

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
9 octobre 2014 (09.10.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/162102 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 9/82 (2006.01) *A61P 31/06* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/04* (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050806

(22) Date de dépôt international :
3 avril 2014 (03.04.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1353042 4 avril 2013 (04.04.2013) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE PAUL SABATIER TOU-
LOUSE III [FR/FR]; 118, Route de Narbonne, F-31062
Toulouse Cedex 9 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-
Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs : GOUZY, Alexandre; 7, rue Henri de Sa-
huque, F-31400 Toulouse (FR). POQUET, Yannick; 11
Lotissement le Bellevue, F-Pompertuzat 31450 (FR).
NEYROLLES, Olivier; 2, chemin de Vigoulet Auzil, F-
31120 Portet sur Garonne (FR).

(74) Mandataires : GROSSET-FOURNIER, Chantal et al.;
GROSSET-FOURNIER & DEMACHY, 54, rue Saint-La-
zare, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des sé-
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : NOVEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TARGET AND USE THEREOF IN THE SCREENING OF ANTI-TUBERCULOSIS DRUGS

(54) Titre : NOUVELLE CIBLE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET SON UTILISATION DANS LE CRIBLAGE DE MEDICAMENTS CONTRE LA TUBERCULOSE

(57) Abstract : The invention relates to a novel *Mycobacterium tuberculosis* target and to the use thereof in the screening of anti-tu-
berculosis drugs, more specifically a recombinant asparaginase of *Mycobacterium tuberculosis*, an inhibitor of this protein, and to a
screening method for selecting said inhibitor. The invention also relates to a mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle cible de *Mycobacterium tuberculosis* et son utilisation dans le criblage
de médicaments contre la tuberculose, plus précisément concerne une asparaginase recombinante de *Mycobacterium tuberculosis*, un
inhibiteur de ladite protéine, ainsi qu'une méthode de criblage pour sélectionner ledit inhibiteur. La présente invention propose éga-
lement une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis*.



WO 2014/162102 A1

NOUVELLE CIBLE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET SON UTILISATION DANS LE CRIBLAGE
DE MEDICAMENTS CONTRE LA TUBERCULOSE

La présente invention concerne une nouvelle cible de *Mycobacterium tuberculosis* et son utilisation dans le criblage de médicaments contre la tuberculose, plus précisément concerne une asparaginase recombinante de *Mycobacterium tuberculosis*, un inhibiteur de ladite protéine, ainsi qu'une méthode de criblage pour sélectionner ledit inhibiteur. La présente invention propose également une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculose, maladie infectieuse causée principalement par *Mycobacterium tuberculosis*, est responsable de près de 1,5 millions de décès chaque année dans le monde et on estime qu'un tiers de la population mondiale est infecté. Le traitement actuel consiste en une quadrithérapie (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide, ethambutol) pendant deux mois, suivi d'une bithérapie (isoniazide, rifampicine) pendant 4 mois. Ce traitement est donc long et contraignant. Par ailleurs, il n'est adapté qu'au traitement des tuberculoses dues à des souches sensibles aux antibiotiques. L'émergence de souches multi-résistantes et extrêmement résistantes a obligé les autorités de santé publique à implémenter un traitement renforcé incluant des antibiotiques de seconde intention (aminoglycosides, fluoroquinolones etc).

Cette lourdeur du traitement et l'émergence de souches résistantes obligent au développement de nouveaux antibiotiques contre la tuberculose, dirigés contre de nouvelles cibles.

Les cibles connues des molécules antituberculeuses sont nombreuses, par exemple les ribosomes, notamment les ARN polymérases (Kim et al., 2011, *Nucleic Acid Research*, vol. 39, No.6), ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse de composés de l'enveloppe des bactéries ou la croissance des bactéries, tels que la protéine ESX-3 qui est responsable de l'acquisition de fer et de zinc par des bactéries (Serafini et al., 2009, *J. Bacteriol.*, 191, 6340-6344), ou la protéine CarD qui contrôle la transcription d'ARNr (Stallings et al., 2009, *Cell*, 138, 146-159).

Cependant, les antibiotiques visant ces cibles exigent des polythérapies très longues (6-8 mois dans le meilleur des cas).

Il est nécessaire de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques car des souches résistantes aux antibiotiques couramment utilisés apparaissent (mutées sur les gènes cibles de ces antibiotiques).

Par conséquent, il est nécessaire et urgent d'identifier de nouvelles cibles antituberculeuses chez *M. tuberculosis* et de développer des antibiotiques agissant spécifiquement sur ces cibles, seuls ou en combinaison avec les antibiotiques existants.

Une asparaginase est capable d'hydrolyser l'asparagine en aspartate et ammonium, ce qui permet aux bactéries d'utiliser l'asparagine comme source d'azote et de carbone.

Bien que la séquence de l'enzyme Ans A chez *Mycobacterium tuberculosis* soit connue (AnsA/Rv1538c (TubercuList), Malen et al., 2010, *BMC Microbiol.* 10:132) et qu'elle soit annotée comme étant une asparaginase, aucun travaux scientifique antérieur permet de montrer la présence effective d'une asparaginase chez *Mycobacterium tuberculosis* et l'activité enzymatique de la protéine prédictive Rv1538c.

La présente invention repose sur la constatation pour la première fois faite par les Inventeurs que l'enzyme AnsA de *Mycobacterium tuberculosis* est requise pour la colonisation du poumon par ces bactéries et que l'inactivation de cette enzyme permet d'atténuer ces bactéries. Par ailleurs, AnsA n'a pas d'homologue chez l'homme, ce qui permet à ce gène ainsi que la protéine codée par ce gène de devenir une cible spécifique pour développer de nouveaux antibiotiques.

