférence un mammifère. L'invention fournit également l'utilisation d'un conjugué de l'invention dans la fabrication d'un médicament pour produire une réponse immunitaire chez un vertébré, de préférence un mammifère. Les utilisations et les 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 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, 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 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 mucosale. 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. L'invention peut être également utilisée pour déclencher une immunité systémique et/ou mucosale. Le traitement posologique peut être un calendrier d'une seule dose ou un calendrier de doses multiples. Les doses multiples 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 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 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 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 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 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 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 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 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), 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 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 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.).

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.

Les conjugués nOMV-lieur-antigène préférés de l'invention sont indiqués dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1

Conjugués préférés de l'invention

nOMV	Lieur	Antigène
Salmonella typhimurium	BS3	Pfs25 de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	Pfs25 de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	BS3	fHbp (*Neisseria meningitidis*)
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	fHbp (*Neisseria meningitidis*)
Salmonella typhimurium	BS3	RO6C de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	RO6C de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	BS3	CSP de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	CSP de *Plasmodium falciparum*
B méningococcique	BS3	fHbp (*Neisseria meningitidis*)
B méningococcique	$BS(PEG)_5$	fHbp (*Neisseria meningitidis*)

B méningococcique	BS3	NHBA (*Neisseria meningitidis*)
B méningococcique	$BS(PEG)_5$	NHBA (*Neisseria meningitidis*)
Salmonella typhimurium	BS3	PS synthétique ou natif de GAS
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	PS synthétique ou natif de GAS
Salmonella typhimurium	BS3	PS synthétique ou natif de GBS
B méningococcique	BS3	PS synthétique ou natif de GAS
B méningococcique	BS3	PS de Hib
B. pertussis	BS3	PS de Hib
Salmonella typhimurium	BS3	PS de Vi
Shigella	BS3	405 d'ETEC
Shigella	BS3	3526 d'ETEC
Shigella	BS3	CTF1232 d'ETEC
B méningococcique	SIDEA	Saccharide capsulaire de MenA
B méningococcique	SIDEA	Saccharide capsulaire de MenC

Ainsi, les présents conjugués sont particulièrement utiles en tant qu'agents immunogènes contre les pathogènes énumérés dans le tableau 1. En particulier, les données ont confirmé que les GMMA issus de MenB

conjugués à des saccharides capsulaires provenant de MenA et/ou MenC présentent des résultats de r/hSBA comparables voire même meilleurs que ceux obtenus en utilisant le CRM197 en tant que protéine de support. Les données de SBA en fait confirment la réponse immunogène contre MenA et MenC ainsi que contre MenB (voir en particulier les exemples 12, 13 et 14).

Ceci signifie que les présents conjugués peuvent être utilisés de façon appropriée pour la préparation d'une composition immunogène, ou d'un vaccin multivalent, par exemple, mais pas seulement, contre MenB et MenC et/ou MenA, comme il est décrit ici et supporté en détail.

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

Partie expérimentale

Exemple 1 - Production des nOMV

Les nOMV telles qu'utilisées dans les exemples sont des vésicules GMMA, préparées à partir de souches de *S.* typhimurium ou de *N. meningitidis* B, par exemple, telles que divulguées dans Clin Vaccine Immunol. Avril 2016 ; 23(4): 304-314. Les caractéristiques desdites nOMV étaient telles qu'indiquées dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2

Caractéristiques des nOMV purifiées préparées à partir de souches de *S.* typhimurium ou *N. meningitidis* B

	S. typhimurium 1418 (ΔtolR)	*S. typhimurium* 2192 (ΔtolR ΔpagP ΔmsbB)	*MenB* (ΔlΔxL1, AsynX, Δgna33 et ΔfHbp)
Diamètre (nm) par DDL	131,5	112,6	95,6
nmol de lipide A/mg de vésicules par HPLC-SEC/ semicarbazide	172,8	243,2	68,6
Rapport pondéral OAg/protéines totales	0,84	0,93	seul le LOS présent

Exemple 2 - Conjugaison des nOMV par l'intermédiaire du lieur BS3 (conjugaison de Pfs25-nOMV de *S. typhimurium*)

L'antigène paludéen Pfs25 a été conjugué aux vésicules de nOMV de *S.* typhimurium en suivant la procédure décrite ci-dessous. Les nOMV, à une concentration de protéine de 4 mg/ml dans 100 mM de tampon borate pH 9, ont été additionnées du lieur BS3 (48 mg/ml dans le mélange réactionnel). Le mélange a été incubé à la température contrôlée de 25 °C pendant 30 minutes. Après ce temps, les nOMV activées ont été purifiées par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C) et additionnées immédiatement de l'antigène Pfs25. Dans l'étape de conjugaison, il a été utilisé un rapport de 1/1 de nOMV/Pfs25, à une concentration de Pfs25 de 2,7 mg/ml dans du PBS avec incubation pendant une nuit à température ambiante. Le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C) et remis en suspension dans du PBS. La caractérisation par l'analyse SDS page/

Western blot a confirmé la formation du conjugué. L'analyse par un test ELISA par compétition a montré un rapport p/p de 19,2 % de Pfs25 sur les protéines totales dans le conjugué final. Les nOMV intermédiaires activées ont été caractérisées par 62 % de groupes NH_2 dérivatisés avec le lieur et 32 % de groupes esters actifs introduits sur les groupes NH_2 sur les nOMV. Aucune réticulation n'a été vérifiée dans les deux étapes d'activation des nOMV avec le BS3 et la conjugaison suivante, vérifiée par DDL.

Exemple 3 - v2 de fHbp lié aux nOMV de *S. typhimurium* par la chimie du BS3 (recyclage de la fHbp)

L'antigène v2 de fHbp a été conjugué aux nOMV de *S.* typhimurium par la chimie du BS3. La réaction a été effectuée en travaillant avec un rapport p/p de fHbp sur nOMV-BS3 de 1, une concentration de v2 de fHbp de 0,92 mg/ml dans du PBS. Un autre conjugué a été produit en recyclant le v2 de fHbp qui n'a pas réagi à partir du premier lot de conjugaison et en le réutilisant pour la conjugaison avec un lot frais de nOMV-BS3, en utilisant les mêmes conditions de conjugaison. L'analyse SDS PAGE/Western blot a confirmé la formation du conjugué également avec le v2 de fHbp recyclé.

Exemple 4 - CSP et $(NANP)_3$-SH liés aux nOMV de *S. typhimurium* par la chimie de SH-maléimido selon l'invention

Exemple 4.1 - Dérivatisation de la CSP avec le lieur ester de N-ε-maléimidocaproyl-oxysuccinimde (EMCS). La CSP à la concentration de 270 µg/ml dans du PBS a été

additionnée du lieur EMCS (sous la forme d'une solution à 10 mg/ml dans du DMSO) pour avoir un rapport molaire de 1/1 du lieur sur les résidus Lys de la protéine. La solution a été mélangée à TA pendant 4 heures et ensuite la protéine dérivatisée a été purifiée par une colonne PD10 contre du MES à 10 mM pH 6. Le produit résultant a été caractérisé par un test micro BCA (64 % de récupération).

Exemple 4.2 - Dérivatisation des nOMV de *S. typhimurium* avec le lieur SH.

Des nOMV ont été remises en suspension dans 100 mM de tampon borate pH 8 et additionnées du tampon d'activation contenant 2,6 mg/ml de DTT, 13,16 mg/ml d'EDTA et 7,04 mg/ml de lieur N-acétyl-DL-homocystéine thiolactone dans 100 mM de tampon borate pH 11. Les nOMV étaient à 2,3 mg/ml avec un rapport molaire du lieur sur les groupes NH_2 sur les GMMA égal à 7. Les nOMV-SH ont été purifiées par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 4 °C, 1 heure) et récupérées dans 100 mM de tampon MES pH 6. Les nOMV-SH ont été caractérisées par un test micro BCA (80 % de récupération de protéine) et du TNBS montrant que 54 % des groupes NH_2 ont été activés.

Exemple 4.3 - Dérivatisation des nOMV de *S. typhimurium* avec le lieur EMCS.

Des nOMV ont été remises en suspension dans 100 mM de NaPi pH 7,2 et additionnées du lieur EMCS (sous la forme d'une solution à 20 mg/ml dans du DMSO) pour avoir un rapport molaire de 0,6/1 du lieur sur les résidus Lys de la protéine et avec une concentration de nOMV de 3,94 mg/ml. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 4 heures et les nOMV-EMCS ont été purifiées par

ultracentrifugation (110 000 tr/min, 4 °C, 1 heure). Les nOMV dérivatisées ont été récupérées dans 100 mM de tampon MES pH 6. Les nOMV-EMCS ont été caractérisées par un test micro BCA (87 % de récupération de protéine) et des procédés colorimétriques au TNBS et Ellman pour estimer le % de groupes NH_2 activés (30 %).

Exemple 4.4 - Conjugaison de nOMV-SH avec la CSP-EMCS.

La protéine CSP, dérivatisée auparavant avec le lieur EMCS, a été conjuguée aux nOMV-SH. La conjugaison a été effectuée avec un rapport p/p de 1/1 des nOMV sur la CSP à une concentration de CSP de 96,7 µg/ml dans 100 mM de MES pH 6. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 4 heures et le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 4 °C, 1 heure) et récupéré dans du PBS. La quantité de CSP conjuguée par rapport à la teneur en protéines totales a été de 0,33 (p/p) évaluée par l'analyse HPLC-SEC du mélange de la conjugaison. L'analyse SDS PAGE/Western blot a confirmé la formation du conjugué.

Exemple 4.5 - Conjugaison des nOMV-EMCS avec le $(NANP)_3$-SH.

