



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

(11) 1024284 B1

(47) Date de délivrance : 15/01/2018

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 15/01/2018

(21) Numéro de demande : BE2016/5444

(22) Date de dépôt : 15/06/2016

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 39/112, A61K 39/00

(30) Données de priorité :

16/06/2015 EP 15020097.0

(73) Titulaire(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

(72) Inventeur(s) :

GERKE Christiane
53100 SIENA
Italie

MARTIN Laura Bartle
53100 SIENA
Italie

SAUL Allan James
53100 SIENA
Italie

(54) COMPOSITIONS IMMUNOGENES

(57) Cette invention concerne des compositions immunogènes, particulièrement des compositions vaccinales, pour une utilisation permettant de fournir une protection contre une maladie provoquée suite à une infection bactérienne par des souches de *Shigella*.

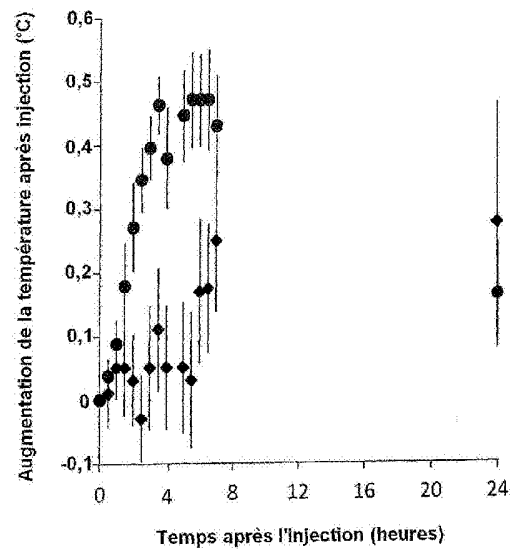


Figure 1

BREVET D'INVENTION BELGE

SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie

Numéro de publication : 1024284
Numéro de dépôt : BE2016/5444

Office de la Propriété intellectuelle

Classification Internationale : A61K 39/112 A61K 39/00
Date de délivrance : 15/01/2018

Le Ministre de l'Economie,

Vu la Convention de Paris du 20 mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle ;

Vu la loi du 28 mars 1984 sur les brevets d'invention, l'article 22, pour les demandes de brevet introduites avant le 22 septembre 2014 ;

Vu le Titre Ier "Brevets d'invention" du Livre XI du Code de droit économique, l'article XI.24, pour les demandes de brevet introduites à partir du 22 septembre 2014 ;

Vu l'arrêté royal du 2 décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, l'article 28 ;

Vu la demande de brevet d'invention reçue par l'Office de la Propriété intellectuelle en date du 15/06/2016.

Considérant que pour les demandes de brevet tombant dans le champ d'application du Titre Ier, du Livre XI du Code de Droit économique (ci-après CDE), conformément à l'article XI. 19, §4, alinéa 2, du CDE, si la demande de brevet a fait l'objet d'un rapport de recherche mentionnant un défaut d'unité d'invention au sens du §1er de l'article XI.19 précité et dans le cas où le demandeur n'effectue ni une limitation de sa demande ni un dépôt d'une demande divisionnaire conformément aux résultats du rapport de recherche, le brevet délivré sera limité aux revendications pour lesquelles le rapport de recherche a été établi.

Arrête :

Article premier. - Il est délivré à

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA, Rue de l'Institut 89, 1330 RIXENSART Belgique;

représenté par

PRONOVEM - Office Van Malderen, Avenue Josse Goffin 158, 1082, BRUXELLES;

un brevet d'invention belge d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles visées à l'article XI.48, §1 du Code de droit économique, pour : COMPOSITIONS IMMUNOGENES.

INVENTEUR(S) :

GERKE Christiane, c/o GSK Vaccines Institute for Global Health S.r.l., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

MARTIN Laura Bartle, c/o GSK Vaccines Institute for Global Health S.r.l., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

SAUL Allan James, c/o GSK Vaccines Institute for Global Health S.r.l., Via Fiorentina 1, 53100, SIENA;

PRIORITE(S) :

16/06/2015 EP 15020097.0;

DIVISION :

divisé de la demande de base :

date de dépôt de la demande de base :

Article 2. – Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du (des) demandeur(s).

Bruxelles, le 15/01/2018,

Par délégation spéciale :

COMPOSITIONS IMMUNOGENES

Domaine technique

Cette invention concerne des compositions immunogènes, particulièrement des compositions vaccinales, pour une utilisation dans la fourniture d'une protection contre une maladie provoquée par une
5 infection bactérienne avec des souches de *Shigella*.

Contexte de l'invention

La shigellose représente un problème sanitaire global majeur, responsable de plus de 7 millions
10 d'années de vie corrigée de l'incapacité et de 100 000 décès par an, spécialement chez les enfants de moins de 5 ans dans les pays en développement [1,2,3]. La shigellose est provoquée par des bactéries Gram négatif du genre *Shigella*, qui se divise en 4 espèces
15 différenciées en outre en 50 sérotypes basés sur la structure et la composition de l'antigène polysaccharidique externe (antigène O, AgO) du lipopolysaccharide (LPS) : *S. sonnei* (1 sérotype), *S. flexneri* (15 sérotypes), *S. boydii* (19 sérotypes) et
20 *S. dysenteriae* (15 sérotypes) [4]. Un nombre limité de

sérotypes contribuent à la charge globale de la maladie et ceux-ci varient entre les régions et dans le temps [4,5,6,7]. *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri* 2a sont les sérotypes actuellement dominants dans le monde
5 [4,6].

Le signe distinctif d'une shigellose clinique est une rectocolite aiguë associée à de la fièvre, des nausées, une anorexie, une déshydratation, des diarrhées mucopurulentes et sanguinolentes, et un
10 ténésme. La dysenterie provoquée par une *Shigella* est endémique et provoque des millions d'épisodes pathologiques dans les pays en développement. Par exemple, il est estimé y avoir 125 millions de cas de diarrhée due à *Shigella* par an, dont 99 % surviennent
15 dans des pays en développement et 69 % chez des enfants de moins de cinq ans. La morbidité et la mortalité dues à la shigellose sont spécialement élevées parmi les enfants dans les pays en développement.

Les approches existantes de vaccins contre
20 *Shigella* (décrits dans [8]) ont été basées sur des souches vivantes atténuées pour une immunisation orale, des saccharides O conjugués pour une injection, des protéosomes (vésicules de la membrane externe du méningocoque avec le LPS de *Shigella* fixé) pour une
25 utilisation intranasale, des invaplex (extraits subcellulaires de *Shigella* comprenant l'IpaB, l'IpaC et le LPS) pour une utilisation intranasale, et des complexes protéines nucléaires-ribosomes préparés à partir de souches ΔmsbB avec un LPS détoxifié. Bien que
30 deux de ces vaccins aient été efficaces dans des essais

sur le terrain, aucun ne protège contre de multiples sérotypes de *Shigella*.

Le vaccin candidat récent le plus performant, un conjugué de l'AgO de *S. sonnei* parentale, a démontré
5 74 % de protection contre une infection par *S. sonnei* homologue chez des jeunes adultes après une immunisation [9] et 71 % d'efficacité chez des enfants âgés de plus de 3 ans après deux immunisations [10]. Au contraire, le vaccin a affiché une faible
10 immunogénicité et un manque de protection chez les enfants de moins de 3 ans [10]. Le taux de protection est en parallèle avec le taux de réponse en anticorps spécifiques du vaccin à base de l'AgO, mesuré en réponse en anticorps contre le LPS de *S. sonnei* avec
15 l'AgO homologue (réponse anti-LPS) [10].

Ainsi, un objet de l'invention est de fournir des compositions immunogènes améliorées, particulièrement des compositions vaccinales qui peuvent être utilisées pour protéger contre des sérotypes multiples de
20 *Shigella*. Plus particulièrement, un objet est de fournir des compositions vaccinales qui produisent des réponses plus fortes contre l'AgO, spécialement chez les jeunes enfants.

25 Brève description de l'invention

Dans un premier aspect, l'invention fournit une composition immunogène comprenant des modules généralisés pour les antigènes membranaires (GMMA) purifiés à partir de *Shigella sonnei* et *Shigella*
30 *flexneri*. Particulièrement, les GMMA comprennent un lipide A modifié. Particulièrement, le lipide A modifié

est une forme moins toxique ou détoxifiée du lipide A, à titre d'exemple non limitatif, un lipide A penta-acylé, un lipide A hexa-acylé n'existant pas à l'état naturel dans lequel l'un des groupes acyle est substitué et/ou un lipide A hexa-acylé dans lequel la chaîne lauroyle est remplacée par une chaîne palmitoléoyle. Encore plus particulièrement, au moins 75 % des GMMA de *Shigella sonnei* ont un diamètre situé dans la plage de 25 nm à 40 nm, déterminé par microscopie électronique. Les GMMA de *Shigella sonnei* peuvent avoir un rayon moyen situé dans la plage de 32 nm à 38 nm (déterminé par HPLC-SEC MALLS) et les GMMA de *S. flexneri* peuvent avoir un rayon moyen (HPLC-SEC MALLS) situé entre 21 nm et 28 nm. Dans un mode de réalisation, les GMMA de *Shigella flexneri* sont purifiés à partir d'au moins une souche choisie dans le groupe constitué de 2a, 3a et 6. Particulièrement, la composition immunogène comprend des GMMA de *Shigella flexneri* purifiés à partir de chacune des souches 2a, 3a et 6. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène comprend des GMMA purifiés à partir de (a) *Shigella sonnei*, (b) *Shigella flexneri* 2a, (c) *Shigella flexneri* 3a et (d) *Shigella flexneri* 6. Particulièrement, les GMMA sont présents dans un rapport de 1/1/1/1. Encore plus particulièrement, la composition immunogène comprend des protéines GMMA à une concentration inférieure à 100 µg/ml. Particulièrement, la composition immunogène comprend des GMMA de *Shigella flexneri* purifiés à partir de chacune des souches 2a, 3a et 6 et des GMMA purifiés à partir d'au moins une autre souche de *Shigella flexneri*

choisie dans le groupe constitué des souches 1b et 2b. Particulièrement, la composition immunogène comprend des GMMA purifiés à partir de (a) *Shigella sonnei* Δ tolR, Δ htrB, virG::nadAB, (b) *Shigella flexneri* 2a Δ tolR, Δ msbB, (c) *Shigella flexneri* 3a Δ tolR, Δ msbB et (d) *Shigella flexneri* 6 Δ tolR, Δ msbB ou Δ htrB. Encore plus particulièrement, la ou les souches de *Shigella flexneri* sont dépourvues du plasmide de virulence. La composition peut également contenir des GMMA d'autres souches de *S. flexneri*.

Particulièrement, la composition immunogène comprend un adjuvant. Encore plus particulièrement, l'adjuvant est un adsorbant. Encore même plus particulièrement, l'adjuvant est un adsorbant qui n'amplifie pas l'immunogénicité des GMMA, par exemple, comme il est mesuré par la réponse en anticorps anti-LPS. Les adjuvants particuliers comprennent, par exemple, des adjuvants d'aluminium y compris l'hydroxyde d'aluminium, ALHYDROGEL®, le phosphate d'aluminium, le sulfate de potassium et d'aluminium et l'alun.

Dans un deuxième aspect, l'invention fournit un procédé d'immunisation d'un patient contre une infection par *Shigella* comprenant l'étape d'administration au patient d'une composition immunogène du premier aspect de l'invention.

Dans un troisième aspect, l'invention fournit une composition du premier aspect de l'invention pour une utilisation dans un procédé d'immunisation d'un patient contre une infection par *Shigella*.