La présente invention a pour objet une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* dans laquelle l'activité de l'asparaginase est absente ou réduite.

La présente invention concerne une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* dont la virulence est inférieure à celle de la souche sauvage correspondante, le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 étant inactivé ou l'expression de la protéine codée par le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 étant inactivée dans ladite souche mutante.

On entend par « une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* dont la virulence est inférieure à celle de la souche sauvage » une souche induisant une charge bactérienne pulmonaire significativement plus faible que celle induite par la souche sauvage chez la souris après 3 semaines d'infection.

Une valeur est considérée comme étant significative lorsque la valeur P est inférieure à 0.05 selon le test statistique de Student (test t).

On entend par l'expression « le gène *ansA*...étant inactivé » le fait qu'une mutation, une délétion ou une insertion d'un ou plusieurs nucléotides est présente à l'intérieur du gène

ansA représenté par SEQ ID NO : 2 et qu'elle inhibe la transcription de l'ARN messager dudit gène.

L'inactivation du gène *ansA* peut être mise en œuvre par toutes les méthodes de mutagenèse connues dans l'art antérieur, notamment par l'insertion d'un transposon, par la recombinaison homologue ou par approche utilisant des phages

Dans ce mode de réalisation, le gène *ansA* est interrompu, modifié ou supprimé et la transcription de l'ARN messager de *ansA* n'a pas lieu ou ne peut pas aboutir.

Dans un autre mode de réalisation, la protéine AnsA n'est pas exprimée chez *Mycobacterium tuberculosis*, alors que le gène *ansA* est intact dans le génome de ladite bactérie.

On entend par « l'expression de la protéine...étant inactivée » le fait que l'ARN messager du gène *ansA* est inactivé ou déstabilisé, par une régulation post-transcriptionnelle de l'ARN messager, ou qu'une protéine tronquée ou non fonctionnelle est produite ou que la protéine correctement traduite est déstabilisée par une régulation post-traductionnelle, par exemple la protéolyse.

Une régulation post-transcriptionnelle peut être effectuée par la technique telle que siARN, miARN ou ARN antisens.

Le gène de séquence SEQ ID NO : 2 code l'asparaginase naturelle de *Mycobacterium tuberculosis* représentée par la séquence SEQ ID NO : 3.

En effet, contre toute attente, Ans A n'est pas une protéine essentielle à la vie de la bactérie, elle participe seulement à sa virulence. Par conséquent, l'inactivation de cette protéine permet de diminuer le nombre de mutants résistants pouvant apparaître (pression de sélection moins forte) et faciliter l'élimination du pathogène par le système immunitaire.

Selon un mode de réalisation particulier, la virulence de la souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* est déterminée par infection de souris par voie intranasale et mesure de la charge bactérienne pulmonaire à différents temps après infection.

La charge bactérienne pulmonaire est mesurée par étalement sur milieu gélosé.

Dans un mode de réalisation particulier d'une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* selon l'invention, le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 est supprimé du génome de ladite souche mutante.

La suppression du gène peut être obtenue, à titre d'exemple, par la recombinaison homologue.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, ladite souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* est la souche déposée à la CNCM le 21 mars 2013 sous le numéro : CNCM I-4724.

5 Dans un autre mode de réalisation particulier d'une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* selon l'invention, le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 est présent dans le génome de la dite souche mutante, mais inactivé.

Cette inactivation peut être due à une modification ou interruption du gène, par à titre d'exemple un transposon ou une mutagenèse dirigée par PCR.

10 La présente invention a également pour objectif de fournir une composition immunogène comprenant une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* susmentionnée.

La présente invention a aussi pour objet une composition pharmaceutique comprenant à titre de substance active, une souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* susmentionnée, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 Ladite composition pharmaceutique peut être utilisée dans le traitement ou la prévention de la tuberculose, notamment la tuberculose liée à l'infection de *Mycobacterium tuberculosis*.

Dans un mode de réalisation avantageux, ladite composition pharmaceutique est une composition vaccinale contre la tuberculose.

20 Dans un mode de réalisation avantageux, ladite composition pharmaceutique ou vaccinale comprend une souche mutant déposée le 21 mars 2013 sous le numéro CNCM I-4724.

Ladite composition pharmaceutique ou vaccinale peut être une solution à pH neutre, notamment de pH 7.0 à 8.0, notamment de pH 7.4 à 7.6.

25 Ladite composition pharmaceutique ou vaccinale peut être en poudre lyophilisée. La solution est préparée juste avant l'administration.

Ladite composition pharmaceutique ou vaccinale convient d'être administrée à une dose permettant de provoquer une réponse immunitaire protectrice contre la tuberculose sans développement de ladite maladie.

30 Dans un mode de réalisation particulier, la dose administrable de ladite composition pharmaceutique ou vaccinale est une dose unitaire de 10^5 à 10^6 CFUs selon l'âge de la personne à vacciner.

La présente invention a également pour objet un kit contenant une composition pharmaceutique susmentionnée et un antibiotique connu dans le traitement de la tuberculose.

Un kit selon la présente invention comprend :

- une composition pharmaceutique ou vaccinale susmentionnée, et
- un antibiotique choisi parmi ethambutol, isoniazide, pyrazinamide, rifampicine, acide p-aminosalicylique, amikacine, kanamycine, capreomycine, ciprofloxacine, levofloxacine, moxifloxacine, ethionamide, rifabutine,

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement de la tuberculose, notamment la tuberculose liée à l'infection de *Mycobacterium tuberculosis*.