La protéine $(NANP)_3$-SH, comportant un résidu Cys terminal, a été ajoutée aux nOMV-EMCS dans du MES à 100 mM pH 6 à une concentration de 8,7 mg/ml et avec un rapport p/p de 1 par rapport aux nOMV. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 4 heures et le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 4 °C, 1 heure) et récupéré dans du PBS. La quantité de $(NANP)_3$ conjugué par rapport à la teneur en protéines totales a été de 0,31 (p/p) calculée par l'analyse Ellman

et HPAEC-PAD sur le conjugué. L'analyse SDS PAGE/Western a confirmé la formation du conjugué.

Exemple 5 - Immunogénicité des conjugués de l'exemple 4 chez des souris

Des souris ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec les conjugués nOMV-CSP et nOMV-$(NANP)_3$ préparés selon l'exemple 4. Comparativement au mélange physique nOMV + CSP, à 2 µg de CSP ou de $(NANP)_3$ par dose. Les titres en IgG anti-CSP ont été mesurés aux jours 0, 14, 28 et 42, et les résultats sont présentés sur la figure 1A.

Les deux conjugués de nOMV ont induit une réponse spécifique anti-CSP supérieure à la CSP mélangée physiquement avec les nOMV (test de Kruskal-Wallis avec analyse post-hoc de Dunn, $p = 0,002$ pour les nOMV-CSP et $p = 0,001$ pour les nOMV-$(NANP)_3$ respectivement au jour 42).

Les deux conjugués ont montré la capacité de stimuler la réponse (jour 14 à jour 42).

Les titres en IgG contre l'-OAg ont été également estimés. La présence de CSP ou de $(NANP)_3$ sur la surface des nOMV n'a pas eu d'impact sur la capacité des nOMV à induire une réponse en IgG anti-OAg (figure 1B).

Exemple 6 - v1.1 de fHbp lié aux nOMV de *S. typhimurium* par la chimie du SH-maléimido ou click

Exemple 6.1 - Dérivatisation des nOMV de *S. typhimurium* avec le lieur SH.

Des nOMV ont été mises en suspension dans 100 mM de tampon borate pH 8 et additionnées du tampon

d'activation contenant 2,6 mg/ml de DTT, 13,16 mg/ml d'EDTA et 7,04 mg/ml de lieur N-acétyl-DL-homocystéine thiolactone dans 100 mM de tampon borate pH 11. Les nOMV étaient à 3,0 mg/ml avec un rapport molaire du lieur sur les groupes NH_2 sur les nOMV égal à 6,63. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 4 heures et les nOMV-SH ont été ensuite purifiées par dialyse contre du tampon 50 mM de MES, 0,5 mM de DTT pH 6. Les nOMV-SH ont été caractérisées par le test de Lowry (75 % de récupération de protéine) et au TNBS montrant que 41 % des groupes NH_2 étaient activés.

Exemple 6.2 - Dérivatisation du v1.1 de fHbp avec le lieur ester de N-ε-maléimidocaproyl-oxysuccinimde (EMCS).

La fHbp à la concentration de 1,25 mg/ml dans du PBS a été additionnée du lieur EMCS (sous la forme d'une solution à 10 mg/ml dans du DMSO) pour avoir un rapport molaire de 0,2/1 du lieur sur les résidus Lys de la protéine. La solution a été mélangée à TA pendant 4,5 heures et ensuite la protéine dérivatisée a été purifiée par une colonne PD10 contre du MES à 10 mM pH 6. Le produit résultant a été caractérisé par un test micro BCA (95 % de récupération), l'analyse HPLC-SEC et SDS-PAGE ne montrant aucune agrégation de protéine par rapport à la protéine non dérivatisée et l'analyse MALDI-MS indiquant une moyenne de trois lieurs introduits par molécule de protéine.

Exemple 6.3 - Conjugaison des nOMV-SH avec la fHbp-EMCS.

La fHbp-EMCS a été conjuguée aux nOMV-SH. La conjugaison a été effectuée avec un rapport p/p de 2/1

des nOMV sur la fHbp à une concentration de fHbp de 2 mg/ml. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 5 heures et le conjugué a été purifié par Vivaspin 100k contre du PBS. La formation du conjugué a été confirmée par une analyse SDS page/Western blot.

Exemple 6.4 - Dérivatisation des nOMV de *S. typhimurium* avec le lieur alcyne.

Des nOMV ont été mises en suspension dans 100 mM de NaPi pH 7,2 et additionnées du lieur Click-Easy BCN ester de N-hydroxysuccinimide I (Berry Associates) à 25 mg/ml dans du DMSO. Les nOMV étaient à 8,9 mg/ml avec un rapport molaire du lieur sur les groupes NH_2 sur les GMMA égal à 0,6. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 4 heures et les nOMV-alcyne ont été ensuite purifiées par dialyse contre du NaPi à 100 mM pH 7,2. Les nOMV-alcyne ont été caractérisées par le test de Lowry (72 % de récupération de protéine) et au TNBS montrant que 40 % des groupes NH_2 étaient activés.

Exemple 6.5 - Dérivatisation du v1.1 de fHbp avec le lieur NHS-PEG_4-N_3.

La fHbp à la concentration de 1,25 mg/ml dans du PBS a été additionnée du lieur -N_3 (sous la forme d'une solution à 25 mg/ml dans du DMSO) pour avoir un rapport molaire de 0,2/1 du lieur sur les résidus Lys de la protéine. La solution a été mélangée à TA pendant 6 heures et ensuite la protéine dérivatisée a été purifiée par une colonne PD10 contre du NaPi à 10 mM pH 7,2. Le produit résultant a été caractérisé par un test micro BCA (87 % de récupération), une analyse HPLC-SEC et SDS-PAGE, ne montrant aucune agrégation de la protéine par rapport à la protéine non dérivatisée, et

une analyse MALDI-MS, indiquant une moyenne de deux lieurs introduits par molécule de protéine.

Exemple 6.6 - Conjugaison des nOMV-alcyne avec la fHbp-N_3.

La fHbp-N3 a été conjuguée aux nOMV-alcyne. La conjugaison a été effectuée avec un rapport p/p de 2/1 des nOMV sur la fHbp à une concentration de fHbp de 1,67 mg/ml. La réaction a été laissée se mélanger à TA pendant 5 heures et le conjugué a été purifié par Vivaspin 100k contre du PBS. La formation du conjugué a été vérifiée par une analyse SDS page/Western blot.

Exemple 7 - Immunogénicité des conjugués obtenus dans l'exemple 6 chez des souris

Des souris ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec les conjugués synthétisés comparativement à la fHbp seule, aux nOMV seules et à la fHbp mélangée physiquement avec les nOMV. 2,5 µg de protéines totales (1,75 µg de nOMV et 0,75 µg de fHbp, en supposant un rapport p/p de la fHbp sur les protéines totales dans les conjugués de 0,3) par dose ont été utilisés. Tous les antigènes ont été formulés avec de l'Alhydrogel à 0,7 mg/ml d'Al^{3+} et 10 mM d'histidine.

Les anticorps induits par les conjugués ont montré une large protection contre différentes souches méningococciques, avec une activité bactéricide supérieure comparativement à la fHbp recombinante seule ou mélangée physiquement avec les nOMV (tableau 3). Les sérums provenant des conjugués se sont également révélés bactéricides contre la souche de *S. typhimurium* de l'isolat clinique malawien invasif D23580 et pas

inférieurs aux nOMV seules en termes de réponse en IgG anti-OAg induite (tableau 3).

Tableau 3

Titres SBA contre différentes souches méningococciques de sérums groupés recueillis après immunisation avec des constructions de fHbp. Les souris ont été immunisées aux jours 0 et 28 avec 2,5 µg de protéines totales (1,75 µg de nOMV et 0,75 µg de fHbp, en supposant un rapport p/p de fHbp sur les protéines totales dans les conjugués de 0,3) formulées avec de l'Alhydrogel.

	Titres SBA contre des souches							
	Niga 16/09	Bufa 20030020	Cam2_09	Mali 4/11	B H44/76		B M6190	D23580
	fHbp ID 5		fHbp ID 9		fHbp ID 1			STm
Sérums	j42	j42	j42	j42	j14	j42	j42	j42
nOMV-SH-fHbp	32000	3600	2800	< 10	1000	> 163840	> 163840	66000
nOMV-click-fHbp	40000	7000	600	< 10	2800	> 163840	130000	17370
nOMV + fHbp	1800	< 10	< 10	< 10	40	> 163840	10000	365732
fHbp	2500	< 10	< 10	< 10	< 10	> 163840	2000	< 100
nOMV	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	73309

Exemple 8 - nOMV de MenB conjuguées à la protéine v3 de fHbp-SH par la chimie du BS3 (aucune formation d'agrégats après la conjugaison)

Des nOMV de MenB, à une concentration de protéine de 2,8 mg/ml dans 100 mM de tampon MES pH 6, ont été additionnées du lieur BS3 (50 mg/ml dans le mélange réactionnel). Le mélange a été incubé à la température contrôlée de 25 °C pendant 30 minutes. Après ce temps, les nOMV activées ont été purifiées par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C) et

additionnées immédiatement de v3 de fHbp-SH. Dans l'étape de conjugaison, un rapport p/p de 1/1 des nOMV sur la fHbp-SH a été utilisé, avec une concentration de nOMV de 1,7 mg/ml dans du PBS. Après mélange pendant une nuit à TA, le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C) et récupéré dans du PBS. La caractérisation par SDS page/Western blot a confirmé la formation du conjugué. Les nOMV-BS3 et le conjugué final ont été comparés aux nOMV natives par HPLC-SEC/MALS ne montrant aucune formation d'agrégats (tableau ci-dessous).

Echantillon	Rw (nm)
nOMV de MenB	44,1
nOMV de MenB-BS3	58,6
Conjugué nOMV de MenB-BS3-fHbp	54,0

Exemple 8a (comparatif) - Conjugaison de dOMV par l'intermédiaire du lieur BS3

Des dOMV (de MenB) ont été testées comme matériau de départ pour la réaction avec le lieur BS3, dans les conditions suivantes :

- pH : 6,5 ;
- concentration de BS3 : 50 mg/ml ;
- concentration de dOMV : 1,011 mg/ml ;
- temps de réaction de 30 min à 25 °C ;
- Purification par UC (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C).