Brève description des figures

Figure 1 : Augmentation de la température moyenne (moyenne de la température après vaccination - avant vaccination) chez des lapins après une injection IM d'une dose contenant 100 µg de protéines de 1790GAHB (cercles) ou d'un volume équivalent de sérum physiologique (losanges). Les barres verticales montrent l'écart-type de la moyenne. N = 12 pour 1790GAHB et 6 pour les lapins auxquels il est injecté du sérum physiologique.

Figure 2(A) : Taux d'anticorps anti-LPS de *S. sonnei* (taux médians après vaccination) produits après la dose d'immunisation 1, 2 et 3 dans un essai clinique avec des sujets humains.

Figure 2(B) : Taux d'anticorps anti-LPS de *S. sonnei* (taux médians après vaccination) sur l'étude entière y compris un suivi de 6 mois après l'immunisation 3 dans un essai clinique avec des sujets humains.

Figure 3 - Diagrammes en boîte montrant la distribution des anticorps dans les groupes immunisés avec des 1790GAHB, *S. flexneri*-2a, *S. flexneri*-3a et une combinaison tétravalente estimée par un test ELISA utilisant du LPS purifié provenant de (A) *S. sonnei*, (B) *S. flexneri* 3a, et (C) *S. flexneri* 2a en tant qu'antigène de sensibilisation. Sur (A) et (B), les unités ELISA sont tracées, sur (C), les DO ELISA sont présentées. Le 25ème au 75ème percentile est représenté sous la forme de rectangle, les valeurs minimales et maximales sous la forme de moustaches et la médiane sous la forme de la barre horizontale dans le rectangle.

Les limites de détection dans les tests ont été de 2,2 (A) et 1,6 (B) unités ELISA. Aux résultats sous la limite de détection, il a été attribué la valeur de la moitié de la limite de détection (1,1 sur A, 0,8 sur B).

5 La DO moyenne du bruit de fond dans les tests représentés sur (C) a été de 0.056.

Figure 4 : Diagrammes de dispersion montrant les résultats individuels transformés en log des anticorps anti-AgO de *S. sonnei* (A), anti-*S. flexneri* 3a (B) ou
10 les résultats de DO ELISA de la distribution des anticorps anti-*S. flexneri* 2a (C) dans chaque groupe contre les dosages transformés en log. Les courbes dose-réponse parallèles des formulations simples et de la formulation tétravalente sont présentées.
15 (A) Courbes dose-réponse pour les 1790GAHB et la combinaison tétravalente sur le LPS de *S. sonnei*. (B) Courbes dose-réponse pour *S. flexneri* 3a et la combinaison tétravalente sur le LPS de *S. flexneri* 3a. (C) Courbes dose-réponse pour *S. flexneri* 2a et la
20 combinaison tétravalente sur le LPS de *S. flexneri* 2a. Les points d'intersection avec l'axe Y des courbes ne sont pas significativement différents, $P = 0,31$ (A), $P = 0,74$ (B), $P = 0,75$ (C).

25 Description détaillée de l'invention

Les modules généralisés pour les antigènes membranaires ou GMMA sont des particules dérivées de la membrane externe de bactéries Gram négatif qui
30 présentent des taux élevés de LPS, de lipoprotéines, de protéines et d'autres antigènes qui activent la réponse immunitaire innée. Les GMMA sont produits à partir de

souches bactériennes génétiquement modifiées qui sont mutées pour amplifier la production des vésicules et pour éliminer ou modifier des antigènes (par exemple, le lipide A). 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 (voir ci-dessous). La surface externe des GMMA correspond à la surface externe de la bactérie à partir de laquelle ils sont dérivés, préservant tous les antigènes membranaires (y compris, par exemple, les lipopolysaccharides, les lipooligosaccharides, les lipoprotéines, les protéines) dans le contexte de la membrane. Les GMMA (à la différence des OMV 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 ils sont dérivés. Ainsi, les GMMA sont hautement immunogènes et cette forte activation de l'immunité innée peut mener à des réactions inacceptables chez des sujets humains, par exemple, une réponse fébrile ou, dans des cas extrêmes, un choc septique spécialement s'ils sont administrés par voie parentérale.

L'invention est basée sur la découverte que la manipulation génétique peut être utilisée pour fournir des souches bactériennes de *Shigella* qui produisent des GMMA qui sont immunogènes, même à des doses faibles, avec un risque réduit, par exemple, de pyrogénicité. Les inventeurs ont également découvert que l'utilisation d'un adjuvant d'aluminium est avantageuse

dans l'augmentation de la tolérance *in vivo* des compositions immunogènes comprenant des GMMA, réduisant en outre le risque, par exemple, de pyrogénicité. Comme résultat, des doses de GMMA purifiés à partir de multiples souches bactériennes de *Shigella* peuvent être combinées pour préparer une composition immunogène multivalente présentant une concentration en protéines totales de GMMA par dose allant jusqu'à 100 µg/ml ou supérieure. Cette découverte est surprenante parce que, dans la littérature, les études ont généralement cherché à réduire la teneur en OMV pour éviter la fièvre qui pourrait compromettre l'acceptabilité des vaccins contenant des OMV dérivées par un détergent dans les calendriers de vaccination des nourrissons. Par exemple, dans des études du vaccin 4CMenB, Bexsero, il a été observé qu'approximativement la moitié des sujets expérimentent une température $\geq 38,5$ °C après vaccination avec la première dose [11]. Au contraire, les données d'essais cliniques fournies dans les exemples ici démontrent que la vaccination avec une composition immunogène comprenant 100 µg/ml de GMMA de *S. sonnei* (quatre fois la teneur équivalente en OMV dans 4CMenB) a été bien tolérée. Les données chez les êtres humains sont supportées par des résultats d'immunogénicité produits chez des souris et des lapins.

La bactérie *Shigella*

L'invention est basée sur l'utilisation de bactéries *Shigella* choisies parmi un ou plusieurs des sérogroupes *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* et *S. sonnei*. Particulièrement, l'invention est basée sur l'utilisation d'au moins deux souches de *Shigella*

choisies parmi les sérogroupes *S. flexneri* et *S. sonnei*, choisis particulièrement dans le groupe constitué de *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a et *S. flexneri* 6. Dans certains modes de réalisation, *S. sonnei* 53G, *S. flexneri* 1b STANSFIELD, *S. flexneri* 2a 2457T, *S. flexneri* 2b 69/50, *S. flexneri* 3a 6885 et/ou *S. flexneri* 6 10.8537 peuvent être utilisées.

Particulièrement, les souches de *Shigella* pour une utilisation dans l'invention sont des souches $\Delta tolR$ présentant un système Tol-Pal perturbé qui pousse la bactérie à libérer des quantités supérieures de GMMA dans le milieu de culture durant la réplication bactérienne. La délétion d'autres gènes dans le complexe Tol-Pal (par exemple, *TolA*) pourrait être également envisagée, par exemple, comme il est divulgué dans le document WO 2011/036564.

Les souches de *Shigella* pour une utilisation dans l'invention comprennent un ou plusieurs autres changements par rapport à une souche de type sauvage. Particulièrement, les souches pour une utilisation avec l'invention comprennent une ou plusieurs mutations produisant une inactivation de *htrB*, *msbB1* et/ou *msbB2*. A titre d'exemple non limitatif, des mutations appropriées peuvent être choisies dans le groupe constitué de $\Delta htrB$, $\Delta msbB1$ et $\Delta msbB2$. Pour des raisons de simplicité, les délétions doubles à la fois de *msbB1* et de *msbB2* peuvent être également appelées $\Delta DmsbB$. L'inactivation de *htrB* ou de *msbB1* et de *msbB2* réduit l'acylation dans le lipide A. Dans certains modes de réalisation, aux souches pour une utilisation avec l'invention, il manque l'antigène O dans le LPS,

évitant de cette façon des réponses spécifiques du sérotype. Dans *S. sonnei*, l'antigène O est absent lorsque le plasmide de virulence est éliminé. Dans d'autres modes de réalisation, les souches pour une utilisation avec l'invention produisent du LPS comprenant l'antigène O. La présence de l'antigène O peut être bénéfique puisque que les compositions immunogènes déclencheront des réponses immunitaires croisées à la fois spécifiques du sérotype et supplémentaires. L'absence de lipide A hexa-acylé dans le LPS est préférée. La perte du plasmide de virulence mène à la perte du gène *msbB2*, et le gène chromosomique *msbB1* peut être inactivé, éliminant de cette façon l'activité myristoyl-transférase et fournissant un lipide A penta-acylé dans le LPS. Pour les mutants *msbB* de *S. flexneri*, l'absence du plasmide de virulence qui contient le gène *msb2*, est préférée. Les souches préférées de *Shigella* pour une utilisation dans l'invention comportent un LPS penta-acylé. En variante, l'inactivation de *htrB* entraîne la perte de la chaîne lauroyle et produit ainsi un LPS penta-acylé dans certaines souches et/ou formes de lipide A qui sont moins toxiques que le lipide A de type sauvage. Par exemple, dans *S. flexneri*, l'inactivation de *htrB* peut être compensée par l'activité d'une autre enzyme, *LpxP* qui produit un lipide A hexa-acylé, dans lequel la chaîne lauroyle est remplacée par une chaîne palmitoléoyle. Le lipide A hexa-acylé comprenant des chaînes palmitoléoyle est moins toxique que le lipide A de type sauvage. Ainsi, dans certains modes de réalisation, l'invention fournit une composition

immunogène comprenant des GMMA purifiés à partir de *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri* dans laquelle les GMMA comprennent un lipide A penta-acylé et/ou un lipide A hexa-acylé dans lequel la chaîne lauroyle est
5 remplacée par une chaîne palmitoléoyle. Particulièrement, les souches appropriées pour une utilisation dans l'invention comprennent les mutations suivantes (a) *Shigella sonnei* : $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, $virG::nadAB$, (b) *Shigella flexneri* 2a : $\Delta tolR$, $\Delta msbB$,
10 (c) *Shigella flexneri* 3a : $\Delta tolR$, $\Delta msbB$ et (d) *Shigella flexneri* 6 : $\Delta tolR$, $\Delta msbB$ ou $\Delta htrB$. Des souches appropriées sont divulguées dans les exemples. D'autres souches appropriées sont connues dans l'art, par exemple dans le document WO 2011/036564. Les conditions
15 de culture pour développer *Shigella* sont bien connues dans l'art, par exemple, voir les références [12] à [14]. Par exemple, elles peuvent être développées en utilisant une source d'azote organique (comme des mélanges d'acides aminés, par exemple, contenant Ala, Arg, Asn, Asp ; des casamino-acides peuvent être
20 utilisés), du glycérol en tant que source de carbone, etc. L'inclusion d'acide L-aspartique dans le milieu est particulièrement utile et peut fonctionner comme source à la fois d'azote et de carbone.

25 Pour *S. sonnei*, les gènes des antigènes O sont sur le plasmide de virulence et un composant AgO est souhaitable pour les GMMA purifiés ou isolés à partir de celle-ci. Ainsi, dans certains modes de réalisation, la souche *S. sonnei* est mutée pour remplacer *virG* par
30 *nadA* et *nadB* provenant d'*E. coli*, éliminant de cette façon l'auxotrophie pour l'acide nicotinique de

Shigella tout en conservant le plasmide de virulence ; la production de l'AgO codé par le plasmide est assurée par la croissance dans un milieu sans acide nicotinique. Un exemple de souche mutante de *S. sonnei* peut
 5 comprendre les modifications suivantes : $\Delta tolR::kan$ $\Delta virG::nadAB$ $\Delta htrB::cat$.

Les exemples de souches mutantes de *S. flexneri* peuvent comprendre les modifications suivantes : $\Delta tolR::kan$ $\Delta htrB::cat$ ou $\Delta tolR::kan$ $\Delta msbB1::cat$. Seule
 10 la mutation de *msbB1* est introduite dans la souche dépourvue du plasmide parce que l'élimination du plasmide élimine la seconde copie de *msbB* (*msbB2*).