Dans un mode de réalisation particulier, un kit selon la présente invention comprend :

- une composition pharmaceutique ou vaccinale comprenant la souche mutant déposée à la CNCM sous le numéro CNCM I-4724 le 21 mars 2013, et
- un antibiotique choisi parmi ethambutol, isoniazide, pyrazinamide, rifampicine, acide p-aminosalicylique, amikacine, kanamycine, capreomycine, ciprofloxacine, levofloxacine, moxifloxacine, ethionamide, rifabutine

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, pour la prévention et/ou le traitement de la tuberculose, notamment la tuberculose liée à l'infection de *Mycobacterium tuberculosis*.

La présente invention a également pour objectif de mettre à disposition une asparaginase recombinante de *Mycobacterium tuberculosis*.

Plus particulièrement, la présente invention concerne une protéine recombinante représentée par la séquence SEQ ID NO : 1.

Ladite protéine recombinante comporte un tag His6 permettant la purification de ladite protéine par une colonne de purification, telle qu'une colonne Ni-NTA, et son suivi par microscopie en utilisant un anticorps anti-HIS6.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir une méthode de criblage d'un inhibiteur de l'asparaginase de *M. tuberculosis* représentée par la séquence SEQ ID NO : 1.

La protéine recombinante de l'asparaginase de la présente invention, notamment la protéine recombinante de la séquence SEQ ID NO : 1, permet de mettre en œuvre la méthode de criblage d'inhibiteur de cette protéine dans des essais à haut débit.

La méthode de criblage de la présente invention comprend :

- (i) la mise en contact de la protéine recombinante de séquence SEQ ID NO : 1 avec l'asparagine dans une solution réactionnelle en présence d'une molécule issue d'une banque de molécules chimiques,
- (ii) la comparaison de l'activité de ladite protéine recombinante en présence de la susdite molécule avec celle de ladite protéine recombinante en absence de la susdite molécule,
- (iii) l'identification d'un inhibiteur de ladite protéine recombinante lorsque l'activité de ladite protéine recombinante en présence de la susdite molécule est inférieure à celle en absence de la susdite molécule.

10 La solution réactionnelle utilisée dans ladite méthode peut être le réactif Nessler.

On entend par « inhibiteur de l'asparaginase » une molécule biologique ou chimique permettant d'inhiber l'hydrolyse de l'asparaginase en aspartate.

Dans un mode de réalisation particulier, un tel inhibiteur biologique peut être un anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre la protéine recombinante représentée par la séquence SEQ ID NO : 1, un siARN, un miARN ou un oligonucléotide antisens inhibant la transcription du gène codant ladite protéine.

Un anticorps polyclonal ou monoclonal peut être obtenu par les méthodes de production d'anticorps connues dans l'art antérieur.

Un anticorps polyclonal peut être obtenu par immunisation d'un lapin ou d'une chèvre par la protéine de séquence SEQ ID NO : 1 purifiée. La dose d'immunisation convenable peut être déterminée par les expériences routines. La protéine de séquence SEQ ID NO : 1 peut être administrée avec un adjuvant d'immunisation, tel que l'adjuvant de Freund, pour optimiser la réponse immunitaire.

Un anticorps monoclonal peut être obtenu par la construction d'un hybridome, qui est la fusion du lymphocyte sécréteur d'un anticorps dirigé contre la protéine de séquence SEQ ID NO : 1 ayant servi à l'immunisation de l'animal avec une cellule de myélome.

Dans un mode de réalisation plus particulier, ledit inhibiteur selon l'invention est un anticorps et dirigé contre l'asparaginase de *Mycobacterium tuberculosis*.

Dans un autre mode de réalisation, un inhibiteur chimique peut être une molécule issue du criblage dans une banque de molécules.

Un autre objet de la présente invention est un produit contenant un inhibiteur de la protéine de la séquence SEQ ID NO : 1 ou l'asparaginase de *Mycobacterium tuberculosis* et un antibiotique connu pour le traitement de la tuberculose comme produit de combinaison.

Plus particulièrement, ledit kit de l'invention comprend :

- un inhibiteur décrit dans la présente invention, et
- un antibiotique choisi parmi ethambutol, isoniazide, pyrazinamide, rifampicine, acide p-aminosalicylique, amikacine, kanamycine, capreomycine, ciprofloxacine, levofloxacine, moxifloxacine, ethionamide, rifabutine,

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement de la tuberculose, notamment la tuberculose liée à l'infection de *Mycobacterium tuberculosis*.

Les figures et les exemples ci-après illustrent à titre d'exemple la présente invention et ne limitent en aucun cas la portée de la présente invention.

Figures

Figure 1 : la figure 1 illustre la construction de la souche mutante déposée à la CNCM le 21 mars 2013 sous le numéro de dépôt CNCM I-4724.

Figure 2 : la figure 2 illustre l'expression de la protéine de séquence SEQ ID NO : 1 (l'asparaginase de *Mycobacterium tuberculosis*) chez *Mycobacterium smegmatis* (non pathogène) via le plasmide pVV16. L'expression de l'asparaginase recombinante est détectée par le test « western blot ». Le plasmide pVV16 vide est utilisé en tant que contrôle négatif. « F₄₀₀ » correspond à la fraction AnsA purifiée. « L » correspond au lysat bactérien total.

Figure 3 : les figures 3A et 3B illustrent l'activité de l'asparaginase recombinante dans les fractions purifiées F₄₀₀.

La figure 3A montre la disparition du NADPH en présence de l'asparagine et l'asparaginase recombinante (la ligne comportant les losanges). Un échantillon contenant le plasmide pVV16 et l'asparagine (la ligne comportant les points), un échantillon contenant seulement l'asparaginase recombinante (la ligne comportant les carrés) et un échantillon contenant seulement le plasmide pVV16 (la ligne comportant les triangles) sont respectivement utilisés en tant que contrôle.