La réaction fournit des agrégats de dOMV et des produits secondaires comme résultats principaux.

L'agrégation/réticulation été vérifiée par l'analyse DDL et SEC/MALS.

Exemple 9 - nOMV de *S. typhimurium* conjuguées à un PS de GAS

Le PS de GAS a été dérivatisé à son extrémité avec le lieur ADH avant la conjugaison aux nOMV. Le PS a été solubilisé dans de l'AcONa à 20 mM pH 4,5 à 30 mg/ml et additionné d'ADH et de $NaBH_3CN$ les deux dans un rapport p/p de 1/1 par rapport au PS. La solution a été mélangée à 30 °C pendant 5 jours. Après ce temps, le produit a été purifié par 2 colonnes PD10 contre du NaCl à 3 M et de l'eau, respectivement. Le PS-ADH a été caractérisé par HPAEC-PAD (78 % de récupération) et au TNBS, pour découvrir que toutes les chaînes du PS étaient activées avec le lieur ADH.

Des nOMV, à une concentration de protéine de 4,4 mg/ml dans 100 mM de tampon MES pH 6, ont été additionnées du lieur BS3 à 50 mg/ml dans le mélange réactionnel. Le mélange a été incubé à la température contrôlée de 25 °C pendant 30 minutes. Après ce temps, les nOMV activées ont été purifiées par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C) et additionnées immédiatement du PS de GAS-ADH. Dans l'étape de conjugaison, un rapport de 1/3 des nOMV sur le PS de GAS-ADH a été utilisé, avec la concentration de PS de GAS-ADH de 10 mg/ml dans du PBS. Après incubation pendant une nuit à TA, le conjugué a été purifié par ultracentrifugation (110 000 tr/min, 16 min, 4 °C) et récupéré dans du PBS. La caractérisation par un test micro BCA, une analyse HPAEC-PAD et NTA a permis

d'estimer une moyenne de 107 chaînes de PS par particule de nOMV.

Le même protocole de conjugaison a été appliqué pour conjuguer des oligosaccharides synthétiques de formule $(Rha)_4-(CH_2)_3-NH_2$ et $(Rha)_6-(CH_2)_3-NH_2$ aux nOMV. Les conjugués résultants ont présenté un nombre moyen de 876 et 640 chaînes oligosaccharidiques par particule de nOMV.

Exemple 10 - Données *in vivo* des conjugués de l'invention obtenus par conjugaison d'une particule de nOMV de *S. typhimurium* aux antigènes Pfs25 ou v2 de fHbp par la chimie du BS3

Des souris CD1 ont été immunisées par voie sous-cutanée aux jours 0 et 28 avec 2,5 µg de protéines totales de particules de nOMV de *S. typhimurium* conjuguées aux antigènes Pfs25 ou fHbp par la chimie du BS3. Tous les antigènes étaient adsorbés sur de l'Alhydrogel (0,7 mg/ml d'Al^{3+}). Les titres en IgG anti-Pfs25 (figure 2) et anti-v2 de fHbp (figure 3) ont été mesurés aux jours 0, 14, 27 and 42.

Comme il est démontré, les conjugués nOMV-BS3 ont été capables d'induire une réponse en IgG spécifiques anti-antigène élevée.

Exemple 11 - Préparation des conjugués MenA-GMMA-MenC par l'intermédiaire de lieurs SIDEA

Des GMMA de méningocoque B surexprimant la fHbp, à une concentration de protéine de 10 mg/ml dans 50 mM de tampon NaH_2PO_4 pH 7,2, ont été ajoutés simultanément à des saccharides de MenA et MenC (avDP 15), dérivatisés auparavant à leur extrémité avec le lieur SIDEA (Vaccine

1992 10(10): 691-698), avec un rapport p/p de MenA/MenC sur les nOMV de 10/1, selon des procédures connues dans l'art. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant une nuit. Après ce temps, le conjugué résultant a été purifié par ultracentrifugation (2x, 110 000 tr/min, 1 h, 4 °C) et mis en suspension dans du PBS. L'analyse par SDS PAGE/ Western blot a confirmé la formation du conjugué, avec les deux saccharides liés aux nOMV. Le conjugué a été caractérisé par un rapport p/p de MenA sur la protéine et un rapport de MenC sur la protéine de 0,10 et 0,12 respectivement, déterminés par une analyse HPAEC-PAD et micro BCA, avec 19,3 % de saccharide libre de MenA et 4,3 % de MenC respectivement (par analyse HPAEC-PAD après traitement par C4 SPE des conjugués).

Exemple 12 - Préparation des conjugués MenA-GMMA par l'intermédiaire du lieur SIDEA

Des GMMA de méningocoque B surexprimant la fHbp, à une concentration de protéine de 10 mg/ml dans 50 mM de tampon NaH_2PO_4 pH 7,2, ont été ajoutés au polysaccharide de MenA (avDP 15), dérivatisé auparavant à son extrémité par le lieur SIDEA (Vaccine 1992 10(10): 691-698), avec un rapport p/p de MenA sur les nOMV de 10/1, selon des procédures connues dans l'art. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant une nuit. Après ce temps, le conjugué résultant a été purifié par ultracentrifugation (2x, 110 000 tr/min, 1 h, 4 °C) et mis en suspension dans du PBS. L'analyse par SDS PAGE/Western blot a confirmé la formation du conjugué. Le conjugué a été caractérisé par un rapport p/p de MenA

sur la protéine de 0,054, déterminé par une analyse HPAEC-PAD et micro BCA, sans aucun MenA libre détecté par l'analyse HPAEC-PAD après traitement par C4 SPE du conjugué.

Exemple 13 - Préparation des conjugués MenC-GMMA par l'intermédiaire du lieur SIDEA

La même procédure que celle utilisée dans l'exemple 12 a été suivie pour la préparation du conjugué titre, en utilisant un antigène issu de MenC à la place de MenA. La caractérisation du conjugué est rapportée dans le tableau ci-dessous.

Conjugué	Rapport p/p OS/GMMA	Nombre d'OS par GMMA	µg/ml d'OS	µg/ml de GMMA	% d'OS libre
GMMA-MenA	0,054	2490	102,1	1901,6	Non détecté
GMMA-MenC	0,1	4523	195,1	1942,6	Non détecté
MenC-GMMA-MenA bivalent	0,103 (MenA) 0,12 (MenC)	3847 (MenA) 5168 (MenC)	151,3 (MenA) 176,3 (MenC)	1468,2	4,3 % d'OS libre de MenC, 19,3 % d'OS libre de MenA

Exemple 14 - Etude d'immunogénicité chez des souris

Des souris CD1 femelles âgées de 5 à 6 semaines (8 par groupe) ont été immunisées par voie intramusculaire aux jours 0 et 28 avec 1 µg de MenA ou MenC par dose. Les conjugués de GMMA ont été comparés aux conjugués

MenA-CRM197 ou MenC-CRM197, et à des GMMA mélangés physiquement aux polysaccharides de MenA ou MenC.

Tous les antigènes étaient adsorbés sur de l'Alhydrogel (0,7 mg/ml d'Al^{3+}). Les titres en IgG anti-MenA et MenC ont été mesurés aux jours -1, 27 et 42 (figure 2) et les titres SBA des sérums groupés provenant de chaque groupe au jour 42 ont été mesurés contre un panel de souches de MenA, MenC et MenB.

Exemple 14a - IgG/SBA anti-MenA

Réponse en IgG

Comme il est représenté sur la figure 4, l'étude d'immunogénicité chez des souris a montré que :

- une réponse en IgG anti-MenA supérieure est induite par le conjugué MenA-GMMA comparativement au MenA-CRM_{197} ;

- la conjugaison de MenA au GMMA amplifie la réponse immunitaire humorale contre le polysaccharide ;

- le conjugué bivalent induit une réponse en IgG anti-MenA comparable au conjugué MenA-GMMA, sans aucune interférence due à la présence de MenC sur les mêmes particules de GMMA.

SBA contre MenA

Antigène	Conjugué MenA-GMMA	Conjugué bivalent	PS de MenA + GMMA	GMMA	MenA-CRM_{197}
rSBA MenA souche F8238	262144	65536	1024	< 16	8192

Exemple 14b - IgG/SBA anti-MenC

Conjugués testés chez des souris

Réponse en IgG

Comme il est représenté sur la figure 5, l'étude d'immunogénicité chez des souris a montré que :

- une réponse en IgG anti-MenC similaire est induite par MenC-GMMA comparativement à MenC-CRM_{197}

- la conjugaison de MenC au GMMA amplifie la réponse immunitaire humorale contre l'OS

SBA contre MenC

Antigène	Conjugué MenA-GMMA	Conjugué bivalent	MenA PS + GMMA	GMMA	MenA-CRM_{197}
rSBA MenC souche C11	524288	262144	8192	4096	32768

Exemple 14c - SBA anti-MenB

SBA contre MenB pour les GMMA conjugués à MenA et/ou MenC

Antigène	MenB souche UK 320	MenB souche UK 104
Conjugué GMMA-MenA	16384	32768
Conjugué GMMA-MenC	32768	16384
Conjugué bivalent	1024	1024
GMMA	131072	65536

MenA-CRM	< 16	< 16
MenC-CRM	< 16	< 16

Les données ci-dessus montrent que la conjugaison d'un ou de plusieurs antigènes au même GMMA selon l'invention fournit encore un très bon profil immunogène des antigènes ou du GMMA. Ceci signifie que les présents conjugués ne présentent aucune interférence des antigènes, confirmant l'utilisation potentielle des conjugués pour la préparation d'une composition immunogène ou d'un vaccin polyvalent contre divers pathogènes.