Modules généralisés pour les antigènes membranaires (GMMA)

15 Les bactéries *Shigella* utilisées dans l'invention sont, par rapport à leurs souches de type sauvage correspondantes, hyperbourgeonnantes, c'est-à-dire qu'elles libèrent dans leur milieu de culture des quantités plus importantes de GMMA que la souche de
 20 type sauvage. Ces GMMA sont utiles en tant que composants des vaccins contre *Shigella* de l'invention. Le terme GMMA est utilisé pour fournir une distinction nette des vésicules de la membrane externe extraites par un détergent traditionnelles (dOMV), et des
 25 vésicules de la membrane externe natives (NOMV), qui sont libérées spontanément à partir des bactéries Gram négatif. Les GMMA diffèrent dans deux aspects cruciaux des NOMV. En premier, pour induire la formation de GMMA, la structure de la membrane a été modifiée par la
 30 délétion des gènes codant pour les composants structuraux clés, spécifiquement *tolR*. En second, comme

conséquence de la modification génétique, des grandes quantités de la membrane externe bourgeonnent (le nom italien pour bourgeon est « gemma ») pour fournir une source pratique de matériaux membranaires pour la production de vaccins, menant à une plus grande facilité de fabrication et à une réduction potentielle des coûts. Alors que des NOMV ont été utilisées pour des études d'immunogénicité, les rendements sont trop faibles pour des vaccins pratiques.

10 Les GMMA de *S. sonnei* utilisés dans l'invention ont généralement un diamètre de 25 nm à 140 nm par microscopie électronique, par exemple de 25 nm à 40 nm. Les GMMA peuvent également présenter une distribution bimodale des tailles. Par exemple, la majorité des GMMA
15 ayant une taille moyenne de 25 nm à 40 nm en diamètre (par ME) et une fraction des particules ayant une taille moyenne de 65 nm à 140 nm. Particulièrement, au moins 70 %, au moins 71 %, au moins 72 %, au moins 73 %, au moins 74 %, au moins 75 %, au moins 80 %, au moins
20 85 %, au moins 90 % des GMMA auront un diamètre de 25 nm à 140 nm.

Les GMMA sont libérés spontanément durant la croissance bactérienne et peuvent être purifiés à partir du milieu de culture. La purification implique
25 idéalement la séparation des GMMA des bactéries *Shigella* vivantes et/ou intactes, par exemple, par une filtration basée sur la taille en utilisant un filtre, comme un filtre de 0,2 µm, qui permet aux GMMA de passer à travers mais qui ne permet pas aux bactéries
30 intactes de passer à travers, ou en utilisant une centrifugation à faible vitesse pour obtenir un culot

cellulaire tout en laissant les GMMA en suspension. Des procédés de purification appropriés sont connus dans l'art. Un procédé de purification par filtration en deux étapes préféré est décrit dans le document
5 WO 2011/036562 incorporé ici en référence. Particulièrement, le procédé de filtration en deux étapes est utilisé pour séparer les GMMA de la biomasse de la culture cellulaire sans utiliser de centrifugation.

10 Les compositions contenant des GMMA de l'invention seront généralement sensiblement dépourvues de bactéries entières, qu'elles soient vivantes ou mortes. La taille des GMMA signifie qu'ils peuvent être facilement séparés des bactéries entières par
15 filtration, par exemple, comme il est généralement utilisé pour une stérilisation par filtration. Bien que les GMMA passent à travers des filtres standard de 0,22 μm , ceux-ci peuvent être rapidement obstrués par d'autres matériaux, et ainsi il peut être utile
20 d'effectuer des étapes séquentielles de stérilisation par filtration à travers une série de filtres de taille de pore décroissante avant d'utiliser un filtre de 0,22 μm . Les exemples de filtres précédents seront ceux avec une taille de pore de 0,8 μm , 0,45 μm , etc. Les
25 GMMA sont libérés spontanément à partir des bactéries et la séparation à partir du milieu de culture, par exemple, en utilisant une filtration, est pratique. Les vésicules de la membrane externe formées par des procédés qui impliquent une perturbation délibérée de
30 la membrane externe (par exemple, par traitement avec un détergent, comme une extraction avec du

désoxycholate, ou une sonication) pour provoquer la formation de vésicules de la membrane externe sont exclues de l'étendue de l'invention. Les GMMA utilisés dans l'invention sont sensiblement dépourvus d'une
5 contamination de la membrane interne et cytoplasmique et ils contiennent des lipides et des protéines.

Compositions immunogènes

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre des GMMA purifiés à partir d'au
10 moins deux, trois, quatre, cinq ou six souches différentes de *Shigella*. Particulièrement, les compositions immunogènes comprennent des GMMA purifiés à partir de *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri*. Les GMMA de *Shigella flexneri* peuvent être purifiés à
15 partir d'au moins une souche choisie dans le groupe constitué de 2a, 3a et 6. Particulièrement, la composition immunogène comprend des GMMA de *Shigella flexneri* purifiés à partir de chacune des souches 2a, 3a et 6. La composition immunogène peut comprendre en
20 outre des GMMA de *Shigella flexneri* purifiés à partir d'au moins une souche choisie dans le groupe constitué de 1b et 2b. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène comprend des GMMA purifiés à partir de (a) *Shigella sonnei*, (b) *Shigella flexneri* 2a,
25 (c) *Shigella flexneri* 3a et (d) *Shigella flexneri* 6. Dans certains modes de réalisation, la composition immunogène comprend des GMMA purifiés à partir de *Shigella sonnei* 53G, *Shigella flexneri* 2a 2457T, *Shigella flexneri* 3a 6885 et *Shigella flexneri* 6
30 10.8537 et éventuellement *Shigella flexneri* 1b STANSFIELD et/ou *Shigella flexneri* 2b 69/50.

Où au moins deux types différents de GMMA sont utilisés, ils peuvent être présents dans un rapport de 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 2/1, 3/1 ou 4/1, de préférence environ 1/1. Particulièrement, au moins deux des quatre GMMA différents dans la composition immunogène sont présents dans un rapport de 1/4 à 4/1. Où des GMMA provenant d'au moins quatre sérotypes différents sont utilisés, ils peuvent être présents dans un rapport choisi parmi les options fournies dans le tableau ci-dessous, par exemple, un rapport de 1/1/1/1 (option de rapport 1). Lorsqu'il est fait référence à de tels rapports, il est évident qu'il sera généralement difficile de formuler une composition immunogène présentant le rapport exact et qu'une certaine variabilité existera.

<i>S. sonnei</i> (Ss), <i>S. flexneri</i> 2a (2a), <i>S. flexneri</i> 3a (3a) et <i>S. flexneri</i> 6 (6)					
Option de rapport	Ss / 2a / 3a / 6	Option de rapport	Ss / 2a / 3a / 6	Option de rapport	Ss / 2a / 3a / 6
1	1/1/1/1	23	1/4/2/2	45	2/4/2/1
2	1/1/1/2	24	1/4/2/4	46	2/4/4/1
3	1/1/1/4	25	1/4/4/1	47	4/1/1/1
4	1/1/2/1	26	1/4/4/2	48	4/1/1/2
5	1/1/2/2	27	1/4/4/4	49	4/1/1/4
6	1/1/2/4	28	2/1/1/1	50	4/1/2/1
7	1/1/4/1	29	2/1/1/2	51	4/1/2/2
8	1/1/4/2	30	2/1/1/4	52	4/1/2/4
9	1/1/4/4	31	2/1/2/1	53	4/1/4/1
10	1/2/1/1	32	2/1/2/2	54	4/1/4/2
11	1/2/1/2	33	2/1/2/4	55	4/1/4/4
12	1/2/1/4	34	2/1/4/1	56	4/2/1/1
13	1/2/2/1	35	2/1/4/2	57	4/2/1/2
14	1/2/2/2	36	2/1/4/4	58	4/2/1/4

15	1/2/2/4	37	2/2/1/1	59	4/2/2/1
16	1/2/4/1	38	2/2/1/2	60	4/2/4/1
17	1/2/4/2	39	2/2/1/4	61	4/4/1/1
18	1/2/4/4	40	2/2/2/1	62	4/4/1/2
19	1/4/1/1	41	2/2/4/1	63	4/4/1/4
20	1/4/1/2	42	2/4/1/1	64	4/4/2/1
21	1/4/1/4	43	2/4/1/2	65	4/4/4/1
22	1/4/2/1	44	2/4/1/4		

Les compositions immunogènes peuvent comprendre toute quantité appropriée de GMMA par dose unitaire. Le terme « dose unitaire » se rapporte à une quantité de principe actif pharmaceutique, par exemple une quantité de protéines de GMMA, appropriée pour une administration dans une seule dose, selon les bonnes pratiques médicales. Les quantités de protéines de GMMA peuvent être de 0,1 à 200 µg par dose unitaire, particulièrement 10 µg, 20 µg, 25 µg, 50 µg ou 100 µg. Par dose unitaire, les compositions immunogènes aqueuses de l'invention peuvent comprendre une concentration totale de protéines de GMMA de moins de 200 µg/ml, de moins de 100 µg/ml ou inférieure, 80 µg/ml ou inférieure, 50 µg/ml ou inférieure, 25 µg/ml ou inférieure, 20 µg/ml ou inférieure, 15 µg/ml ou inférieure, 10 µg/ml ou inférieure. Par dose unitaire, les compositions immunogènes aqueuses de l'invention peuvent comprendre une concentration totale de protéines de GMMA de 5 µg/ml à 200 µg/ml, de 5 µg/ml à 100 µg/ml, de 10 µg/ml à 100 µg/ml, de 10 µg/ml à 80 µg/ml, de 10 µg/ml à 50 µg/ml, 25 µg/ml à 50 µg/ml. Par dose unitaire, les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre une concentration totale de protéines de GMMA supérieure à 100 µg/ml, supérieure

à 80 µg/ml, supérieure à 50 µg/ml, supérieure à 25 µg/ml, supérieure à 20 µg/ml, supérieure à 15 µg/ml ou supérieure à 10 µg/ml. La quantité de GMMA peut être également quantifiée en mesurant le polysaccharide de l'AgO. Par exemple, le rapport du polysaccharide de l'AgO sur les protéines (AgO/protéines, exprimé en termes de p/p) peut se situer dans la plage de 0,06 à 1,1 µg d'AgO/µg de protéines, de 0,65 à 1,1 µg d'AgO/µg de protéines, 0,75 à 1,1 µg d'AgO/µg de protéines ou de 0,85 à 1,0 µg d'AgO/µg de protéines. Particulièrement, pour *S. flexneri* 2a, le rapport AgO/protéines peut être de 0,85 à 1,0 µg d'AgO/µg de protéines, pour *S. flexneri* 3a, le rapport AgO/protéines peut être de 0,75 à 1,1 µg d'AgO/µg de protéines, pour *S. sonnei* et *S. flexneri* 6, le rapport AgO/protéines peut être de 0,06 à 1,0 µg d'AgO/µg de protéines, particulièrement environ 0,06 µg d'AgO/µg de protéines. Ainsi, en se basant sur un rapport AgO/protéines de 0,75 µg d'AgO/µg de protéines, des quantités particulières de GMMA par dose unitaire peuvent se situer comme ci-dessus dans la plage de 150 à 200 µg/ml et en se basant sur un rapport AgO/protéines de 0,8 à 1,0 µg d'AgO/µg de protéines, des quantités particulières de GMMA par dose unitaire peuvent être comme ci-dessus particulièrement dans la plage de 160 à 200 µg/ml.