La figure 3B confirme que l'asparaginase recombinante ne possède pas l'activité glutaminase (la ligne comportant les points). Un échantillon contenant l'asparaginase

recombinante et 50nM de l'asparagine (la ligne comportant les losanges) et un échantillon contenant l'asparaginase et 50nM de glutamine (la ligne comportant les triangles) sont respectivement utilisés en tant que contrôle.

Figure 4 : la figure 4 montre que le mutant de *M. tuberculosis* inactivé dans le gène *ansA* (*ansA* Ko) ne se développe pas in vitro en présence d'asparagine comme seule source d'azote, alors que la souche sauvage (wt) se multiplie. La croissance bactérienne est quantifiée par mesure de la turbidité (unités Mc Farland) au cours du temps (en jours)

Figure 5 : la figure 5 montre qu'à 21 jours et 42 jours après l'infection le mutant de *M. tuberculosis* inactivé dans le gène codant *AnsA* (colonne en noir) est présent en quantité (mesurée en CFUs) 30 fois moindre dans les poumons de souris infectées, par rapport à la souche sauvage (colonne en blanc) ou la souche mutante « complémentée » dans laquelle une copie du gène codant *AnsA* a été ré-introduite (colonne en gris).

Exemples

Matériels et méthodes

Souches bactériennes :

Mycobacterium smegmatis (souche MC2 155) et *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) sont cultivés en milieu liquide 7H9 (Middlebrook) + ADC 10% (albumine, dextrose, catalase, Middlebrook) supplémenté avec du Tween 80 à 0,05% final ou solide sur milieu 7H11 (Middlebrook) + OADC 10% (acide oléique, albumine, dextrose, catalase, Middlebrook) à 37°C. Quand ceci est nécessaire, de la kanamycine (50 µg/mL) de la zeomycine (25 µg/mL) ou de la streptomycine (25 µg/mL) sont additionnés. Les tests de croissance (Fig4) ont été effectués en triplicat en milieu Sauton modifié dans lequel le citrate d'ammonium a été omis et où l'asparagine et le glutamate ont été additionnés à une concentration finale de 5mM + Tween 80 à 0,05% final. La croissance bactérienne a été suivie via la lecture des Mc Farland au cours du temps. La construction du mutant *ansA* KO s'est faite par des méthodes classiques de recombinaison génétiques permettant la détermination de l'essentialité de gènes mycobactériens (ref: voir la partie « supp material » dans Duckworth et al, 2011 *Chem Biol.* 23;18(11):1432-41).

Extraction des protéines et purification d'AnsA :

Produits utilisés: tampon de lyse (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8) ; tampon de lavage (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazole pH8) ; tampon d'élution (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 400 mM imidazole pH8).

5 A densité optique supérieure ou à égale 1,5, 15mL de culture sont centrifugés (2952g ; 10 min), les culots bactériens sont remis en suspension avec 1mL de tampon de lyse, puis les parois sont cassées par lyse mécanique avec des billes de verre (0,1-0,25mm) pendant 10 minutes (appareil Bead Beater « Retscher, BioBrock scientifique »). Les lysats sont récupérés après centrifugation (14000rpm ; 5 min).

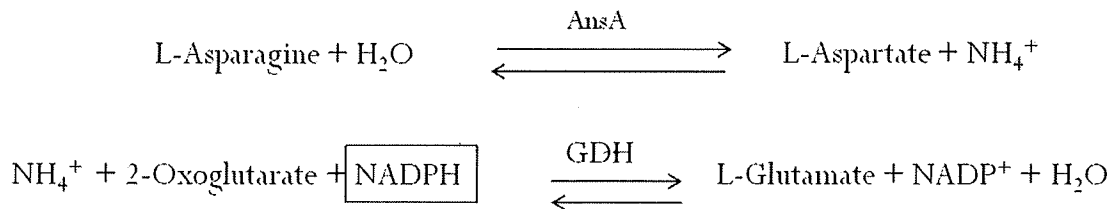
10 Puis 600μL des lysats sont déposés sur colonne Ni-NTA (Ni-NTA Spin column QIAGEN) équilibrée au préalable avec 600μL de tampon de lyse (890g ; 2 min), les colonnes sont centrifugées (270g ; 5 min) et les fractions F0 sont obtenues. Puis les colonnes sont lavées 2 fois avec 600μL de tampon de lavage (890g ; 2min) et sont enfin éluées avec 300μL de tampon d'élution et après centrifugation (890g ; 2 min) les fractions F400 sont obtenues.

15 **Détection de l'expression de AsnA par Western blot :**

Les différents échantillons sont dénaturés après ajout d'un agent contenant du sodium dodecylsulfate et du dithiothreitol (NuPAGE, LDS Sample Buffer 4X et Reducing Agent 10X) SDS) et chauffés 5min à 95°C. Les extraits sont déposés sur un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide. Les protéines sont séparées par migration à 200 mV avant d'être transférées sur
20 une membrane de nitrocellulose. Après saturation 1h en PBS/Tween 20 (0.1%)/lait (5%), la membrane est incubée pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps un primaire dirigé contre le Tag His6 (produit chez le lapin, eBioscience). Après 3 lavages de 5 minutes dans du PBS/Tween 20 (0.1%), la membrane est incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire (Produit chez l'âne, GE Healthcare) dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la HRP (Horseradish
25 Peroxidase). Après 3 nouveaux lavages, sont ajoutés pendant 5 minutes le substrat chimioluminescent (luminol) ainsi que le substrat de la peroxydase (peroxyde d'hydrogène), le produit de la réaction catalysée par la HRP est impressionné sur un film photographique permettant la détection de la protéine (AnsA-His6= 34kDa).

30 **Essai enzymatique :**

L'activité de l'asparaginase est déterminée par le couplage de deux réactions ci-dessous.



La disparition du NADHP est déterminée par mesure optique.