Liste des séquences

>SEQ ID NO : 1 [v2 de fHbp]

VAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKN
DKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSGLGG
EHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELAAAELKA
DEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO : 2 [NHBA]

MFKRSVIAMACIFALSACGGGGGGSPDVKSADTLSKPAAPVVSEKETEAKEDAPQAGSQGQG
APSAQGSQDMAAVSEENTGNGGAVTADNPKNEDEVAQNDMPQNAAGTDSSTPNHTPDPNM
LAGNMENQATDAGESSQPANQPDMANAADGMQGDDPSAGGQNAGNTAAQGANQAGNNQA
AGSSDPIPASNPAPANGGSNFGRVDLANGVLIDGPSQNITLTHCKGDSCSGNNFLDEEVQLKS
EFEKLSDADKISNYKKDGKNDKFVGLVADSVQMKGINQYIIFYKPKPTSFARFRRSARSRRSLP
AEMPLIPVNQADTLIVDGEAVSLTGHSGNIFAPEGNYRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGEPAKGE
MLAGAAVYNGEVLHFHTENGRPYPTRGRFAAKVDFGSKSVDGIIDSGDDLHMGTQKFKAAIDG
NGFKGTWTENGSGDVSGKFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFGVFAGKKEQD

>SEQ ID NO : 3 [NadA]

MKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGTI
TQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALA
DTDAALDETTNALNKLGENITTFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKA
DEAVKTANEAKQTAEETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIA
TNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVGRFNVTAAVGGYKSESA
VAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVGVNYEW

>SEQ ID NO : 4 [NspA]

MKKALATLIALALPAAALAEGASGFYVQADAAHAKASSSLGSAKGFSPRISAGYRINDLRFAVDY
TRYKNYKAPSTDFKLYSIGASAIYDFDTQSPVKPYLGARLSLNRASVDLGGSDSFSQTSIGLGVL
TGVSYAVTPNVDLDAGYRYNYIGKVNTVKNVRSGELSAGVRVKF

>SEQ ID NO : 5 [NhhA]

MNKIYRIIWNSALNAWVVVSELTRNHTKRASATVKTAVLATLLFATVQASANNEEQEEDLYLDP
VQRTVAVLIVNSDKEGTGEKEKVEENSDWAVYFNEKGVLTAREITLKAGDNLKIKQNGTNFTYS
LKKDLTDLTSVGTEKLSFSANGNKVNITSDTKGLNFAKETAGTNGDTTVHLNGIGSTLTDTLLNT
GATTNVTNDNVTDDEKKRAASVKDVLNAGWNIKGVKPGTTASDNVDFVRTYDTVEFLSADTKT
TTVNVESKDNGKKTEVKIGAKTSVIKEKDGKLVTGKDKGENGSSTDEGEGLVTAKEVIDAVNKA
GWRMKTTTANGQTGQADKFETVTSGTNVTFASGKGTTATVSKDDQGNITVMYDVNVGDALNV
NQLQNSGWNLDSKAVAGSSGKVISGNVSPSKGKMDETVNINAGNNIEITRNGKNIDIATSMTPQ
FSSVSLGAGADAPTLSVDGDALNVGSKKDNKPVRITNVAPGVKEGDVTNVAQLKGVAQNLNN
RIDNVDGNARAGIAQAIATAGLVQAYLPGKSMMAIGGGTYRGEAGYAIGYSSISDGGNWIIKGT
ASGNSRGHFGASASVGYQW

>SEQ ID NO : 6 [App]

MKTTDKRTTETHRKAPKTGRIRFSPAYLAICLSFGILPQAWAGHTYFGINYQYYRDFAENKGKF
AVGAKDIEVYNKKGELVGKSMTKAPMIDFSVVSRNGVAALVGDQYIVSVAHNGGYNNVDFGAE
GRNPDQHRFTYKIVKRNNYKAGTKGHPYGGDYHMPRLHKFVTDAEPVEMTSYMDGRKYIDQN
NYPDRVRIGAGRQYWRSDEDEPNNRESSYHIASAYSWLVGGNTFAQNGSGGGTVNLGSEKIK
HSPYGFLPTGGSFGDSGSPMFIYDAQKQKWLINGVLQTGNPYIGKSNGFQLVRKDWFYDEIFA
GDTHSVFYEPRQNGKYSFNDDNNGTGKINAKHEHNSLPNRLKTRTVQLFNVSLSETAREPVYH
AAGGVNSYRPRLNNGENISFIDEGKGELILTSNINQGAGGLYFQGDFTVSPENNETWQGAGVHI
SEDSTVTWKVNGVANDRLSKIGKGTLHVQAKGENQGSISVGDGTVILDQQADDKGKKQAFSEI
GLVSGRGTVQLNADNQFNPDKLYFGFRGGRLDLNGHSLSFHRIQNTDEGAMIVNHNQDKEST
VTITGNKDIATTGNNNSLDSKKEIAYNGWFGEKDTTKTNGRLNLVYQPAAEDRTLLLSGGTNLN
GNITQTNGKLFFSGRPTPHAYNHLNDHWSQKEGIPRGEIVWDNDWINRTFKAENFQIKGGQAV

VSRNVAKVKGDWHLSNHAQAVFGVAPHQSHTICTRSDWTGLTNCVEKTITDDKVIASLTKTDIS
GNVDLADHAHLNLTGLATLNGNLSANGDTRYTVSHNATQNGNLSLVGNAQATFNQATLNGNT
SASGNASFNLSDHAVQNGSLTLSGNAKANVSHSALNGNVSLADKAVFHFESSRFTGQISGGKD
TALHLKDSEWTLPSGTELGNLNLDNATITLNSAYRHDAAGAQTGSATDAPRRRSRRSRRSLLS
VTPPTSVESRFNTLTVNGKLNGQGTFRFMSELFGYRSDKLKLAESSEGTYTLAVNNTGNEPAS
LEQLTVVEGKDNKPLSENLNFTLQNEHVDAGAWRYQLIRKDGEFRLHNPVKEQELSDKLGKAE
AKKQAEKDNAQSLDALIAAGRDAVEKTESVAEPARQAGGENVGIMQAEEEKKRVQADKDTALA
KQREAETRPATTAFPRARRARRDLPQLQPQPQPQPQRDLISRYANSGLSEFSATLNSVFAVQD
ELDRVFAEDRRNAVWTSGIRDTKHYRSQDFRAYRQQTDLRQIGMQKNLGSGRVGILFSHNRT
ENTFDDGIGNSARLAHGAVFGQYGIDRFYIGISAGAGFSSGSLSDGIGGKIRRRVLHYGIQARYR
AGFGGFGIEPHIGATRYFVQKADYRYENVNIATPGLAFNRYRAGIKADYSFKPAQHISITPYLSLS
YTDAASGKVRTRVNTAVLAQDFGKTRSAEWGVNAEIKGFTLSLHAAAAKGPQLEAQHSAGIKL
GYRW

>SEQ ID NO : 7 [fragment de NadA]

ATNDDDVKKAATVAIAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKK
VVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTF
AEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVD
AKVKAAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKDNIAKIKANSADVYTREESD
SKFVRIDGLNATTEKLDTRLASAEKSIADHDTRLNGLDKTVSDLRKETRQGLAEQAALSGLFQP
YNVG

>SEQ ID NO : 8 [v1 de fHbp]

VAADIGAGL ADALTAPLDH KDKGLQSLTL DQSVRKNEKL KLAAQGAEKT YGNGDSLNTG
KLKNDKVSRF DFIRQIEVDG QLITLESGEF QVYKQSHSAL TAFQTEQIQD SEHSGKMVAK
RQFRIGDIAG EHTSFDKLPE GGRATYRGTA FGSDDAGGKL TYTIDFAAKQ GNGKIEHLKS
PELNVDLAAA DIKPDGKRHA VISGSVLYNQ AEKGSYSLGI FGGKAQEVAG SAEVKTVNGI
RHIGLAAKQ

>SEQ ID NO : 9 [v3 de fHbp]

VAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSIPQNGTLTLSAQGAEKTFKAGDKDNSLNTGKL
KNDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNPDKTDSLINQRSFLVSGL
GGEHTAFNQLPGGKAEYHGKAFSSDDPNGRLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKTLEQNVELAAAEL
KADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

>SEQ ID NO : 10 [Pfs25]

KVTVDTVCKR GFLIQMSGHL ECKCENDLVL VNEETCEEKV LKCDEKTVNK PCGDFSKCIK IDGNPVSYAC KCNLGYDMVN NVCIPNECKQ VTCGNGKCIL DTSNPVKTGV CSCNIGKVPN VQDQNKCSKD GETKCSLKCL KEQETCKAVD GIYKCDCKDG FIIDQESSIC T

>SEQ ID NO : 11 [RO6C]

AERSTSENRNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIRGSNDKLNKNSEDVLEQSEKSLVSENV PSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNNGSKNESSDIISENNKSNKVQNHF ESLSDLELLENSSQDNLDKDTISTEPFPNQKHKDLQQDLNDEPLEPFPTQIHKDYKEKNLINEED SEPFPRQKHKKVDNHNEEKNVFHENGSANGNQGSLKLKSFDEHLKDEKIENEPLVHENLSIPN DPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPSLDLKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEIN HVQDHALPKENIIDKLDNQKEHIDQSQHNINVLQENNINNHQLEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPE NVETEEIIDDVPSPKHSNHETFEEETSESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDG NVSQNSNNELNENEFVESEKSEHEARSKPKYEKKVIHGCNFSSNVSSKHTFTDSLDISLVDDSA HISCNVHLSEPKYNHLVGLNCPGDIIPDCFFQVYQPESEELEPSNIVYLDSQINIGDIEYYEDAEG DDKIKLFGIVGSIPKTTSFTCICKKDKKSAYMTVTIDSARSHHHHHH