Les protéines de GMMA provenant de chaque sérotype différent peuvent être présentes dans une quantité de 0,1 à 200 µg, par exemple de 0,1 à 80 µg, 0,1 à 100 µg et en particulier de 5 à 25 µg. Les quantités appropriées de GMMA provenant de chaque sérotype différents peuvent comprendre 0,1, 1, 5, 10, 20, 25, 30,

35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 et 100 µg par dose unitaire. Les compositions immunogènes de l'invention comprennent des GMMA purifiés ou isolés à partir de plus d'une souche de *Shigella* et il est typique que les
5 GMMA soient préparés avant le mélange avec des excipients pharmaceutiquement acceptables, tels que des tampons. Les GMMA provenant de chaque souche peuvent être formulés individuellement avec un adjuvant, tels que ALHYDROGEL®, avant la combinaison avec des GMMA
10 purifiés ou isolés à partir d'une autre souche et le mélange avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables. En variante, les GMMA provenant de chaque souche peuvent être purifiés/isolés, combinés avec des GMMA purifiés ou isolés à partir de
15 l'autre ou des autres souches, formulés avec un adjuvant et ensuite mélangés avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables. D'autres procédés seront évidents pour l'homme du métier.

Les termes « purifié » et « isolé » sont
20 généralement pris comme ayant la signification de l'art. De préférence, les GMMA purifiés ou isolés sont des préparations dépourvues de cellules, de façon encore davantage préférée les GMMA présentent des taux faibles de contamination par des protéines cytoplasmiques, par
25 exemple, moins de 10 %, moins de 9 %, moins de 8 %, moins de 7 %, moins de 6 %, moins de 5 % ou moins de 4 %. Par exemple, mesurée en utilisant une spectrométrie de masse de haute sensibilité avec un indice de quantification absolue basé sur l'intensité
30 (iBAQ) sans marqueur comparativement à des compositions de cellules solubilisées des souches productrices de

GMMA, pratiquement la totalité de la teneur en protéines dans les GMMA est dérivée de protéines localisées dans la membrane externe ou périplasmiques, particulièrement plus de 90 %, encore plus particulièrement plus de 95 %, plus de 96 %, plus de 97 %, plus de 98 % ou plus de 99 %. Ainsi, plus de 95 % de la teneur en protéines dans les GMMA comprend des protéines localisées dans la membrane externe ou périplasmiques. Particulièrement, les GMMA purifiés/isolés comprennent un enrichissement d'approximativement 10 fois des protéines à la fois périplasmiques et de la membrane externe dans les GMMA comparativement aux protéines cellulaires totales des souches productrices de GMMA.

En bref, les compositions immunogènes de l'invention peuvent être administrées en doses uniques ou multiples. Une dose unique des compositions immunogènes de l'invention peut être efficace. En variante, une dose unitaire suivie d'une seconde dose unitaire peut être efficace. Généralement, la deuxième (ou troisième, quatrième, cinquième etc.) dose unitaire est identique à la première dose unitaire. La seconde dose unitaire peut être administrée à tout moment approprié après la première dose unitaire, en particulier après 1, 2 ou 3 mois. Généralement, les compositions immunogènes de l'invention seront administrées par voie intramusculaire, par exemple, par administration intramusculaire dans la cuisse ou le haut du bras comme il est décrit ci-dessous mais elles peuvent être également administrées par voie intradermique ou intranasale.

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre un ou plusieurs adjuvants. Les adjuvants particuliers comprennent des adjuvants d'aluminium, par exemple, l'hydroxyde d'aluminium, 5 ALHYDROGEL®, le phosphate d'aluminium, le sulfate de potassium et d'aluminium et l'alun. L'utilisation d'adjuvants d'aluminium est avantageuse puisque l'adsorption des GMMA sur l'adjuvant réduit la réponse pyrogène permettant d'administrer, chez les lapins, des 10 doses 100 fois supérieures de GMMA comparativement aux GMMA seuls. L'utilisation d'autres adjuvants qui réduisent également la réponse pyrogène est également envisagée et pourra être identifiée par l'homme du métier en utilisant les tests exemplifiés ci-dessous. 15 Alors que le terme « adjuvant » se rapporte généralement à toute substance qui augmente la réponse immunitaire envers un antigène, dans le cas présent, et sans souhaiter être lié par des hypothèses, l'adjuvant, tel que ALHYDROGEL®, est également un adsorbant 20 réduisant la réponse immunitaire envers les GMMA. Ainsi, le terme « adsorbant » se rapporte à un substrat solide ou à un matériau auquel les GMMA peuvent se lier, se fixer ou s'adsorber (par exemple, par des interactions de Van der Waals ou des liaisons hydrogène) de telle 25 façon que la réponse pyrogène aux GMMA est réduite comparativement aux GMMA qui ne sont pas ainsi liés, fixés ou adsorbés. A titre d'exemple non limitatif, l'immunogénicité des GMMA peut être mesurée en comparant la réponse en anticorps anti-LPS.

Procédés et utilisations pharmaceutiques

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre en outre un support pharmaceutiquement acceptable. Les « supports pharmaceutiquement acceptables » types comprennent tout support qui n'induit pas lui-même la production d'anticorps nocifs pour l'individu recevant la composition. Les supports appropriés sont généralement de grosses macromolécules métabolisées lentement telles que des protéines, des polysaccharides, des polyacides lactiques, des polyacides glycoliques, des acides aminés polymères, des copolymères d'acides aminés, le saccharose, le tréhalose, le lactose, et des agrégats lipidiques (tels que des gouttelettes d'huile ou des liposomes). De tels supports sont bien connus d'une personne ayant des compétences moyennes dans le domaine. Les compositions immunogènes de l'invention peuvent également contenir des diluants, tels que l'eau, le sérum physiologique, le glycérol, etc. En outre, des substances auxiliaires, telles que des agents de mouillage ou des émulsifiants, des substances tampons du pH, et analogues, peuvent être présentes. Le sérum physiologique tamponné par du Tris apyrogène stérile est un support préféré particulièrement lors de l'utilisation d'adjuvants d'aluminium parce que le phosphate dans la solution tampon phosphate peut interférer avec la liaison des GMMA à l'aluminium.

Les compositions peuvent être préparées sous la forme d'injectables, sous la forme soit de solutions soit de suspensions liquides. Des formes solides appropriées pour une solution dans, ou une suspension

dans, des véhicules liquides avant injection peuvent être également préparées (par exemple, une composition lyophilisée ou une composition cryodesséchée par pulvérisation). La composition peut être préparée pour
5 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, sous la forme d'une pulvérisation, ou
10 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
15 suppositoire ou d'un ovule. La composition peut être préparée pour une administration nasale, auriculaire ou oculaire, par exemple, sous la forme de gouttes. La composition peut être sous forme de kit, conçu de telle façon qu'une composition combinée est reconstituée
20 juste avant l'administration à un mammifère. De tels kits peuvent comprendre un ou plusieurs antigènes sous forme liquide et un ou plusieurs antigènes lyophilisés. Les compositions peuvent être présentées dans des flacons, ou elles peuvent être présentées dans des
25 seringues préremplies. Les seringues peuvent être fournies avec ou sans aiguille. Une seringue comprendra une dose unique de la composition, tandis qu'un flacon peut comprendre une dose unique ou des doses multiples.

Les compositions aqueuses de l'invention sont
30 également appropriées pour reconstituer d'autres vaccins à partir d'une forme lyophilisée. Lorsqu'une

composition de l'invention doit être utilisée pour une telle reconstitution extemporanée, l'invention fournit un kit, qui peut comprendre deux flacons, ou qui peut comprendre une seringue préremplie et un flacon, avec
5 le contenu de la seringue utilisé pour réactiver le contenu du flacon avant injection.

Les compositions de l'invention peuvent être conditionnées sous une forme de dose unitaire ou sous une forme de doses multiples. Pour les formes de doses
10 multiples, les flacons sont préférés aux seringues préremplies. Les volumes posologiques efficaces peuvent être établis en routine, mais une dose humaine type de la composition a un volume de 0,5 ml, par exemple, pour une injection intramusculaire.

15 Le pH de la composition est situé de préférence entre 6 et 8, de préférence environ 7. Pour les compositions comprenant des antigènes O acétylés, particulièrement le pH de la composition est inférieur à 7, de préférence environ 6 (pour ralentir la vitesse
20 de désestérification). Un pH stable peut être maintenu par l'utilisation d'un tampon. Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre un tampon Tris [Tris(hydroxyméthyl)aminométhane]. Le tampon Tris peut comprendre environ 1 à 20 mM de [Tris(hydroxy-
25 méthyl)aminométhane], par exemple, 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM ou 10,0 mM. Pour les compositions comprenant des antigènes O acétylés, particulièrement le tampon n'est pas un tampon Tris. Les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre un tampon succinate à 5
30 à 20 mM, par exemple, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM ou 20 mM. Les compositions immunogènes

de l'invention peuvent comprendre un tampon histidine à 5 à 20 mM, par exemple, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 12,5 mM, 15 mM, 17,5 mM ou 20 mM. La composition sera stérile. Les compositions de l'invention peuvent être
5 isotoniques par rapport aux êtres humains.

Ainsi, les compositions de l'invention peuvent être utiles en tant que vaccins. Les vaccins selon l'invention peuvent être soit prophylactiques (c'est-à-dire pour prévenir une infection) soit thérapeutiques
10 (c'est-à-dire pour traiter une infection), mais ils seront généralement prophylactiques. Le terme « protégé contre une infection » signifie que le système immunitaire d'un sujet a été sensibilisé (par exemple, par vaccination) pour déclencher une réponse
15 immunitaire et repousser l'infection. Il sera clair pour l'homme du métier qu'un sujet vacciné peut ainsi se retrouver infecté, mais est mieux capable de repousser l'infection qu'un sujet témoin. Le terme « traitement » comprend à la fois un traitement
20 thérapeutique et un traitement prophylactique ou préventif, où l'objet est de prévenir ou d'amoindrir une infection. Par exemple, le traitement peut comprendre une influence directe ou une guérison, une suppression, une inhibition, une prévention, une
25 réduction de la gravité, un retard dans l'installation, une réduction des symptômes associés à, par exemple, une infection ou l'une de leurs combinaisons. « Prévention » peut se rapporter, entre autres, à un retard dans l'installation des symptômes, à une
30 prévention de la rechute d'une maladie, et analogues. Le traitement peut également comprendre une

« suppression » ou une « inhibition » d'une infection ou d'une maladie, par exemple, une réduction de la gravité, du nombre, de l'incidence ou de la latence des symptômes, une amélioration des symptômes, une
5 réduction des symptômes secondaires, une réduction des infections secondaires, une prolongation de la survie des patients, ou leurs combinaisons. Les compositions immunogènes utilisées en tant que vaccins comprennent une quantité immunologiquement efficace d'un ou de
10 plusieurs antigènes, ainsi que tous les autres composants, selon les besoins. Par « quantité immunologiquement efficace », il est signifié que l'administration de cette quantité à un individu, soit en une dose unique soit faisant partie d'une série, est
15 efficace pour le traitement ou la prévention. Cette quantité varie selon l'état de santé et la condition physique de l'individu à traiter, de son âge, du groupe taxonomique de l'individu à traiter (par exemple, primate non humain, primate, etc.), la capacité du
20 système immunitaire de l'individu à synthétiser des anticorps, le degré de protection souhaité, la formulation du vaccin, l'estimation par le médecin traitant de la situation médicale, et d'autres facteurs pertinents. On s'attend à ce que la quantité se situe
25 au sein d'une plage relativement large qui peut être déterminée par des essais de routine.

Les compositions de l'invention peuvent comprendre un antimicrobien, particulièrement lorsqu'elles sont conditionnées dans des formats de doses multiples. Les
30 compositions de l'invention peuvent comprendre des sels de sodium (par exemple, le chlorure de sodium) pour

donner la tonicité. Une concentration de 10 ± 2 mg/ml de NaCl est typique. Dans certains modes de réalisation, une concentration de 4 à 10 mg/ml de NaCl peut être utilisée, par exemple, 9,0, 7,0, 6,75 ou 4,5 mg/ml. Les
5 compositions de l'invention comprendront généralement un tampon.