L'essai enzymatique est réalisé dès la fin de la purification, chaque expérience de purification permet de faire 3 essais enzymatiques. La quantité de NADHP est mesurée par le
 5 kit Megazyme K-ASNAM (Glutamate déshydrogénase, NADPH, 2-oxoglutarate, tampon acétate de sodium = « solution A »). La solution d'Asn est à 150mM. Dans une cuve en Quartz de 1cm sont ajoutés 72µL de solution A, 77µL de substrat (Asn et/ou eau de manière à avoir la concentration finale souhaitée) et 81µL de l'échantillon à tester F400). Une cinétique enzymatique est réalisée et l'activité est donnée par la mesure de la diminution de
 10 l'absorbance à 340nm correspondant à la disparition du NADPH au cours du temps avec le spectrophotomètre « Safas monaco mc² » ; logiciel « SAFAS SP 2000 » permettant de faire des mesures à des intervalles de temps de 10 secondes.

Procédé de screening :

15 Afin de procéder au screening d'inhibiteurs de la protéine AnsA de *Mycobacterium tuberculosis*, la miniaturisation d'essais d'activité asparaginase est procédée. Pour cela, la protéine AnsA est produite chez *Escherichia Coli*. Les fractions purifiées de la protéine AnsA sont placées en plaque 96 puits. Après l'addition de l'asparagine 50 mM, l'activité asparaginase est mesurée en point final par spectrocolorimétrie (520 nm) après addition de
 20 réactif de Nessler, qui permet de former un complexe coloré avec les ions ammonium libérés. Des molécules provenant de chimiothèques sont ensuite ajoutées dans le milieu réactionnel afin d'identifier celles permettant d'inhiber l'activité asparaginase de AnsA.

Infection de souris :

25 Des souris C57BL/6 de 6 à 8 semaines ont été anesthésiées avec un cocktail de kétamine (100 mg/kg ; Merial) et de xylasine (15 mg/kg ; Bayer) et ont été infectées par voie intranasale avec 500 CFUs (colonies formant unités) des différentes souches testées avec 25 µl de DPBS/0.01% Tween 80. A jour 21 et jour 42 post-infection, 5 souris par souches testées sont sacrifiées et les poumons et rates des animaux sont récupérés, broyés et étalés sur
 30 milieu 7H11 pour dénombrement bactérien.

Résultats

Le western blot montre que l'asparaginase recombinante de la séquence SEQ ID NO : 1 est bien exprimée chez *Mycobacterium smegmatis* (figure 2).

5 Cette asparaginase recombinante présente une activité d'asparaginase permettant d'hydrolyser l'asparagine (figure 3A). Cette même protéine n'a pas d'activité de glutaminase (figure 3B).

Le mutant AnsA KO de *M. tuberculosis* ne pousse pas en présence d'asparagine comme seule source d'azote (figure 4).

10 Les résultats de la figure 5 montrent qu'AnsA est requise pour la colonisation du poumon par *M. tuberculosis*, et font de cette enzyme une cible de choix pour développer de nouveaux antibiotiques.

REVENDICATIONS

1. Souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* dont la virulence est inférieure à celle de la souche sauvage correspondante, le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 ou l'expression de la protéine codée par le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 étant inactivée dans ladite souche mutante.
2. Souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* selon la revendication 1, dans laquelle le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 est supprimé du génome de ladite souche mutante.
3. Souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* selon la revendication 1, dans laquelle le gène *ansA* représenté par la séquence SEQ ID NO : 2 est inactivé du génome de ladite souche mutante.
4. Souche mutante de *Mycobacterium tuberculosis* selon l'une des revendications 1 à 3, ladite souche est la souche CNCM I-4724 déposée le 21 mars 2013.
5. Composition immunogène comprenant une souche mutante selon l'une des revendications 1 à 4.
6. Composition pharmaceutique, notamment vaccinale, comprenant à titre de substance active, une souche selon l'une des revendications 1 à 4, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
7. Composition pharmaceutique, notamment vaccinale, selon la revendication 5 ou 6, convenant pour l'administration d'une dose unitaire de 10^5 à 10^6 CFUs.
8. Produit contenant :
 - une composition selon l'une des revendications 5-7,
 - un antibiotique choisi parmi ethambutol, isoniazide, pyrazinamide, rifampicine, acide p-aminosalicylique, amikacine, kanamycine, capreomycine, ciprofloxacine, levofloxacine, moxifloxacine, éthionamide, rifabutine,

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement de la tuberculose, notamment la tuberculose liée à l'infection de *Mycobacterium tuberculosis*.

5 9. Protéine recombinante représentée par la séquence SEQ ID NO : 1.

10. Méthode de criblage d'un inhibiteur de la protéine recombinante représentée par la séquence SEQ ID NO : 1, comprenant : un criblage colorimétrique ou fluorimétrique

10 (iv) la mise en contact de ladite protéine recombinante avec l'asparagine dans une solution réactionnelle en présence d'une molécule issue d'une banque de molécules chimiques,

(v) la comparaison de l'activité de ladite protéine recombinante en présence de la susdite molécule avec celle de ladite protéine recombinante en absence de la susdite molécule,

15 (vi) l'identification d'un inhibiteur de ladite protéine recombinante lorsque l'activité de ladite protéine recombinante en présence de la susdite molécule est inférieure à celle en absence de la susdite molécule.

20 11. Inhibiteur de la protéine recombinante représentée par la séquence SEQ ID NO : 1, ledit inhibiteur étant choisi parmi :

- un anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre la protéine recombinante représentée par la séquence SEQ ID NO : 1, en particulier un anticorps dirigé contre l'asparaginase de *Mycobacterium tuberculosis*, ou
- un inhibiteur issu du criblage selon la revendication 10.