>SEQ ID NO : 12 [CSP]

MLFQEYQCYGSSSNTRVLNELNYDNAGTNLYNELEMNYYGKQENWYSLKKNSRSLGENDDG NNNNGDNGREGKDEDKRDGNNEDNEKLRKPKHKKLKQPGDGNPDPNANPNVDPNANPNVD

PNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANP NANPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPN ANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNKNNQGNGQGHNMPNDPNRNVDENANANNAVKN NNNEEPSDKHIEKYLKKIQNSLSTEWSPCSVTCGNGIQVRIKPGSANKPKDELDYENDIEKKICK MEKCSSVFNVVNSSIGLILEHHHHHH

>SEQ ID NO : 13 [(NANP)3]

NANPNANPNANP

>SEQ ID NO : 14 [CTF1232]

QDQRYISIRNTDTIWLPGNICAYQFRLDNGGNDEGFGPLTITLQLKDKYGQTLVTRKMETEAFG DSNATRTTDAFLETECVENVATTEIIKATEESNGHRVSLPLSVFDPQDYHPLLITVSGKNVNLEH HHHHH

>SEQ ID NO : 15 [3526, SsIE]

DTPSVDSGSGTLPEVKPDPTPTPEPTPEPTPDPEPTPDPTPDPEPTPEPEPEPVPTKTGYLTLG
GSQRVTGATCNGESSDGFTFTPGNTVSCVVGSTTIATFNTQSEAARSLRAVDKVSFSLEDAQE
LANSENKKTNAISLVTSSDSCPADAEQLCLTFSSVVDRARFEKLYKQIDLATDNFSKLVNEEVEN
NAATDKAPSTHTSTVVPVTTEGTKPDLNASFVSANAEQFYQYQPTEIILSEGQLVDSLGNGVAG
VDYYTNSGRGVTDENGKFSFSWGETISFGIDTFELGSVRGNKSTIALTELGDEVRGANIDQLIH
RYSTTGQNNTRVVPDDVRKVFAEYPNVINEIINLSLSNGATLDEGDQNVVLPNEFIEQFKTGQA
KEIDTAICAKTDGCNEARWFSLTTRNVNDGQIQGVINKLWGVDTNYQSVSKFHVFHDSTNFYG
STGNARGQAVVNISNSAFPILMARNDKNYWLAFGEKRAWDKNELAYITEAPSIVQPENVT
RDTATFNLPFISLGQVGEGKLMVIGNPHYNSILRCPNGYSWGGGVNSKGECTLSGDSDDM
KHFMQNVLRYLSNDIWQPNTKSIMTVGTNLENVYFKKAGQVLGNSAPFAFHEDFTGITVK
QLTSYGDLNPEEIPLLILNGFEYVTQWSGDPYAVPLRADTSKPKLTQQDVTDLIAYLNKG
GSVLIMENVMSNLKEESASSFVRLLDAAGLSMALNKSVVNNDPQGYPDRVRQRRATGIWV
YERYPAADGAQPPYTIDPNTGEVTWKYQQDNKPDDKPKLEVASWQEEVEGKQVTRYAFID
EAEYTTEESLEAAKAKIFEKFPGLQECKDSTYHYEINCLERRPGTDVPVTGGMYVPRYTQ
LNLDADTAKAMVQAADLGTNIQRLYQHELYFRTKGSKGERLNSVDLERLYQNMSVWLWND
TKYRYEEGKEDELGFKTFTEFLNCYANDAYAGGTKCSADLKKSLVDNNMIYGDGSSKAGM
MNPSYPLNYMEKPLTRLMLGRSWWDLNIKVDVEKYPGSVSAKGESVTENISLYSNPTKWF
AGNMQSTGLWAPAQQDVTIKSSASVPVTVTVALADDLTGREKHEVALNRPPRVTKTYTLE
ANGEVTFKVPYGGLIYIKGDSKDDVSANFTFTGVVKAPFYKDGEWKNDLDSPAPLGELES
ASFVYTTPKKNLEASNFTGGVAEFAKDLDTFASSMNDFYGRNDEDGKHRMFTYKNLTGHK
HRFTNDVQISIGDAHSGYPVMNSSFSTNSTTLPTTPLNDWLIWHEVGHNAAETPLNVPGA
TEVANNVLALYMQDRYLGKMNRVADDITVAPEYLDESNGQAWARGGAGDRLLMYAQLKEW
AEENFDIKQWYPDGELPKFYSDRKGMKGWNLFQLMHRKARGDDVGNSTFGGKNYCAESNG
NAADTLMLCASWVAQADLSEFFKKWNPGASAYQLPGATEMSFQGGVSSSAYSTLASLKLP
KPEKGPETINKVTEHKMSAE

>SEQ ID NO : 16 [405, FdeC]

VADGQQAYTLTLTAVDSEGNPVTGEASRLRLVPQDTNGVTVGAISEIKPGVYSATVSSTR
AGNVVVRAFSEQYQLGTLQQTLKFVAGPLDAAHSSITLNPDKPVVGGTVTAIWTAKDAND
NPVTGLNPDAPSLSGAAAAGSTASGWTDNGDGTWTAQISLGTTAGELDVMPKLNGQDAAA
NAAKVTVVADALSSNQSKVSVAEDHVKAGESTTVTLVAKDAHGNAISGLSLSASLTGTAS
EGATVSSWTEKGDGSYVATLTTGGKTGELRVMPLFNGQPAATEAAQLTVIAGEMSSANST
LVADNKTPTVKTTTELTFTMKDAYGNPVTGLKPDAPVFSGAASTGSERPSAGNWTEKGNG
VYVSTLTLGSAAGQLSVMPRVNGQNAVAQPLVLNVAGDASKAEIRDMTVKVNNQ

REVENDICATIONS

1. Conjugué immunogène comprenant une vésicule de membrane externe native (nOMV) comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à au moins un antigène par un lieur bivalent.

2. Conjugué immunogène selon la revendication 1, comprenant une nOMV comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à un premier antigène par un lieur bivalent, dans lequel ledit premier antigène est en outre connecté à un second antigène différent.

3. Conjugué immunogène selon la revendication 1, comprenant une nOMV comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à un premier antigène par un lieur bivalent, et au moins un autre groupement protéique de surface connecté à un second antigène différent par un lieur bivalent.

4. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ledit lieur bivalent a la formule générale (I) :

X-L-X' (I)

dans lequel :

X et X' sont différents l'un de l'autre ou identiques, et représentent un groupe fonctionnel capable de réagir sélectivement avec le résidu de protéine des nOMV d'une part et avec l'antigène d'autre part ;

-L- représente un groupe alkyle ou alcényle en C_1 à C_{15} linéaire ou ramifié bivalent éventuellement substitué,

et éventuellement interrompu par un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi : l'oxygène (-O-), le soufre (-S-), l'azote (-NH- ou un groupe -N- éventuellement substitué) et analogues.

5. Conjugué immunogène selon la revendication 4, dans lequel le lieur bivalent est un lieur homobifonctionnel ayant X = X'.

6. Conjugué immunogène selon la revendication 4, dans lequel ledit lieur bivalent est choisi parmi au moins l'un de : le glutarate de disuccinimidyle (DSG), le subérate de disuccinimidyle (DSS), 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-succinimidyl-oxycarbonyl-α-méthyl-α-(2-pyridyldithio)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-hydroxy-succinimide (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 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 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), le 6-[(iodoacétyl)amino]hexanoate de succinimidyle (SIAX) et l'iodoacétate de p-nitrophényle (NPIA), le N-hydroxysuccinimide, le N-oxysuccinimide et le diester de N-hydroxysuccinimide de l'acide adipique (SIDEA) et le subérate de bis(sulfosuccinimidyle) (BS3), des halogénures d'acryloyle (par exemple, le chlorure), l'éthylène glycol bis[succinate de succinimidyle], le bis(sulfosuccinimidyle)-tri(éthylène glycol) (BS(PEG)3), le bis(sulfosuccinimidyle)tétra(éthylène glycol) (BS(PEG)4), le bis(sulfosuccinimidyle)-penta(éthylène glycol) (BS(PEG)5) et le bis(sulfosuccinimidyle)-hexa(éthylène glycol) (BS(PEG)6), le dihydrazide de l'acide adipique (ADH), le groupe β-propionamido, la nitrophényl-éthylamine, les halogénures d'halogénoacyle, l'acide 6-aminocaproïque.

7. Conjugué immunogène selon la revendication 3, dans lequel ledit premier antigène comprend le Hib et ledit second antigène comprend le Hia, dans lequel lesdits premier et second antigènes sont chacun individuellement conjugués à une vésicule de GMMA pertussique par un lieur BS3.

8. Conjugué immunogène selon la revendication 3, dans lequel ledit premier antigène comprend l'antigène 405 d'ETEC et ledit second antigène comprend l'antigène 3526 d'ETEC, où lesdits premier et second agents sont

chacun individuellement conjugués à une vésicule GMMA de *Shigella sonnei* par un lieur BS3.

9. Conjugué immunogène selon les revendications précédentes, dans lequel ladite nOMV est obtenue par un procédé dépourvu de détergent, étant libérée dans le bouillon de 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).