Procédés de traitement

L'invention fournit également un procédé permettant de soulever une réponse immunitaire chez un
10 mammifère, comprenant l'administration d'une composition pharmaceutique de l'invention au mammifère. La réponse immunitaire est de préférence protectrice et elle implique de préférence des anticorps. Le procédé peut soulever une réponse de rappel.

15 Le mammifère est de préférence un être humain. Lorsque le vaccin est destiné à une utilisation prophylactique, l'être humain peut être un adulte, un enfant (par exemple, un jeune enfant ou un nourrisson) ou un adolescent ; lorsque le vaccin est destiné à une
20 utilisation thérapeutique, l'être humain est de préférence un enfant. Un vaccin prévu pour des enfants peut être également administré à des adultes, par exemple, pour estimer l'innocuité, le dosage, l'immunogénicité, etc. Une classe préférée d'êtres
25 humains pour le traitement consiste en les femmes en âge de porter un enfant (par exemple, les adolescentes et plus âgées). Une autre classe préférée consiste en les femmes enceintes.

L'invention fournit également une composition de
30 l'invention pour une utilisation en tant que médicament. Le médicament est de préférence capable de soulever une

réponse immunitaire chez un mammifère (c'est-à-dire qu'il s'agit d'une composition immunogène) et il est de façon davantage préférée un vaccin.

L'invention fournit également l'utilisation d'une
5 composition de l'invention dans la fabrication d'un médicament destiné à soulever une réponse immunitaire chez un mammifère.

Ces utilisations et procédés sont de préférence pour la prévention et/ou le traitement de maladies
10 provoquées par *Shigella*, par exemple, la shigellose, la dysenterie et les symptômes associés y compris les diarrhées, la fièvre, la douleur abdominale, le ténésme, etc. Ces utilisations et procédés sont de préférence pour la prévention et/ou le traitement de maladies
15 provoquées à la fois par *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri*.

Les compositions de l'invention seront généralement administrées directement à un patient. Une administration directe peut être accomplie par une
20 injection parentérale (par exemple, par voie sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, ou dans l'espace interstitiel d'un tissu), ou par une administration rectale, orale, vaginale, topique, transdermique, intranasale, oculaire,
25 auriculaire, pulmonaire ou autre mucosale. L'administration intramusculaire dans la cuisse ou le haut du bras est préférée. L'injection peut être effectuée à l'aide d'une aiguille (par exemple, une aiguille hypodermique), mais une injection sans
30 aiguille peut en variante être utilisée. Une dose intramusculaire type est de 0,5 ml. Pour une

administration à un être humain, la dose peut être d'environ 100 µg mesurée par les protéines, par exemple, administrées dans une dose de 0,5 ml à une concentration de 200 µg de protéines/ml. L'invention
5 peut être utilisée pour déclencher une immunité systémique et/ou mucosale. Le traitement posologique peut être un calendrier d'une dose unique ou un calendrier de doses multiples. Les doses multiples peuvent être utilisées dans un calendrier
10 d'immunisation primaire et/ou dans un calendrier d'immunisation de rappel. Un calendrier de doses primaires peut être suivi d'un calendrier de doses de rappel. Le temps approprié entre les doses de sensibilisation (par exemple, entre 4 et 16 semaines),
15 et entre les doses de sensibilisation et de rappel, peut être déterminé en routine.

Généralités

Le terme « comprenant » englobe « incluant » ainsi que « constitué de », par exemple, une composition
20 « comprenant » X peut être constituée exclusivement de X ou elle peut inclure quelque chose de supplémentaire, par exemple, X + Y.

Le terme « sensiblement » n'exclut pas « complètement », par exemple, une composition qui est
25 « sensiblement dépourvue » de Y peut être complètement dépourvue de Y. Lorsque c'est nécessaire, le terme « sensiblement » peut être omis de la définition de l'invention.

Sauf indication contraire, un procédé comprenant
30 une étape de mélange de deux composants ou plus ne nécessite pas un ordre spécifique de mélange. Ainsi,

les composants peuvent être mélangés dans n'importe quel ordre. Lorsqu'il y a trois composants, alors deux composants peuvent être combinés l'un avec l'autre, et ensuite la combinaison peut être combinée avec le
5 troisième composant, etc.

Sauf indication contraire, l'identité entre des séquences polypeptidiques est déterminée de préférence par l'algorithme de recherche d'homologie de Smith-Waterman tel qu'implémenté dans le programme MPSRCH
10 (Oxford Molecular), en utilisant une recherche de brèche affine avec des paramètres de pénalité d'ouverture de brèche = 12 et de pénalité d'extension de brèche = 1.

La pratique de la présente invention emploiera,
15 sauf indication contraire, des procédés traditionnels de chimie, de biochimie, de biologie moléculaire, d'immunologie et de pharmacologie, au sein des compétences de l'art. De telles techniques sont expliquées pleinement dans la littérature.

20 Dans certaines mises en œuvre, le terme « comprenant » se rapporte à l'inclusion de l'agent actif indiqué, tel que les polypeptides cités ou les GMMA, ainsi qu'à l'inclusion d'autres agents actifs, et de supports, excipients, émoullients, stabilisants, etc.
25 pharmaceutiquement acceptables, comme il est connu dans l'industrie pharmaceutique. Dans certaines mises en œuvre, le terme « constitué essentiellement de » se rapporte à une composition, dont le seul principe actif est le ou les principes actifs indiqués, toutefois,
30 d'autres composés peuvent être inclus, lesquels sont destinés à la stabilisation, la conservation, etc. de

la formulation, mais ne sont pas impliqués directement dans l'effet thérapeutique du principe actif indiqué. L'utilisation de la phrase de transition « constitué essentiellement » signifie que l'étendue d'une
5 revendication doit être interprétée comme englobant les matériaux spécifiés ou les étapes citées dans la revendication, et ceux/celles qui ne touchent pas matériellement la ou les caractéristiques de base et nouvelles de l'invention revendiquée. Voir, dans Herz,
10 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (souligné dans l'original) ; voir également MPEP § 2111.03. Ainsi, le terme « constitué essentiellement de », lorsqu'il est utilisé dans une revendication de cette invention n'est pas censé être interprété comme
15 un équivalent de « comprenant ». Le terme « constitué de » et ses variations comprennent y compris et limité à, sauf s'il est expressément précisé le contraire. Le terme « environ » en rapport avec une valeur numérique x signifie, par exemple, x + 10 %, x + 5 %, x + 4 %, x + 3 %, x + 2 %, x + 1 %.

Modes de réalisation de l'invention

Production de la souche de *S. sonnei*

S. sonnei 53G [15] a été choisie en tant que
25 souche parente. La souche NVGH1859 de *S. sonnei* (*S. sonnei* 53G $\Delta tolR::kan \Delta virG::nadAB$) a été obtenue en remplaçant le gène *virG* codé par le plasmide [16] dans *S. sonnei* 53G $\Delta tolR::kan$ [17] par les gènes *nadA* et *nadB* d'*E. coli* [18]. Les régions en amont et en aval
30 de *virG* ont été amplifiées en utilisant les paires d'amorces *virGup-5/virGup-3* (en amont) et *virGdown-*

5/virGdown-3 (en aval) (tableau 1). La cassette « nadAB » a été produite en amplifiant *nadA* et *nadB* d'*E. coli* en utilisant les amorces nadA-5/nadA-3 et nadB-5/nadB-3 (tableau 1). Les fragments ont été
 5 insérés dans pBluescript (Stratagene) de telle façon que *nadA* et *nadB* soient liés et interposés dans les régions flanquantes de *virG*. La construction de remplacement (virGup-nadAB-virGdown) a été amplifiée en utilisant les amorces virGup-5/virGdown-3 et utilisée
 10 pour transformer *S. sonnei* $\Delta tolR::kan$ encline à la transformation telle que décrite auparavant [17].

La souche NVGH1790 de *S. sonnei* (*S. sonnei* 53G $\Delta tolR::kan$ $\Delta virG::nadAB$ $\Delta htrB::cat$) a été produite à partir de NVGH1859 en remplaçant le gène *htrB* [19] par
 15 le gène de résistance au chloramphénicol *cat* comme il est décrit par Rossi et al. [20].

Tableau 1

Amorces utilisées dans cette étude pour la production
 20 de souches de *S. sonnei* productrices de GMMA

Amorce	SEQ ID No :	Séquence 5' → 3'
virGup-5	1	ACTCGAGCTCTGTAGTTGATTTGACAGTTGACATCC
virGup-3	2	CTAACCCGGGCACTATATTATCAGTAAGTGGTTGATAAACC
virGdown	3	CTAACCCGGGCGTGTGATGTCCTGC
virGdown	4	ACGCGTCGACAGTTCAGTTCAGGCTGTACGC
nadA-5*	5	CTAACCCGGGCAAGCAACTCTATGTCGGTGGAAT
nadA-3*	6	TATCAAGCTTGGCAAGGCCAATACACAGC
nadB-5*	7	TATCAAGCTTAGGGTTAGAGTGTCTCGTTTTTGTA
nadB-3*	8	CTAACCCGGGCCAGACCAGAACTATTCC

*amorces *nadA* et *nadB* telles que décrites par Prunier et al. [18] avec des petites modifications.

Production de la souche de *S. flexneri* 2a

Des mutants de *S. flexneri* ont été préparés comme il a été décrit auparavant dans J Biol Chem. 2014 Sep 5; 289(36): 24922-24935. *S. flexneri* 2a 2457T a été choisie comme souche parente. Pour la production de mutants à partir de *S. flexneri* 2a sans plasmide de virulence, une colonie blanche a été choisie par son aspect blanc sur une gélose au rouge Congo avant le départ de la modification génétique. L'élimination du plasmide de virulence (pINV) a été confirmée par l'absence de l'origine de réplication (ori) et des gènes codés par le plasmide, *virG* et *ospD3*, en utilisant une PCR. Les amorces sont énumérées dans le tableau 2. Pour produire la délétion de *tolR* dans *S. flexneri* 2a et *S. flexneri* 2a-pINV dépourvue de plasmide, la même stratégie et les mêmes amorces que décrites précédemment pour la production du mutant $\Delta tolR$ de *S. sonnei* (2) ont été utilisées.

La mutation nulle de *msbB1*, ou *htrB*, a été obtenue en remplaçant le gène d'intérêt par une cassette de résistance à un antibiotique, en utilisant la stratégie suivante. Les régions en amont et en aval ont été amplifiées en utilisant les paires d'amorces gene-U et gene-D. La cassette de résistance utilisée pour remplacer le gène a été amplifiée en utilisant les paires d'amorces EcoRV.Ery.F/EcoRV.Ery.R ou EcoRV.Cm.F/EcoRV.Cm.R. Les fragments ont été insérés dans pBluescript (Stratagene) de telle façon que le gène de résistance à l'antibiotique soit interposé dans les régions flanquantes du gène. La construction de remplacement (région en amont-cassette de résistance-

région en aval) a été amplifiée en utilisant les amorces se liant à l'extrémité 5' de la région flanquante en amont et à l'extrémité 3' de la région flanquante en aval du gène (voir le tableau 2) et
 5 utilisée pour transformer *S. flexneri*. Dans *S. flexneri* 2a, *msbB1* et *htrB* ont été remplacés par *cat*. Seule la mutation *msbB1* a dû être introduite dans la souche dépourvue de plasmide car le plasmide porte la seconde copie de *msbB* (*msbB2*) et celle-ci est absente dans une
 10 souche dépourvue de plasmide. Pour simplifier, le mutant est appelé $\Delta msbB$. La souche NVGH2404 de *S. flexneri* 2a (*S. flexneri* 2457T $\Delta tolR::kan$, $\Delta msbB::cat$) a été produite.