25

12. Produit contenant :

- un inhibiteur selon la revendication 11,
- un antibiotique choisi parmi ethambutol, isoniazide, pyrazinamide, rifampicine, acide p-aminosalicylique, amikacine, kanamycine, capreomycine, ciprofloxacine, 30 levofloxacine, moxifloxacine, ethionamide, rifabutine,

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention et/ou le traitement de la tuberculose, notamment la tuberculose liée à l'infection de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figure 1

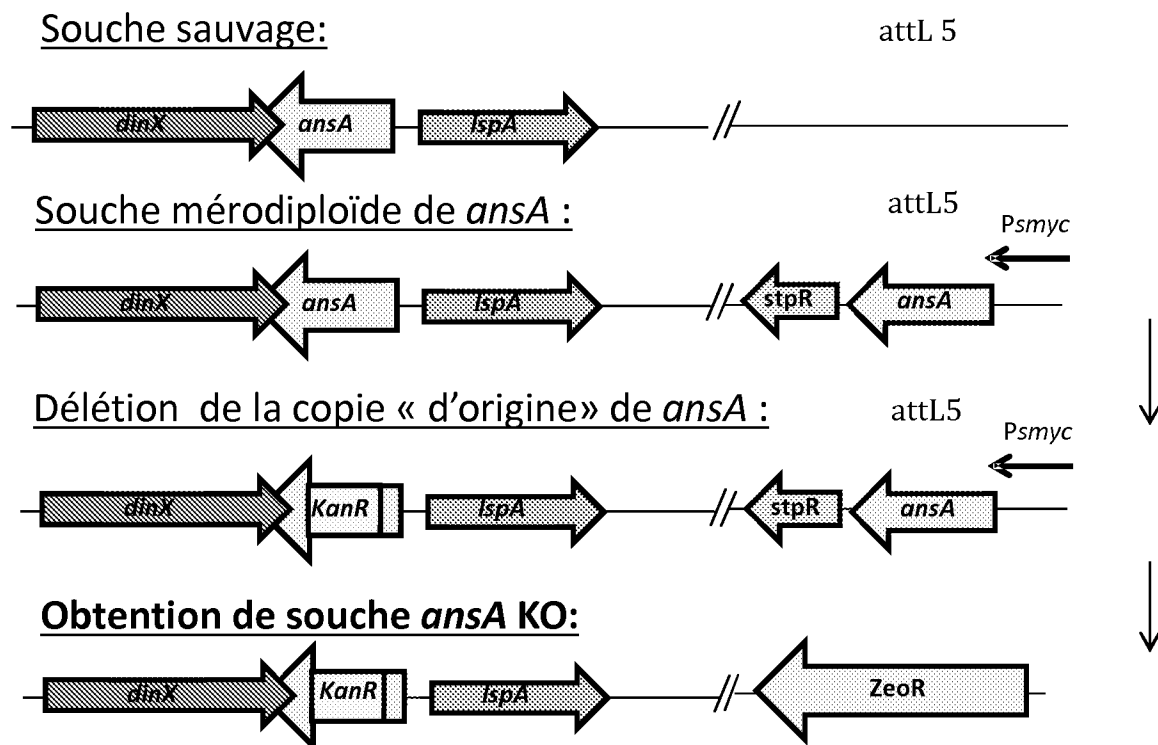


Figure 2

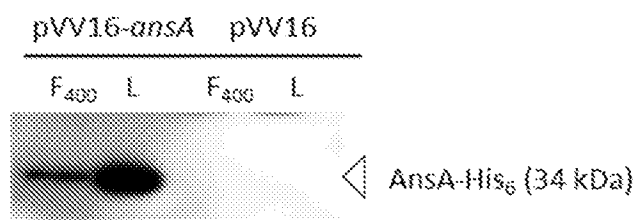


Figure 3A

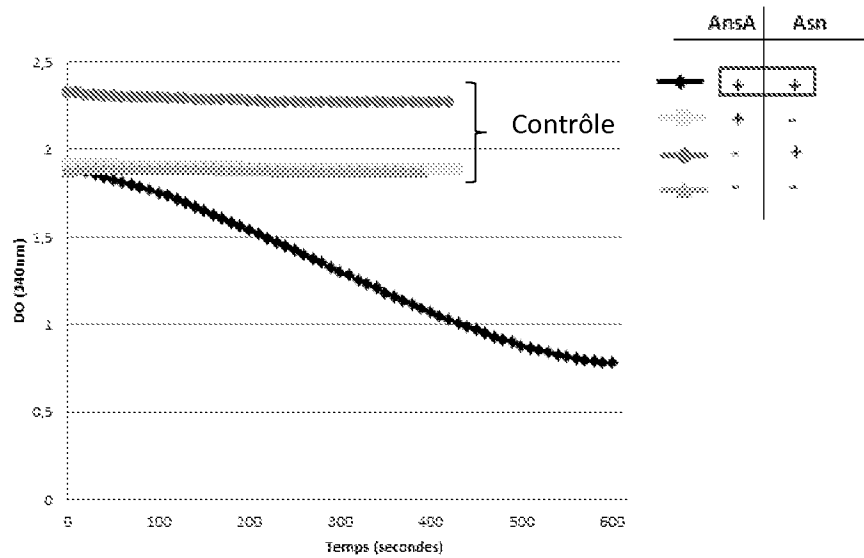


Figure 3B

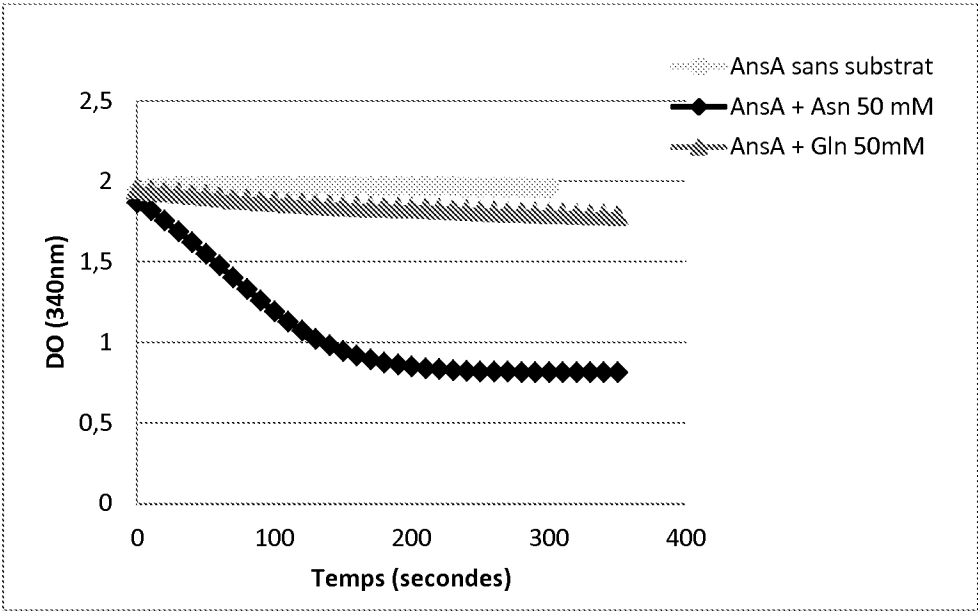


Figure 4

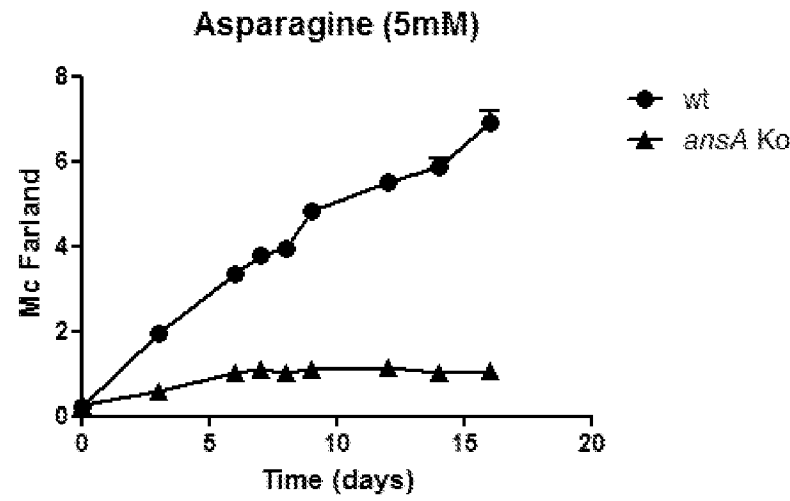
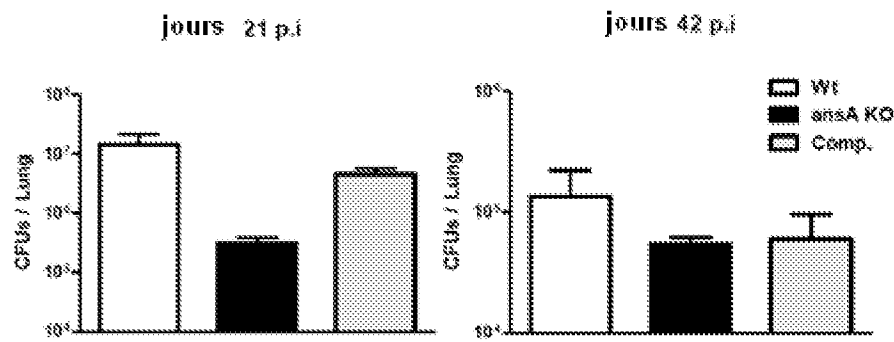


Figure 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/050806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N1/21 A61P31/06	C12N9/82 A61K39/04	C07K16/40 C12Q1/34 C12N15/11
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOUZY A ET AL.: "A Novel Amino Acid Permease System for Mycobacterium tuberculosis Nitrogen Acquisition and Host Colonization", PROGRAM AND ABSTRACT BOOK TUBERCULOSIS 2012: BIOLOGY, PATHOGENESIS, INTERVENTION STRATEGIES 12 September 2012 (2012-09-12), pages 31-31, XP002718626, Retrieved from the Internet: URL: http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/tuberculosis2012/images/TB2012-Program-Abs tract-book-LD.pdf [retrieved on 2014-01-10] page 31 ----- -/-	1-8, 10-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 July 2014		Date of mailing of the international search report 14/07/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lejeune, Robert