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

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

12. Conjugué immunogène selon la revendication 1, dans lequel ladite nOMV, le lieur bivalent et l'antigène sont choisis comme suit :

nOMV	Lieur	Antigène
Salmonella typhimurium	BS3	Pfs25 de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	Pfs25 de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	BS3	fHbp (*Neisseria meningitidis*)
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	fHbp (*Neisseria meningitidis*)
Salmonella typhimurium	BS3	RO6C de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	RO6C de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	BS3	CSP de *Plasmodium falciparum*
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	CSP de *Plasmodium falciparum*
B méningococcique	BS3	fHbp (*Neisseria meningitidis*)
B méningococcique	$BS(PEG)_5$	fHbp (*Neisseria meningitidis*)

B méningococcique	BS3	NHBA (*Neisseria meningitidis*)
B méningococcique	$BS(PEG)_5$	NHBA (*Neisseria meningitidis*)
Salmonella typhimurium	BS3	PS synthétique ou natif de GAS
Salmonella typhimurium	$BS(PEG)_5$	PS synthétique ou natif de GAS
Salmonella typhimurium	BS3	PS synthétique ou natif de GBS
B méningococcique	BS3	PS synthétique ou natif de GAS
B méningococcique	BS3	PS de Hib
B. pertussis	BS3	PS de Hib
Salmonella typhimurium	BS3	PS de Vi
Shigella	BS3	405 d'ETEC
Shigella	BS3	3526 d'ETEC
Shigella	BS3	CTF1232 d'ETEC
B méningococcique	SIDEA	Saccharide capsulaire de MenA
B méningococcique	SIDEA	Saccharide capsulaire de MenC

13. Conjugué immunogène selon la revendication 12, dans lequel ladite nOMV, le lieur bivalent et l'antigène sont choisis comme suit :

B méningococcique	SIDEA	Saccharide capsulaire de MenA
B méningococcique	SIDEA	Saccharide capsulaire de MenC

14. Conjugué immunogène selon la revendication 3, comprenant une nOMV comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à un premier antigène par un lieur bivalent qui est le SIDEA, et au moins un autre groupement protéique de surface connecté à un second antigène différent par un lieur bivalent qui est le SIDEA ou le BS3.

15. Conjugué immunogène selon la revendication 3, comprenant une nOMV comportant au moins un groupement protéique de surface connecté à un premier antigène par un lieur bivalent qui est le BS3, et au moins un autre groupement protéique de surface connecté à un second antigène différent par un lieur bivalent qui est le BS3.

16. Conjugué immunogène selon les revendications 3, 14 ou 15, dans lequel ledit premier antigène comprend un oligomère de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe C (MenC), et ledit second antigène comprend un oligomère de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe A (MenA).

17. Conjugué immunogène selon la revendication 16, dans lequel ledit premier antigène comprenant un oligomère de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe C (MenC), et ledit second antigène comprenant un oligomère de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe A (MenA) sont

chacun individuellement connectés à une nOMV par un lieur SIDEA.

18. Conjugué immunogène selon les revendications 1 à 17, dans lequel ladite nOMV est une vésicule GMMA.

19. Conjugué immunogène selon les revendications 1 à 3 et 16 ou 17, dans lequel ladite nOMV est une vésicule GMMA obtenue à partir de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe B.

20. Conjugué immunogène selon la revendication 19, dans lequel ladite nOMV est une vésicule GMMA obtenue à partir de *Neisseria meningitidis* du sérogroupe B, de préférence exprimant les v2 et v3 de fHbp.

21. Procédé de préparation du conjugué immunogène selon les revendications 1 à 20, comprenant les étapes suivantes :

i) la réaction d'au moins un résidu de protéine de surface de nOMV avec la première partie terminale d'un lieur bivalent pour obtenir un intermédiaire nOMV-lieur ; et

ii) la réaction dudit intermédiaire nOMV-lieur avec au moins un antigène par l'intermédiaire de la seconde partie terminale du lieur bivalent, obtenant ainsi le conjugué nOMV-lieur-antigène.

22. Intermédiaire nOMV-lieur obtenu (ou pouvant être obtenu) par l'étape i) selon la revendication 21.

23. Utilisation de l'intermédiaire nOMV-lieur selon la revendication 22 pour la préparation du nOMV-lieur-antigène selon les revendications 1 à 20.

24. Composition immunogène comprenant un conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 et au

moins un support ou un excipient pharmaceutiquement acceptable.

25. Conjugué ou composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1-20 ou 24 pour utilisation en tant que médicament.

26. Conjugué ou composition immunogène pour une utilisation selon la revendication 25 pour induire une réponse immunitaire chez un vertébré.

27. Vaccin comprenant les conjugués immunogènes selon les revendications 1 à 20 ou la composition immunogène selon la revendication 24.

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

29. Utilisation de nOMV selon la revendication 28, où lesdits conjugués immunogènes sont tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 20.

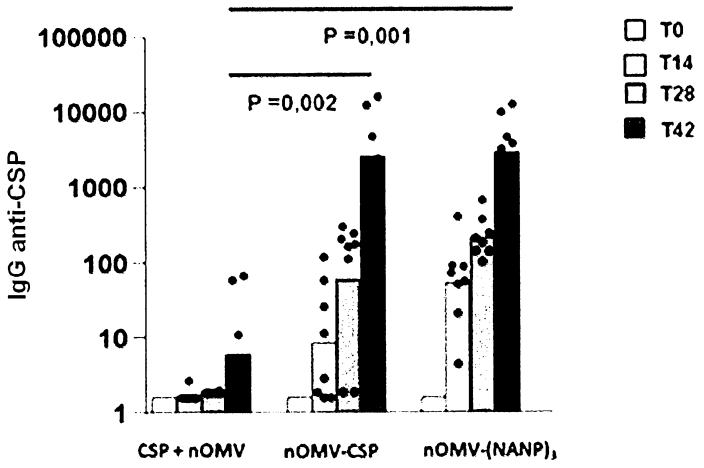

P =0,001
P =0,002
100000
10000
1000
100
10
1
IgG anti-CSP
T0
T14
T28
T42
CSP + nOMV
nOMV-CSP
nOMV-(NANP)3

Fig. 1A

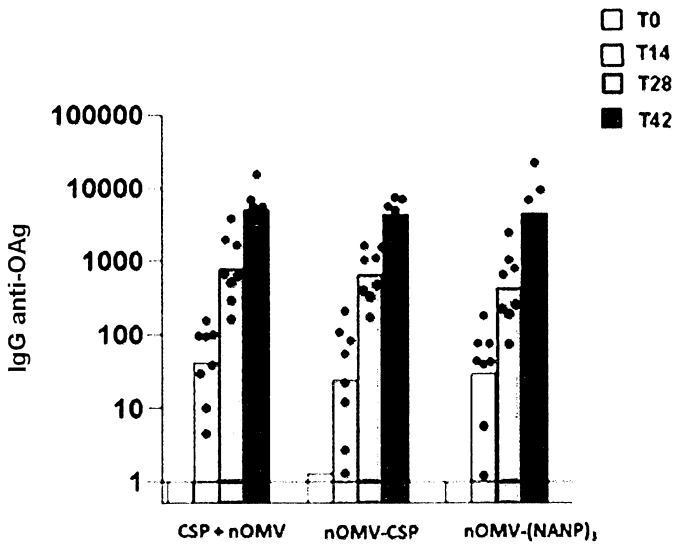

T0
T14
T28
T42
100000
10000
1000
100
10
1
IgG anti-OAg
CSP + nOMV
nOMV-CSP
nOMV-(NANP)3