15

Tableau 2

Amorces utilisées dans cette étude pour la production de souches de *S. flexneri* 2a productrices de GMMA

Nom de l'amorce	SEQ ID NO :	Séquence 5' → 3'
<i>htrB</i> -U1 Xba Sma	9	CTAGTCTAGAAACCCGGGCAATTGTATGTATTGTCG
<i>htrB</i> -soU2 SacI	10	ACTCGAGCTCCCGTCATCATCCAACGC
<i>htrB</i> -flexU2 SacI	11	ACTCGAGCTCATCCGATATACGTTGCCCC
<i>htrB</i> -soD1 SalI	12	ACGCGTCGACCTCAGTAATCAGGGTTCTTTG
<i>htrB</i> -soD2 SmaI	13	CTAACCCGGGTAAATCTCCCCTGCCGGATG
<i>htrB</i> -flexD1 SalI	14	ACGCGTCGACCTGTAATCTCAGGTCAAATG
<i>htrB</i> -flexD2 SmaI	15	CTAACCCGGGTAAATCTCCCATGCCGGATG
<i>msbB</i> -flexU5 Sma	16	CTAGTCTAGAAACCCGGGTGATAGTGTAGCGGCACA
<i>msbB</i> -flexU3 Sac	17	ACTCGAGCTCGTGAGCAAAGCCAGCTG
<i>msbB</i> -flexD5 SalI	18	ACGCGTCGACCTCGGTGTGGAAATTGG
<i>msbB</i> -flexD3 Xba Sma	19	CTAACCCGGGCAACGTACTTACTCTACCG
P1. <i>htrB</i> compl-EcoRI	20	ACCGGAATTCGTGTAACACTGGCATGGTGTGA
P2. <i>htrB</i> compl-NcoI	21	CATGCCATTGTAGCAATCCGCTGTTGGTGCG
EcoRV.Ery.F	22	AGCTTGATATCAGAGTGTGTTGATAGTGAGTATC
EcoRV.Ery.R	23	AGCTTGATATCACCTCTTTAGCTTCTTGGAAGCT

EcoRV.Cm.F	24	AGCTTGATATCTGTGACGGAAGATCACTTCG
EcoRV.Cm.R	25	AGCTTGATATCGGGCACCAATAACTGCCTTA
Ori-1	26	CGGCATCAGAATAATACAAGCAGC
Ori-2	27	AGGTGTACCGTGCTCTGGG
virG-1	28	GTCACAGGTAACATGACTCTGGAG
virG-2	29	CCATGTGTGAATACTACCTTCACCC
ospD3-1	30	GTTTTGCCTCATTCAAGATATCACC
ospD3-2	31	TGACGATGGTTTGTGAGGATTGC
msbB.F	32	CGCCAAAGTTCCGTGATCCCAT
msbB.R	33	CTCTTCGATGATCTCCAGCCCTT

Production de *S. flexneri* 1b, 2b, 3a et 6

Des mutants de *S. flexneri* 1b, 2b, 3a et 6 ont été préparés en adaptant les procédés décrits dans [32].

5 Souches

Shigella flexneri 1b STANSFIELD, *Shigella flexneri* 2b 69/50, *Shigella flexneri* 3a 6885 et *Shigella flexneri* 6 10.8537 ont été choisies en tant que souches parentes. Pour la production des mutants sans plasmide de virulence, une colonie blanche a été choisie par son aspect blanc sur de la gélose au rouge Congo avant le départ de la modification génétique. L'élimination du plasmide de virulence (pINV) a été confirmée par l'absence des gènes de virulence codés par le plasmide, particulièrement *virG* (amorces 88/89) et *mxiA* (amorces 53/54), en utilisant une PCR. Les amorces sont énumérées dans le tableau 3.

Pour produire la délétion de *tolR* dans *S. flexneri* 1b, 2b, 3a, et 6, la cassette de la kanamycine a été amplifiée à partir du plasmide pKD4 [32] en utilisant les amorces 45/46 (tableau 3). Le remplacement du gène *tolR* dans des souches portant les plasmides pKD46 ou pAJD434 a été confirmé par PCR (amorces 39/40). L'élimination du marqueur sélectif de l'antibiotique a

été effectuée comme il est décrit dans [32], en utilisant le plasmide pCP20. La même stratégie a été utilisée pour la délétion des gènes *htrB* et *msbB* dans ces souches, en utilisant les amorces 49/50 et 51/52, respectivement, pour l'amplification de la cassette du chloramphénicol obtenue par PCR à partir du plasmide pKD3 (amorces 45/46). En variante, le remplacement de *htrB* et *msbB* a été effectué en utilisant le fragment obtenu à partir de l'amplification de la cassette du chloramphénicol par les amorces 78-81 et 74-77 (tableau 3), respectivement. Le remplacement des gènes *htrB* et *msbB* a été vérifié par PCR en utilisant les amorces 82/83 et 55/56, respectivement. Le marqueur sélectif du chloramphénicol (*cat*) a été éliminé comme il a été décrit [32]. La souche NVGH2766 de *S. flexneri* 3a (*S. flexneri* 6885 Δ *tolR::kan*, Δ *msbB::cat*) a été produite.

Tableau 3

Amorces utilisées dans la production des mutants de *S. flexneri* 1b, 2b, 3a et 6

Nom de l'amorce	SEQ ID NO :	Séquence 5'-3'
45-pKDF	34	CACGTCTTGAGCGATTGTGTAGG
46-pKDR	35	GACATGGGAATTAGCCATGGTCC
39-tolRsF	36	CAATTGGTCTGTTGCGCCG
40-tolRsR	37	CTACCGCACCTGAATCAACCA
47-tolRKOF	38	ACCGCCAGGCGTTTACCGTTAGCGAGAGCAACAAGGGTAAGCCATGGCCG TG TAGGCTGGAGCTGCTTC
48-tolRKOR	39	ACCGCTCTCTTTCAAGCAAGGGAACGCAGATGTTTAGATAGGCTGCGTCA TATGAATATCCTCCTTAG
49-htrBKOF	40	ACAATACATACAATTGCCCGTATAGGTTGAAAAACAGGATTGATATGACGGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC

50-htrBKOR	41	ATGCCGGATGCCATTCTGAAGCATCCGGCATGGGAGATTTAATAGCGTGACA TATGAATATCCTCCTTAG
51-msbBKOF	42	ACTATCACCAGATTGATTTTGCCTTATCCGAACTGGAAAAGCATGGAAGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
52-msbBKOR	43	TTTTATTTGATGGGATAAAGATCTTTGCGCTTATACGGCTGGATTTCGCCCAT ATGAATATCCTCCTTAG
53-mxiAF	44	CGATAGGGATGTTGCCAGGTT
54-mxiAR	45	CTATCGGCACGCACCTCATTTA
55-msbB2F	46	CTTTCCCCTGTTTACTGGTTTACA
56-msbB2R	47	TGTCCGCGCTGGCAATG
74-msbBKOUF	48	AACCCGCGTCGAACTAATCC
75-msbBKOUR	49	CCTACACAATCGCTCAAGACGTGCGTTTCCATGCTTTTCCAGTTT
76-msbBKODF	50	GGACCATGGCTAATTCCCATGTCCCATCAAATAAAAAAGCCTCTCG
77-msbBKODR	51	ATCCCGAGCATCAACGTTTC
78-htrBKOUF	52	GCGCAGTACCCAGAAGGAT
79-htrBKOUR	53	CCTACACAATCGCTCAAGACGTGGGTGGAGAACTTGGGTAGATTTCG
80-htrBKODF	54	GGACCATGGCTAATTCCCATGTCCCTTCACGCTATTAAATCTCCCA
81-htrBKODR	55	TGACTACATCTACACCAGCCCT
82-htrBF	56	GCGTACTTTGGTTGGTCGTG
83-htrBR	57	AACGAAGGGCACCAGACA
88-virGF	58	GGTTATGATGGCTACGGTGGTA
89-virGR	59	GTTTATAGTCCTTCTGCGCCCA
74-msbBKOUF	60	AACCCGCGTCGAACTAATCC
75-msbBKOUR	61	CCTACACAATCGCTCAAGACGTGCGTTTCCATGCTTTTCCAGTTT
76-msbBKODF	62	GGACCATGGCTAATTCCCATGTCCCATCAAATAAAAAAGCCTCTCG
77-msbBKODR	63	ATCCCGAGCATCAACGTTTC
78-htrBKOUF	64	GCGCAGTACCCAGAAGGAT
79-htrBKOUR	65	CCTACACAATCGCTCAAGACGTGGGTGGAGAACTTGGGTAGATTTCG
80-htrBKODF	66	GGACCATGGCTAATTCCCATGTCCCTTCACGCTATTAAATCTCCCA
81-htrBKODR	67	TGACTACATCTACACCAGCCCT

Conditions de croissance de *Shigella*

Les souches de *Shigella sonnei* et *Shigella flexneri* productrices de GMMA ont été cultivées en routine dans du milieu défini de *S. sonnei* (SSDM, [17]) avec du glucose comme source de carbone. Le SSDM a été préparé comme suit : 13,3 g/kg de KH_2PO_4 , 4 g/kg de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,7 g/kg d'acide citrique monohydraté,

2,5 g/kg d'acide L-aspartique, 493 mg/kg de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
2,7 mg/kg de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 15 mg/kg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,
1,5 mg/kg de $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 mg/kg de H_3BO_3 , 2,5 mg/kg de
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg/kg d'acétate de zinc monohydraté,
5 0,49 mg/kg de citrate ferrique, 50 mg/kg de thiamine.
Du glucose a été ajouté à une concentration de 5 g/kg
pour les cultures en milieu solide et dans des flacons
agités. Pour une croissance dans des fermenteurs, il a
été ajouté 27,3 g/kg de glucose et 0,25 g/kg de
10 polypropylène glycol (PPG). Le SSDM solide contenait
18 g/l de gélose. Le milieu de *Shigella flexneri* a été
en outre complémenté avec des acides aminés, des
vitamines, et une concentration supérieure de fer.

Préparation de banques cellulaires

15 Pour minimiser le risque de contamination par
l'encéphalite spongiforme transmissible (EST) ou
d'autres agents accidentels, la lignée cellulaire de
S. sonnei et les lignées cellulaires de *S. flexneri* ont
été nettoyées selon les GMP par trois passages sur des
20 plaques de gélose préparées avec du SSDM. Des flacons
de banques cellulaires maîtresses et de travail sont
préparés selon les GMP.

Cytométrie en flux des bactéries ou des GMMA

Des bactéries *Shigella* provenant d'un fermenteur
25 ou d'une culture à l'échelle du flacon ont été
préservées pour une analyse de cytométrie en flux par
fixation dans du formaldéhyde à 0,5 %. 9×10^4 à
 9×10^5 cellules ont été colorées avec un antisérum de
lapin monovalent (Denka Seiken Co., Ltd.), réagissant
30 avec l'antigène O (AgO) ou un antisérum polyclonal de
souris dirigé contre les GMMA formulés avec ALHYDROGEL®

pour les sérotypes de *Shigella*. Les anticorps liés ont été détectés en utilisant un fragment F(ab')₂ de chèvre anti-lapin ou une IgG, IgM ou IgA anti-souris conjugué à la fluorescéine (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.).

5 Les échantillons ont été fixés en utilisant du formaldéhyde à 4 % et analysés en utilisant un cytomètre en flux FACScanto™ II (BD Biosciences). Les données ont été traitées en utilisant le logiciel FlowJo (Tree Star Inc.).

10 Production des GMMA

Les descriptions qui suivent sont basées sur la production des 1790-GMMA de *S. sonnei*. Lorsque le procédé diffère pour la production de GMMA de *S. flexneri*, des indications supplémentaires sont
15 données.