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMY L. KULLAS ET AL: "L-Asparaginase II Produced by Salmonella Typhimurium Inhibits T Cell Responses and Mediates Virulence", CELL HOST & MICROBE, vol. 12, no. 6, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 791-798, XP055095502, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.018 the whole document	1-8, 10-12
Y	----- KEIGO SHIBAYAMA ET AL: "Biochemical and pathophysiological characterization of Helicobacter pylori asparaginase", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 55, no. 6, 29 May 2011 (2011-05-29), pages 408-417, XP055095509, ISSN: 0385-5600, DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00333.x the whole document	1-8, 10-12
X	----- DATABASE UniProt [Online] 13 July 2010 (2010-07-13), "SubName: Full=L-asparaginase ansA;", XP002718627, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:D5ZFX5 Database accession no. D5ZFX5 sequence	9
A	----- T Ramakrishnan ET AL: "Intermediary metabolism of Mycobacteria", Bacteriological review, 1 January 1972 (1972-01-01), pages 65-108, XP055095639, Retrieved from the Internet: URL:http://mmbr.asm.org/content/36/1/65.full.pdf [retrieved on 2014-01-09] page 81, right-hand column - page 83, left-hand column	1-12
A	----- CHRISTOPHER M. SASSETTI ET AL: "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis", MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 48, no. 1, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 77-84, XP055017150, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x cited in the application the whole document	1-12
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050806