Fig. 1B

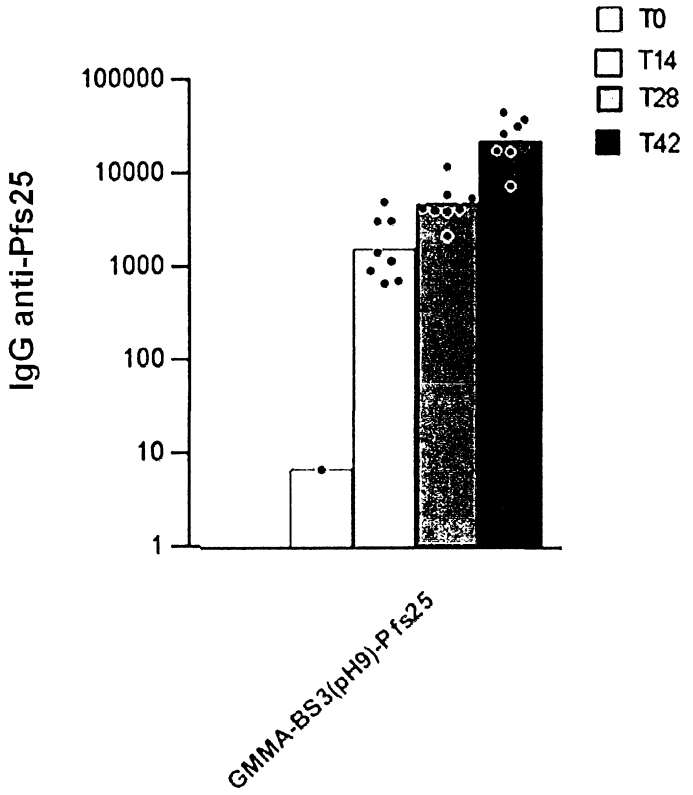

T0
T14
T28
T42
100000
10000
1000
100
10
1
IgG anti-Pfs25
GMMA-BS3(pH9)-Pfs25

Fig. 2

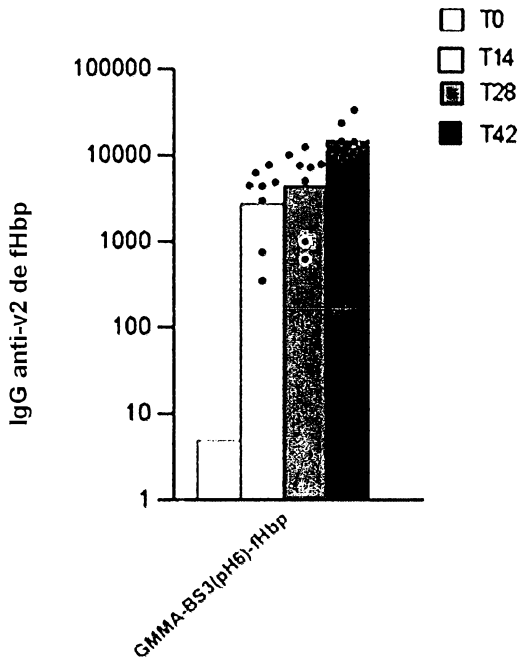

T0
T14
T28
T42
100000
10000
1000
100
10
1
IgG anti-v2 de fHbp
GMMA-BS3(pH6)-fHbp

Fig. 3

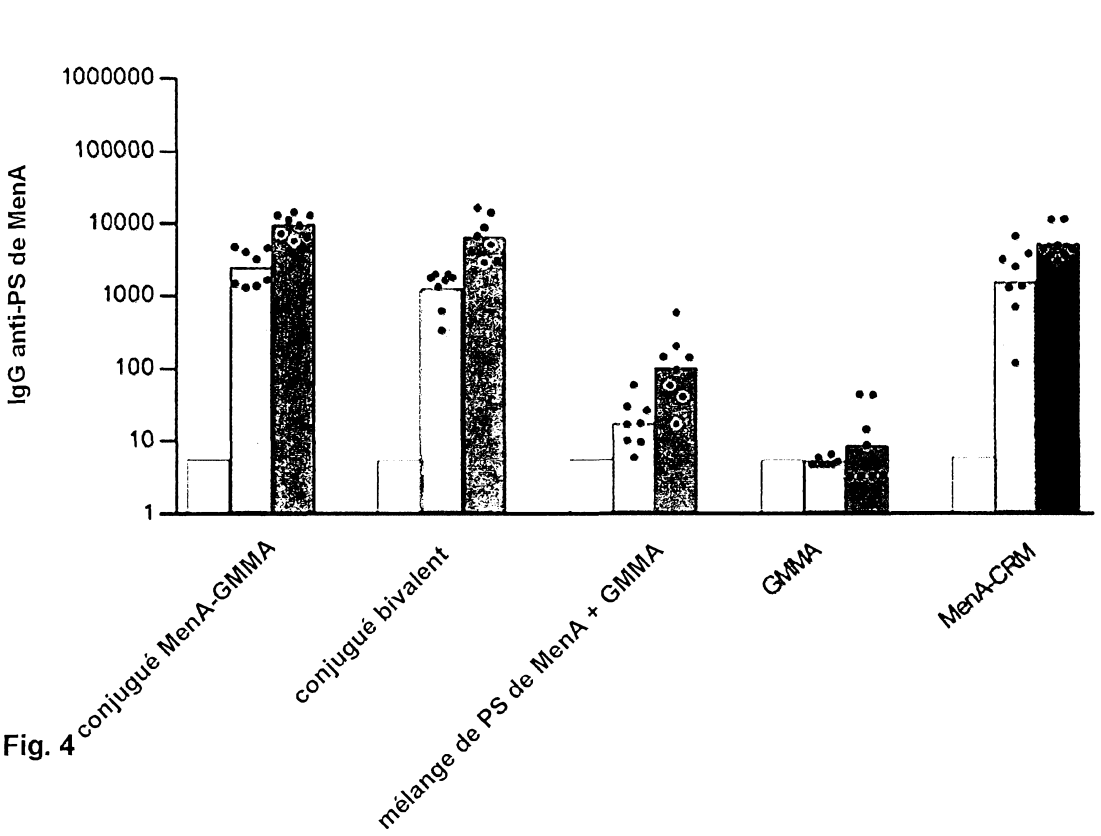

T-1
T27
T42
IgG anti-PS de MenA
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
conjugué MenA-GMMA
conjugué bivalent
mélange de PS de MenA + GMMA
GMMA
MenA-CRM

Fig. 4

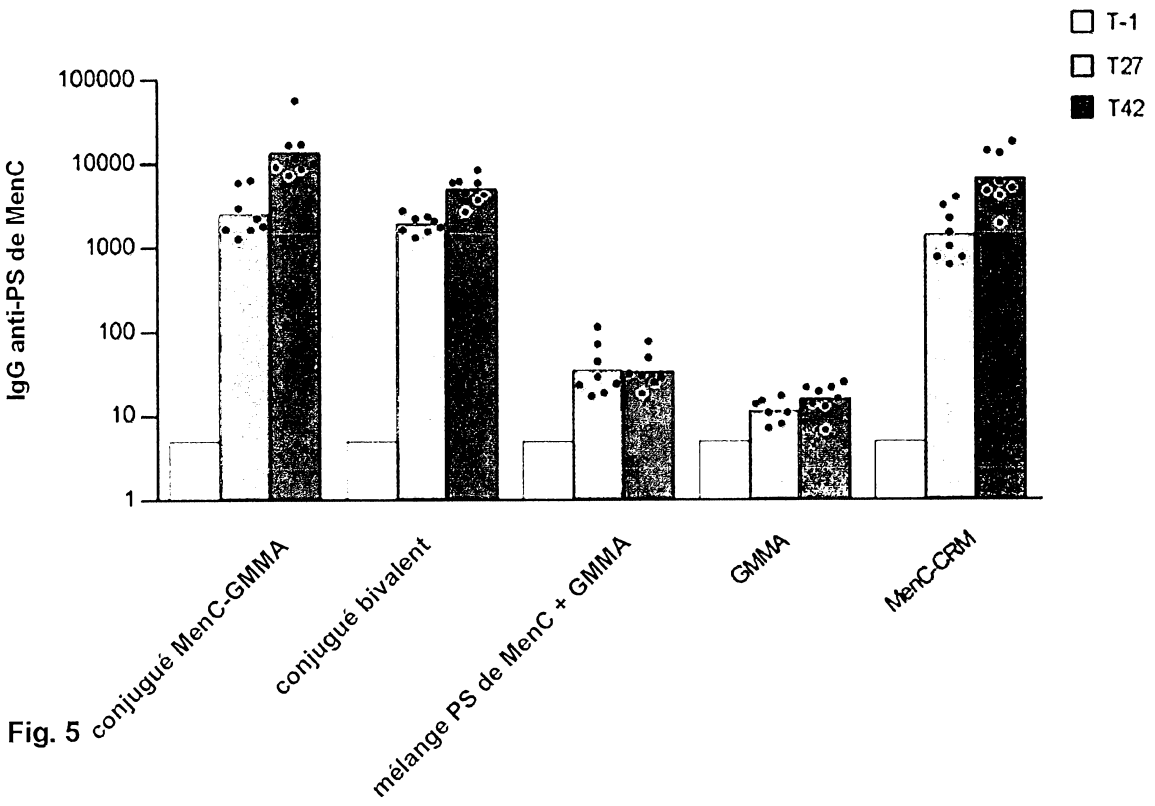

T-1
T27
T42
IgG anti-PS de MenC
100000
10000
1000
100
10
1
conjugué MenC-GMMA
conjugué bivalent
mélange PS de MenC + GMMA
GMMA
MenC-CRM

Fig. 5

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Numero de la demande nationale

BO 11603
BE 201705856

RAPPORT DE RECHERCHE

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

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	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] * alinéa [2.3.1] * * alinéa [0004] * * abrégé *	1-29	INV. A61K47/69
A,D	EP 0 467 714 A1 (MERCK & CO INC [US]) 22 janvier 1992 (1992-01-22) * page 1, ligne 1 - ligne 17 * * page 3, ligne 47 - ligne 59 * * revendications 1,9 *	1	
T	GERRITZEN MATTHIAS J H ET AL: "Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 35, no. 5, 15 mai 2017 (2017-05-15), pages 565-574, XP085118072, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2017.05.003 * page 569, colonne 1, alinéa 2.3. - alinéa 3. *		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K
X	WO 2016/083583 A1 (CRUCELL HOLLAND BV [NL]) 2 juin 2016 (2016-06-02) * page 2, alinéa 2 * * page 5, alinéa 1 *	1-4,6-8, 11-20, 22-29	

-/--

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
23 août 2018	Bonzano, Camilla

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

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Numero de la demande nationale

BO 11603
BE 201705856

RAPPORT DE RECHERCHE

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

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	WO 2016/184860 A1 (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRENTO [IT]) 24 novembre 2016 (2016-11-24) * revendications 1,3,11-14 * * page 18, ligne 26 - page 19, ligne 17 * * page 22, ligne 12 - page 23, ligne 12 * -----	1,4, 9-11,18, 22-29	
A	ROLANDO PAJON ET AL: "Mutant Native Outer Membrane Vesicles Combined with a Serogroup A Polysaccharide Conjugate Vaccine for Prevention of Meningococcal Epidemics in Africa", PLOS ONE, vol. 8, no. 6, 21 juin 2013 (2013-06-21), page e66536, XP055163430, DOI: 10.1371/journal.pone.0066536 * page 2, colonne 1, alinéa 5 - colonne 2, alinéa 3 * * page 218, colonne 1, alinéa 2 * -----	1,4-6, 9-11, 21-29	
X	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 * abrégé * -----	1,4-6, 9-11, 21-29	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)

-/--

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
23 août 2018	Bonzano, Camilla

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

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

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 11603
BE 201705856

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	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 * abrégé * -----	1-29	
X	FUKASAWA L O ET AL: "Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate", VACCINE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 23-24, 6 août 1999 (1999-08-06), pages 2951-2958, XP004173605, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00177-2 * page 5, colonne 1 * -----	1-29	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)

1

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
23 août 2018	Bonzano, Camilla

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

EPO FORM 1503 03.82 (P04C48)

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

BO 11603
BE 201705856

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.