Fermentation

Pour chaque lot de production, la souche de *Shigella* a été cultivée dans un ballon agité issu de la banque cellulaire de Recherche ou de GMP dans du SSDM à
20 30 °C avec agitation (200 tr/min), en démarrant à partir d'une densité optique mesurée à 600 nm (DO₆₀₀) de 0,02 jusqu'à ce que la culture ait atteint une DO₆₀₀ égale à $1,5 \pm 0,5$, habituellement en 9 ± 2 heures. Dans le bioréacteur (échelle de 30 l dans le bioréacteur
25 Biostat D75 de Sartorius ou échelle de 25 l dans le bioréacteur LP35 de Bioengineering), les souches sont cultivées en mode fermé en démarrant à partir d'une taille d'inoculum de 2 % avec des conditions de culture contrôlées : pH 6,7 maintenu par l'addition de NH₄OH à
30 28 %, 30 °C, de l'oxygène dissous maintenu à 30 % de saturation par un débit d'air de 1 volume d'air par

volume de culture par minute (vvm), une agitation et une pression en cascade (200 à 800 tr/min, 50 à 1250 mbarg) jusqu'à la DO600 finale de 35.

Purification

5 Les GMMA libérés dans le bouillon de fermentation ont été purifiés en utilisant deux étapes consécutives de filtration à flux tangentiel (TFF) : une microfiltration dans laquelle le surnageant de la culture contenant les GMMA est séparé des bactéries, et
10 une ultrafiltration, dans laquelle les GMMA ont été séparés des protéines solubles. Pour l'étape de microfiltration (1,2 m² de membrane de cellulose avec une taille de pore de 0,2 µm), le bioréacteur a été relié au système de TFF, afin d'utiliser le récipient
15 de fermentation comme cuve de recirculation. Le surnageant de la culture a été initialement concentré trois fois pour atteindre « un volume » de surnageant concentré, ceci suivi d'une diafiltration discontinue contre cinq volumes du tampon dans le milieu de
20 croissance (13,3 g/kg de KH₂PO₄ ; 4 g/kg de NH₄HPO₄ ; 1,7 g/kg d'acide citrique ; 4 ml/l de NH₄OH ; pH 6,7). Du sérum physiologique peut être également utilisé. Le matériau microfiltré, contenant les GMMA, a été ensuite filtré à travers une capsule de filtres avec des
25 filtres de 0,45 µm puis de 0,2 µm (Sartorius) pour assurer l'absence de toute bactérie *Shigella* viable avant un autre traitement. L'étape d'ultrafiltration (1,4 m² de membrane de PES avec une taille de pore de 300 kDa) a consisté en une concentration suivie d'une
30 diafiltration discontinue de la solution microfiltrée des GMMA contre dix volumes de sérum physiologique

tamponné par du Tris (TBS), 0,9 % de NaCl, 10 mM de Tris/Tris HCl pH 7,4 ou 0,9 % p/v de chlorure de sodium, et a permis une élimination substantielle des acides nucléiques et des protéines solubles. Une concentration
5 finale des GMMA purifiés a été effectuée pour obtenir la concentration requise pour le traitement de formulation et filtrée à travers un filtre stérilisant en acétate de cellulose de Sartorius qui a été validé pour la capacité de rétention des produits extractibles,
10 lixiviables et des bactéries avec le vrac des GMMA. Trois lots de GMMA de *S. sonnei* non conformes aux GMP ont été préparés à partir d'un volume de fermentation de 30 l. En outre, deux lots GMP ont été produits et libérés pour supporter en outre la fabrication de
15 vaccins de toxicologie et cliniques. Les GMMA en vrac de *S. sonnei* ont été testés pour leur aspect, leur identité, leur teneur en protéines totales et solubles, leur teneur en antigène O, leur teneur en LPS, leur pH, leur osmolalité, leur pureté et leur taille.

20 Formulation

Les GMMA ont été adsorbés sur de l'hydroxyde d'aluminium (ALHYDROGEL® 2 %, Brenntag Biosector, Danemark) en ajoutant la suspension de GMMA à ALHYDROGEL® sous agitation constante à température
25 ambiante pendant 2 h ceci suivi d'une mise en flacon. La formulation des GMMA-ALHYDROGEL® contient 12,7 µg/ml d'antigène O de *S. sonnei*, 200 µg/ml de protéines de GMMA et 0,7 mg/ml d'ions aluminium-III (Al³⁺) comme ALHYDROGEL® dans du TBS. Un tampon histidine peut être
30 également utilisé. La formulation a été distribuée à 0,7 ml par flacon de dose unique de 3 ml. La

formulation a été testée pour l'identité, la teneur en protéines totales, la teneur en aluminium, le volume des composés extractibles, les protéines non adsorbées, l'aspect visuel, le pH, l'osmolalité, la stérilité, l'immunogénicité, et la pyrogénicité.

Trois lots GMP de *S. sonnei* 1790GAHB, un lot de toxicologie et deux lots cliniques, ont été préparés et libérés. Un lot de stabilité non GMP plus petit (140 ml) a été également produit. Des lots de laboratoire à petite échelle fraîchement formulés ont été produits pour des études initiales de pyrogénicité et d'immunogénicité.

Formulation GMP de GAHB-Placebo

Un placebo, également utilisé en tant que diluant, a été préparé contenant 0,7 mg/ml de Al^{3+} comme ALHYDROGEL® dans du TBS et a été distribué à 0,7 ml par flacon de 3 ml. Un tampon histidine peut être également utilisé. Le GAHB-Placebo a été testé pour son identité, sa teneur en aluminium, son volume de composés extractibles, son aspect visuel, son pH, son osmolalité, sa stérilité et sa pyrogénicité. Deux lots GMP de GAHB-Placebo ont été produits et libérés.

Procédés analytiques physico-chimiques

Quantification des protéines des GMMA

Les GMMA produits à partir de la souche NVGH1790 sont appelés 1790-GMMA. La quantification des protéines a été effectuée en routine par le dosage de Lowry. Pour la détermination de la concentration des protéines des GMMA, les dosages ont utilisé un étalon secondaire de BSA étalonné comme il a été décrit auparavant [28] contre un étalon primaire de 1790-GMMA avec une teneur

en protéines déterminée par une analyse quantitative des acides aminés. Ainsi toutes les concentrations en protéines des GMMA sont référencées indirectement à la concentration en protéines déterminée par l'analyse des acides aminés. Les échantillons contenant du Tris ont été dilués jusqu'à une concentration finale de Tris inférieure ou égale à 1 mM pour éviter une interférence avec le dosage de Lowry. Le dosage microBCA peut être également utilisé pour la quantification des protéines des GMMA.

Quantification des protéines des GMMA formulés avec ALHYDROGEL®

Pour la quantification des protéines des GMMA adsorbés sur ALHYDROGEL® (par exemple, 1790GAHB), le dosage de Lowry ou microBCA est également utilisé, et l'étalon secondaire de BSA a été adsorbé sur ALHYDROGEL®. Après le développement de la couleur, les échantillons ont été centrifugés et les absorbances des surnageants ont été déterminées. Les protéines solubles non adsorbées sur les préparations de GMMA ont été déterminées dans le surnageant des formulations de ALHYDROGEL® après ultracentrifugation à 186 000 g à 4 °C pendant 2 h en utilisant un étalon secondaire de BSA étalonné contre un étalon primaire de protéines solubles quantifiées par l'analyse quantitative des acides aminés.

La teneur en protéines non liées dans les GMMA adsorbés sur ALHYDROGEL® était trop faible pour être mesurée par le dosage de Lowry ou microBCA et elle a été estimée comme étant la valeur limite du test par SDS-PAGE (gel de bis-acrylamide à 10 %) des surnageants

recueillis après centrifugation de l'échantillon et comparée à une série de 1790-GMMA de référence dans un couloir parallèle. Les bandes des protéines ont été visualisées par coloration à l'argent, quantifiées par densitométrie et les données ont été analysées en utilisant le logiciel ImageScanner III. L'intensité des bandes détectables dans l'échantillon de surnageant a été comparée (comme valeur limite du test) à l'intensité des bandes correspondantes dans l'échantillon de 1790-GMMA. La limite correspond à 5 µg/ml de protéines non adsorbées (2,5 % des protéines totales de la formulation de 1790GAHB).

Profil des protéines des GMMA

Les 1790-GMMA ont été dénaturés pendant 10 min à 100 °C dans du tampon à échantillon pour électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) contenant du SDS (Invitrogen, tampon à échantillon LDS NuPAGE) et 50 mM de dithiothréitol (DTT). 3 µg de protéines ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à 10 % (p/v) (Invitrogen, Novex 10 %). L'électrophorèse a été réalisée dans du tampon d'acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique (MOPS) (Invitrogen) à 40 mA pendant 75 min. Les protéines séparées ont été colorées avec du bleu brillant G de Coomassie colloïdal (Sigma-Aldrich), quantifiées en utilisant la densitométrie et analysées en utilisant le logiciel ImageScanner III. Les profils des protéines des échantillons à tester ont été comparés aux profils des GMMA de référence soumis à une électrophorèse sur le même gel.

Quantification de l'antigène O dans les GMMA

Pour une caractérisation détaillée et les tests de libération des lots, la concentration de l'antigène O (AgO) a été mesurée par une analyse HPAEC-PAD. La quantification détermine le poids en mg de l'AgO total
5 présent dans l'échantillon.

Etalon de référence de l'antigène O : des GMMA de *S. sonnei* NVGH1859 (1859-GMMA) ont été hydrolysés pendant 2 h à 100 °C dans de l'acide acétique à 1 %. Le lipide A clivé et les protéines précipitées ont été
10 chacun éliminés par centrifugation [21]. La fraction principale (poids moléculaire moyen, PMM) de l'AgO a été récupérée par chromatographie d'exclusion (SEC, colonne GE Sephacryl S-100HR). La taille de l'AgO a été déterminée en mesurant le nombre d'unités répétitives
15 par RMN ¹H [22]. La moyenne a été de 33. La quantité d'antigène O a été déterminée à partir du nombre moyen d'unités répétitives et la concentration molaire du cœur de LPS par galactose mesurée par une analyse HPAEC-PAD telle que décrite ci-dessus et dans
20 Quantification du LPS ci-dessous. Comme variante, la quantification de l'AgO peut être effectuée par une RMN ¹H quantitative (qRMN) en utilisant de l'acide maléique comme étalon interne.

Quantification de l'antigène O dans les GMMA : le
25 LPS a été purifié par une extraction à chaud avec du phénol-eau [23] comme suit : 400 µl d'échantillon ont été ajoutés à un volume égal de solution de phénol à 90 % pH 8 (Sigma-Aldrich) et incubés à 80 °C pendant 2 h. Après refroidissement à 4 °C, l'échantillon a été
30 centrifugé à 18 000 g à 4 °C pendant 15 min et la phase aqueuse supérieure contenant le LPS a été récupérée. La

phase phénolique a été à nouveau extraite avec 400 µl d'eau (1 h à 80 °C) et après centrifugation (18 000 g à 4 °C pendant 15 min), la phase aqueuse a été récupérée, combinée avec le premier extrait aqueux et séchée pendant une nuit dans un évaporateur centrifuge. L'échantillon a été reconstitué dans de l'eau (400 µl) et éventuellement dilué avec de l'eau pour donner une concentration d'antigène O située entre 2,5 et 30 µg/ml. Le rendement en LPS a été > 90 % comme il en a été jugé par la récupération du cœur de LPS, mesuré en utilisant du galactose comme il a été décrit ci-dessus. Le LPS a été soumis à une hydrolyse alcaline et les sucres ont été mesurés par une analyse HPAEC-PAD comme il a été rapporté pour le polysaccharide Vi [40] et comparés à l'étalon de référence de l'antigène O.