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JAYARAM H N ET AL: "l-asparaginases from Mycobacterium tuberculosis strains H37Rv and H37Ra", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 126, no. 1, 1 July 1968 (1968-07-01), pages 165-174, XP024753883, ISSN: 0003-9861, DOI: 10.1016/0003-9861(68)90570-5 [retrieved on 1968-07-01] the whole document -----	1-12
A	MALHOTRA V ET AL: "DevR-mediated adaptive response in Mycobacterium tuberculosis H37Ra: Links to asparagine metabolism", TUBERCULOSIS, ELSEVIER, GB, vol. 89, no. 2, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 169-174, XP025973963, ISSN: 1472-9792, DOI: 10.1016/J.TUBE.2008.12.003 [retrieved on 2009-02-13] the whole document -----	1-12
X,P	ALEXANDRE GOUZY ET AL: "Mycobacterium tuberculosis nitrogen assimilation and host colonization require aspartate", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 9, no. 11, 29 September 2013 (2013-09-29), pages 674-676, XP055095727, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1355 the whole document -----	1-8, 10-12
X,P	ALEXANDRE GOUZY ET AL: "Mycobacterium tuberculosis Exploits Asparagine to Assimilate Nitrogen and Resist Acid Stress during Infection", PLOS PATHOGENS, vol. 10, no. 2, 20 February 2014 (2014-02-20), page e1003928, XP055126930, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003928 the whole document -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050806

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/21 C12N9/82 C07K16/40 C12Q1/34 C12N15/11 A61P31/06 A61K39/04 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C12Q A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GOUZY A ET AL.: "A Novel Amino Acid Permease System for Mycobacterium tuberculosis Nitrogen Acquisition and Host Colonization", PROGRAM AND ABSTRACT BOOK TUBERCULOSIS 2012: BIOLOGY, PATHOGENESIS, INTERVENTION STRATEGIES 12 septembre 2012 (2012-09-12), pages 31-31, XP002718626, Extrait de l'Internet: URL: http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/tuberculosis2012/images/TB2012-Program-Abs tract-book-LD.pdf [extrait le 2014-01-10] page 31 ----- -/-	1-8, 10-12
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 8 juillet 2014		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 14/07/2014
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Lejeune, Robert

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	AMY L. KULLAS ET AL: "L-Asparaginase II Produced by Salmonella Typhimurium Inhibits T Cell Responses and Mediates Virulence", CELL HOST & MICROBE, vol. 12, no. 6, 1 décembre 2012 (2012-12-01), pages 791-798, XP055095502, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.018 le document en entier -----	1-8, 10-12
Y	KEIGO SHIBAYAMA ET AL: "Biochemical and pathophysiological characterization of Helicobacter pylori asparaginase", MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 55, no. 6, 29 mai 2011 (2011-05-29), pages 408-417, XP055095509, ISSN: 0385-5600, DOI: 10.1111/j.1348-0421.2011.00333.x le document en entier -----	1-8, 10-12
X	DATABASE UniProt [Online] 13 juillet 2010 (2010-07-13), "SubName: Full=L-asparaginase ansA;", XP002718627, extrait de EBI accession no. UNIPROT:D5ZFX5 Database accession no. D5ZFX5 séquence -----	9
A	T Ramakrishnan ET AL: "Intermediary metabolism of Mycobacteria", Bacteriological review, 1 janvier 1972 (1972-01-01), pages 65-108, XP055095639, Extrait de l'Internet: URL:http://mmbr.asm.org/content/36/1/65.full.pdf [extrait le 2014-01-09] page 81, colonne de droite - page 83, colonne de gauche -----	1-12
A	CHRISTOPHER M. SASSETTI ET AL: "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis", MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 48, no. 1, 1 avril 2003 (2003-04-01), pages 77-84, XP055017150, ISSN: 0950-382X, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x cité dans la demande le document en entier -----	1-12
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JAYARAM H N ET AL: "l-asparaginases from Mycobacterium tuberculosis strains H37Rv and H37Ra", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 126, no. 1, 1 juillet 1968 (1968-07-01), pages 165-174, XP024753883, ISSN: 0003-9861, DOI: 10.1016/0003-9861(68)90570-5 [extrait le 1968-07-01] le document en entier -----	1-12
A	MALHOTRA V ET AL: "DevR-mediated adaptive response in Mycobacterium tuberculosis H37Ra: Links to asparagine metabolism", TUBERCULOSIS, ELSEVIER, GB, vol. 89, no. 2, 1 mars 2009 (2009-03-01), pages 169-174, XP025973963, ISSN: 1472-9792, DOI: 10.1016/J.TUBE.2008.12.003 [extrait le 2009-02-13] le document en entier -----	1-12
X,P	ALEXANDRE GOUZY ET AL: "Mycobacterium tuberculosis nitrogen assimilation and host colonization require aspartate", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 9, no. 11, 29 septembre 2013 (2013-09-29), pages 674-676, XP055095727, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1355 le document en entier -----	1-8, 10-12
X,P	ALEXANDRE GOUZY ET AL: "Mycobacterium tuberculosis Exploits Asparagine to Assimilate Nitrogen and Resist Acid Stress during Infection", PLOS PATHOGENS, vol. 10, no. 2, 20 février 2014 (2014-02-20), page e1003928, XP055126930, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003928 le document en entier -----	1-12