23-08-2018

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0467714 A1	22-01-1992	EP 0467714 A1	22-01-1992
		IE 912559 A1	29-01-1992
WO 2016083583 A1	02-06-2016	AU 2015352404 A1	18-05-2017
		CA 2967139 A1	02-06-2016
		EP 3223847 A1	04-10-2017
		JP 2017536823 A	14-12-2017
		US 2017326220 A1	16-11-2017
		WO 2016083583 A1	02-06-2016
WO 2016184860 A1	24-11-2016	AU 2016262823 A1	07-12-2017
		EP 3298031 A1	28-03-2018
		WO 2016184860 A1	24-11-2016

OPINION ÉCRITE

Dossier N°	Date du dépot *(jour/mois/année)*	Date de priorité *(jour/mois/année)*	Demande n°
BO11603	23.11.2017	25.11.2016	BE201705856

Classification internationale des brevets (CIB)
INV. A61K47/69

Déposant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

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

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

	Examinateur
	Bonzano, Camilla

Demande n°

OPINION ÉCRITE

BE201705856

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.

2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :

   a. Nature de l'élément:

   ☒ un listage de la ou des séquences

   ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences

   b. Type de support:

   ☐ sur papier

   ☒ sous forme électronique

   c. Moment du dépôt ou de la remise:

   ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée

   ☒ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique

   ☐ remis ultérieurement

3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.

4. Commentaires complémentaires :

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

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	2, 3, 7, 8, 12-17, 19, 20
	Non :	Revendications	1, 4-6, 9-11, 18, 21-29
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-29
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-29
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Item V

1.La brevetabilité peut dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme brevetable l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première ou une deuxième utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

La brevetabilité, en particulier la nouveauté et l'activité inventive, des revendications 25,26 a été évaluée sur la base d'une revendication de produit proposée à une fin spécifique en prenant en considération les effets allégués du composé/de la composition.

2. 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 February 2015 (2015-02-01), pages 9-13, XP009503435,
ISSN: 2210-9099, DOI: 10.1016/J.PHRP.2014.10.012
[retrieved on 2014-12-18]

D2 EP 0 467 714 A1 (MERCK & CO INC [US]) 22 January 1992 (1992-01-22)cited in the application

D3 GERRITZEN MATTHIAS J H ET AL: "Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform",
BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB,
vol. 35, no. 5, 15 May 2017 (2017-05-15), pages 565-574, XP085118072,
ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2017.05.003

D4 WO 2016/083583 A1 (CRUCELL HOLLAND BV [NL]) 2 June 2016 (2016-06-02)

D5 WO 2016/184860 A1 (UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRENTO [IT]) 24 November 2016 (2016-11-24)

Nouveauté

3.1 D1 décrit un vaccin contre la brucellose comprenant une vésicule membranaire externe (OMV) de Neisseria meningitidis qui est conjuguée à des lipopolysaccharides de Brucella abortus. Le lieur («linker») est le carbodiimide. Le conjugué LPS-OMV relève de la définition de la présente revendication 1 et le carbodiimide tombe sous la définition de lieur divalent.

Le dihydrazide d'acide adipique est le linker, correspondant à la définition L de la présente revendication 4 et les deux groupes hydrazides CONNH2 correspondent à la définition de X et X ', où X et X' sont identiques.

Le conjugué est décrit comme étant immunogène chez la souris et il est dit dans la conclusion de D1 qu'il peut être utilisé comme vaccin contre la brucellose.

La revendication 9 définit un produit par procédé. L'attention du demandeur est attirée sur le fait que les revendications de produit par procédé doivent être limitées aux cas où une autre définition du produit n'est pas possible. Il semble que, dans le cas présent, le produit divulgué dans D1 puisse être obtenu par le procédé de la présente revendication 9 et que le procédé pour l'obtenir ne puisse donc pas être considéré comme une caractéristique technique distinctive du produit présent par rapport au produit de D1.

L'objet des revendications 1, 4, 5, 9-11, 21-29 n'est pas nouveau par rapport à D1.

3.2 D4 décrit des vaccins de l'art antérieur qui sont à base de vésicules à membrane externe (OMV) de type sauvage qui sont produites naturellement par les méningocoques. Ils ont une protéine de surface qui induit une réponse immunogène et protectrice, en particulier contre la porine A immunodominante et variable (PorA). Les vaccins selon D4 sont différents: ils comprennent des vésicules de membrane externe provenant d'au moins six souches de MenB différentes ayant un sous-ensemble particulier optimal de variants de la région variable PorA 2 (VR2) et des VR FrpB. Les antigènes sont exprimés sur les vésicules et sont par conséquent liés aux protéines de surface relevant de la présente revendication 1. Ils sont utilisés comme vaccins, car capables de fournir une large couverture contre des souches MenB pathogènes connues.

L'objet des revendications 1, 4, 11, 22 et 29 n'est pas nouveau.

3.3 D5 décrit une vésicule de membrane externe bactérienne isolée comprenant une protéine de fusion, dans laquelle ladite protéine de fusion porte un antigène tumoral unique ou la vésicule de membrane externe comprend une pluralité de protéines de fusion portant différents antigènes tumoraux. Le mot "porte" signifie qu'il existe un lien entre la protéine de la vésicule et l'antigène. Parmi les antigènes, des antigènes hétérologues provenant de streptocoques du groupe A et de streptocoques du groupe

B sont décrits dans la partie de fond, page 4, troisième paragraphe, qui ont été délivrés dans la lumière de vésicules de E. coli en fusionnant leurs séquences codant avec le peptide leader de E. coli. OmpA.

La divulgation de D5 concerne les vésicules bactériennes à membrane externe (OMV) chargées d'antigènes tumoraux fusionnés à des protéines bactériennes appropriées, capables d'induire une réponse immunitaire spécifique à l'antigène. En particulier, il a été observé que les protéines bactériennes suivantes: protéine de liaison du facteur H (fHbp), protéine de liaison du maltose (MBP) et protéine de membrane externe F (Omp-F), sont capables de délivrer l'antigène tumoral au compartiment de la membrane externe. exposer correctement l'antigène sur la surface vésiculaire. De préférence, dans la protéine de fusion, l'extrémité carboxyle de la protéine bactérienne est liée à l'extrémité amino-terminale de l'antigène tumoral, directement ou par interposition d'un lieur peptidique. Le linker est une séquence peptidique.

L'OMV peut être isolé et purifié à partir de Escherichia, Shigella, Neisseria, Moraxella, Bordetella, Borrelia, Brucella, Chlamydia, Haemophilus, Legionella, Pseudomonas, Yersinia, Helicobacter. Salmonella, Vibrio, etc. Par exemple, les vésicules peuvent provenir de Bordetella pertussis. Shigella, salmonella, Bordetella pertussis sont mentionnées dans la présente revendication 12.

L'objet des revendications 1, 4, 9, 11, 18, 22, 29 n'est pas nouveau.

3.4 D7 décrit des anticorps monoclonaux murins (mAbs) générés en utilisant Neisseria meningitidis du groupe B (l'un des antigènes selon la présente revendication 12) et les polysaccharides KI d'Escherichia coli (PS) conjugués à des vésicules membranaires externes (OMV) via le dihydrazide d'acide adipique. Les OMV sont préparés à partir du méningocoque PS du groupe B, selon la présente revendication 12. Le dihydrazide d'acide adipique (ADH) de liaison est envisagé dans la revendication 6, à la fin de la liste des lieurs.

L'objet des revendications 1,4-6,9-11,21-29 n'est pas nouveau.

3,5 D8 divulgue des vaccins contre le méningocoque. Les polysaccharides obtenus à partir du groupe B de la méningite à Neisseria (qui seraient identiques à ceux d'Escherichia coli) ont été conjugués à divers supports protéiques, tels que les vésicules de la membrane externe du méningocoque du groupe B de la souche M986 de Neisseria.

D9 décrit un conjugué de l'antigène Neisseria meningitidis polysaccharide du sérogroupe C (PS C) conjugué aux vésicules de la membrane externe du sérogroupe B (OMV). Le conjugué a été préparé avec du dihydrazide d'acide adipique (ADH-Sigma) en tant que lieur et du 1-éthyl-3- (3diméthylamino-propyl) carbodiimide

(EDAC-Sigma) en tant que réactif de couplage. Neisseria meningitidis OMV est décrit comme porteur protéique connu d'un vaccin polysaccharidique Hemophilus influenzae de type b et d'un vaccin antipneumococcique conjugué.

L'objet des revendications 1, 4-6, 9-11, 21-29 n'est pas nouveau par rapport à D8, D9.

3.6 Les documents suivants ne détruisent pas la nouveauté.

D2 décrit OMPC (complexe protéique de membrane externe) de Neisseria meningitidis et son utilisation réussie pour induire des réponses anticorpales chez l'homme lorsque la protéine de l'OMPC est couplée chimiquement à des antigènes indépendants des cellules T, notamment des polysaccharides bactériens. L'une des protéines des vésicules, appelée MIEP, est couplée chimiquement au polysaccharide bactérien. Cependant, la protéine est obtenue par lyse des vésicules, donc la vésicule ne fait pas partie du produit décrit dans D2.

D6 décrit un vaccin NOMV préparé à partir d'une souche MenB mutante selon la revendication 12, surexprimant également l'antigène fHbp selon la revendication 12. La différence de la présente invention par rapport à D6 est la présence d'un lieur entre le même OMV et le même l'antigène, plus particulièrement l'un des lieurs difonctionnels revendiqués. D3 est un article de journal publié après la date de priorité valide de la présente demande. Il est donc trop tard et non pertinent.

Activité inventive

4. En cas de rétablissement de la nouveauté, une activité inventive doit être démontrée en ce qui concerne D1, D4, D8 ou D9 en tant que art antérieure la plus proche, car l'utilisation de lieurs différents semble évidente lors de la connexion des OMV et antigènes connus.

En particulier, il semble évident de changer OVMV et les antigènes et de les lier comme dans l'art antérieur, en attendant du conjugué une activité en tant que vaccin.

Les données expérimentales semblent montrer l'immunogénité de certains des composés conjugués revendiqués. Cependant, en l'absence d'un effet surprenant par rapport à l'art antérieur, il semble évident qu'il serait souhaitable de changer la vésicule bactérienne ou de changer le lieur ou l'antigène et de toujours attendre une activité immunogène du conjugué.