Quantification du LPS dans les GMMA

La détermination quantitative du sucre galactose central par analyse HPAEC-PAD [21] a été utilisée pour quantifier la quantité de LPS dans les 1790-GMMA en se basant sur deux galactoses par cœur [22]. La quantification détermine le nombre de moles de molécules de LPS. Une série de dilutions d'étalons de galactose est exécutée dans chaque analyse. Les étalons de 1790-GMMA et de galactose sont traités en parallèle avec de l'acide trifluoroacétique 2 M pendant 4 h à 100 °C. Les échantillons sont refroidis à une température située entre 2 et 8 °C, séchés pendant une nuit, redissous dans de l'eau, filtrés et analysés. L'analyse HPAEC-PAD est effectuée sur un instrument Dionex ICS3000 en utilisant une colonne CarboPac PA10 et une colonne de garde PA10. La séparation est

effectuée en utilisant une condition isocratique d'élution avec 18 mM de NaOH. Pour les GMMA de *S. flexneri*, comme procédé général pour la quantification du LPS, la quantification des acides gras 3-hydroxylés présents sous forme d'ester dans une structure lipidique est utilisée. Par l'hydrolyse alcaline de l'échantillon suivie d'une HPLC-RP-QqQ (SRM), la quantification est effectuée en utilisant un étalon d'acide gras 3-OH pour construire la courbe d'étalonnage.

Distribution des tailles de LPS dans les GMMA

Pour des objectifs de criblage, une analyse SDS-PAGE peut être utilisée. Le LPS a été purifié en utilisant le procédé au phénol-eau (voir ci-dessus) avec des modifications. Les GMMA (1 mg/ml) ont été portés à ébullition pendant 3 min, incubés avec 0,5 µg/µl de protéinase K (Sigma Aldrich) à 60 °C pendant une nuit, mélangés dans un rapport de 1/1 (vol/vol) avec du phénol saturé pH 8,0 (Sigma Aldrich), incubés pendant 30 min à 70 °C, et centrifugés pendant 1 h à 10 000 g à température ambiante. La phase supérieure a été récupérée, mélangée dans un rapport de 2/1 (vol/vol) avec de l'éthanol à 100 %, le LPS a été précipité pendant 1 h à -80 °C et transformé en culot par centrifugation à 12 000 g pendant 30 min à température ambiante. Le culot a été séché en utilisant un SpeedVac et dissous dans de l'eau. Le LPS a été soumis à une électrophorèse sur du gel de bis-tris polyacrylamide à 12 % (Life technologies) et coloré en utilisant le kit de coloration à l'argent Silver Quest™ (Life Technologies). Pour une caractérisation plus

précise, l'analyse HPLC-SEC peut être utilisée. Le lipide A et les protéines sont éliminés de l'échantillon à tester par hydrolyse avec de l'acide acétique à 1 % (2 h à 100 °C)/centrifugation à vitesse
5 basse (14 000 rcf pendant 5 min) ; le surnageant séché (ou dessalé) est injecté dans la HPLC en utilisant une colonne TSK-GEL® 3000 PW avec détecteur d'indice de réfraction. La taille moléculaire est déterminée par le logiciel GPC en utilisant des étalons de PM de
10 dextrans. Si l'échantillon est dérivatisé avec du semicarbazide, le pic résultant peut être utilisé pour confirmer la quantité d'AgO.

Analyse MALDI-TOF du lipide A dans les bactéries ou les GMMA

15 Le test d'identité du lipide A par le procédé de désorption et ionisation par laser assistées par matrice à temps de vol (MALDI_TOF) détermine le type de lipide A dans le LPS. Le lipide A a été précipité à partir des GMMA ou des banques de cellules bactériennes
20 comme il a été décrit auparavant [20] en utilisant une hydrolyse par un acide doux avec de l'acide acétique à 1 % pendant 2 h à 100 °C. Les échantillons ont été centrifugés à 14 000 g pendant 15 min, les culots ont été remis en suspension dans de l'eau, et lavés
25 deux fois avec de l'eau. Les culots ont été séchés pendant une nuit en utilisant un Speedvac et remis en suspension dans du chloroforme-méthanol (4/1) et mélangés avec un volume égal de solution Super DHB (Sigma-Aldrich) dans de l'eau/acétonitrile (1/1,
30 vol/vol). Deux µl du mélange ont été chargés sur la plaque cible (plaque cible de conduction en acier BC

MTP 384, Bruker Daltonics) et analysés par un instrument Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) en mode réflectron ions négatifs. Un étalon d'étalonnage de peptides (Bruker Daltonics), mélangé avec de la solution Super DHB, a été inclus dans chaque analyse. Les rapports m/z ont été déterminés par le logiciel Flex Analysis comparativement à l'étalon des peptides. L'espèce de lipide A est identifiée par comparaison de la masse m/z du pic moléculaire à ce qui est attendu pour les échantillons.

Taille des particules des GMMA

La diffusion dynamique de la lumière détermine la distribution des tailles des GMMA en utilisant un Zetasizer Malvern Nano ZS™. La distribution des tailles des particules a été obtenue sous la forme de l'intensité de la lumière diffusée en utilisant la valeur moyenne de Z des trois mesures différentes de la lumière rétrodiffusée à un angle de 173° avec « Protéines » comme réglage de matériau et « Objectif général (résolution normale) ». Le diamètre obtenu par cette technique est une sphère qui présente le même coefficient de diffusion translationnelle que la particule mesurée. On s'attend à ce que la taille soit différente de celle mesurée par microscopie électronique et elle sera une mesure valide de la plage des tailles des particules et de l'homogénéité de la fabrication.

La microscopie électronique à transmission en coloration négative a été également utilisée pour estimer la taille des particules des GMMA. Les GMMA ont été préparés et observés par microscopie électronique

comme il a été décrit auparavant [20]. Les micrographies électroniques ont été enregistrées à un grossissement nominal de 105 000 X. Les diamètres des GMMA ont été mesurés manuellement sur des copies
5 imprimées des micrographies électroniques comparativement à la barre d'échelle. Une autre technique utilisée pour déterminer la taille qui correspond mieux aux données obtenues par microscopie électronique est la HPLC-SEC couplée à la MALLS
10 (diffusion lumière laser multi-angle) en utilisant des colonnes TSKGEL® 6000PW et 4000PW reliées en série.

Identité et quantification de l'antigène O des GMMA formulés avec ALHYDROGEL®

L'identité des GMMA formulés avec ALHYDROGEL® peut
15 être déterminée par des technologies basées sur l'immunologie.

Le test immunologique Direct ALHYDROGEL® Formulation [31] a été employé avec des modifications. L'identité des GMMA est confirmée par la détection de
20 l'antigène O présent dans la formulation en utilisant un typage commercial d'antisérums produits chez des lapins ou un typage d'anticorps monoclonal produit chez des souris. Une aliquote de la suspension de GMMA-ALHYDROGEL® est bloquée avec de la BSA et incubée avec
25 l'anticorps spécifique de l'AgO. La liaison de l'anticorps de typage est ensuite détectée en utilisant un anticorps anti-lapin ou un anticorps anti-souris marqué par une enzyme. La présence de l'antigène O réagissant immunologiquement est détectée par
30 l'addition d'une solution de substrat et la formation d'une couleur qui peut être détectée par l'absorbance.

L'identité est confirmée par comparaison de l'absorbance de l'échantillon à tester à l'absorbance d'une référence incluse dans le même test.

L'identité et la quantification de l'antigène O peuvent être également réalisées par un test ELISA compétitif. Le principe de travail est basé sur la compétition entre l'antigène O ou le LPS spécifique de *Shigella* et les GMMA formulés avec ALHYDROGEL® pour la liaison à un anticorps monoclonal spécifique d'un séro groupe ou à un antisérum polyclonal. Plus de GMMA sont présents dans la suspension, moins d'anticorps monoclonaux ou d'anticorps polyclonaux peuvent se lier à la plaque revêtue de l'antigène, et moins de signal peut être détecté par des procédés ELISA classiques. L'antigène O présent dans la formulation à tester est quantifié comparativement aux signaux obtenus avec une courbe d'étalonnage construite en surchargeant l'anticorps monoclonal avec une quantité connue de GMMA formulés avec ALHYDROGEL®.

20 Tests biologiques

Isolement des CMSP et test MAT

La production *in vitro* d'interleukine 6 (IL-6) par les CMSP à la suite d'une stimulation avec des GMMA a été utilisée comme substitut *in vitro* pour estimer le potentiel réactogène en utilisant la procédure décrite par Rossi et al. [20]. En bref, des couches leucoplaquettaires provenant de différents donneurs ont été utilisées pour isoler les CMSP en utilisant une centrifugation à densité de Ficoll comme il a été rapporté [24]. Les CMSP ont étéensemencées à une densité de 2 x 10⁵ cellules/puits avec 180 µl de RPMI-

1640 complémenté avec 25 mM de HEPES, 2 mM de glutamine, 10 % de FBS, 1 % de pénicilline-streptomycine (InvitroGen) dans des plaques à fond arrondi de 96 puits. 20 µl de dilutions en série au 1/10 de GMMA dans du TBS (0,0001 à 1 000 ng/ml de concentration finale dans le test) ont été ajoutés, les cellules ont été incubées pendant 4 h à 37 °C et les surnageants ont été récupérés après centrifugation (5 min, 400 g) et stockés à -80 °C jusqu'à l'analyse pour la concentration de l'IL-6.

Etudes d'immunogénicité/puissance chez des souris

Huit souris BALB/c ou CD-1 par groupe (femelles, âgées de 4 à 6 semaines) ont reçu une ou deux injections intrapéritonéales de doses différentes de GMMA formulés avec ALHYDROGEL aux jours 0, et 21 dans un volume de 0,5 ml. Les souris témoins ont reçu 0,5 ml de GAHB-Placebo. Des échantillons de sang ont été prélevés aux jours 7, 14, 21, 28, 35 ou dans certaines études, seulement au jour 21. Dans les tests de puissance, des groupes de souris ont été immunisés avec quatre doses différentes du vaccin ou de l'étalon de puissance (GMMA de référence, stocké à -80 °C, et fraîchement formulé sur ALHYDROGEL).

Test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Les anticorps déclenchés contre les GMMA de *S. sonnei* ou de *S. flexneri* sont estimés par un test ELISA en utilisant le LPS de *Shigella sonnei* ou l'antigène O du séro groupe de *S. flexneri* comme antigène de revêtement de la plaque. Des plaques de 96 puits Nunc™ Maxisorp™ ont été revêtues pendant une nuit à une température de 2 à 8 °C avec 0,5 µg/ml de

LPS ou $< 5 \mu\text{g/ml}$ d'AgO dans de la solution tampon phosphate (PBS). Les plaques ont été bloquées pendant 1 h avec du lait à 5 % dans du PBS et ensuite lavées trois fois avec du PBS contenant 0,05 % de TWEEN® 20 (PBST). Les sérums des souris ont été dilués au 1/100 et au 1/4000 dans du PBST avec 0,1 % de BSA, les sérums de lapin ont été dilués dans du lait à 5 % dans du PBS. Les sérums dilués ont été incubés en triple pendant 2 h dans les plaques ELISA. Les échantillons ont été testés en comparaison à des sérums étalons établis auparavant et étalonnés anti-LPS de *S. sonnei* ou anti-antigène O de sérotype de *S. flexneri* inclus dans une série en double de dilutions sur chacune des plaques. Après incubation avec l'échantillon et les sérums de référence, les plaques ont été lavées trois fois comme ci-dessus. L'anticorps lié a été détecté en utilisant une IgG de chèvre anti-souris ou une IgG de chèvre anti-lapin conjuguée à de la phosphatase alcaline, diluée dans du PBST, et ceci suivi de trois étapes de lavage et d'une réaction colorée avec du substrat de phosphate de p-nitrophényle. Après 1 h, l'absorbance (densité optique, DO) a été mesurée à une longueur d'onde de 405 nm et de 490 nm et la $\text{DO}_{405 \text{ nm}-490 \text{ nm}}$ a été calculée. Les résultats sont exprimés en unités ELISA déterminées par rapport au sérum étalon. Une unité ELISA équivaut à l'inverse de la dilution du sérum étalon donnant une $\text{DO}_{405 \text{ nm}-490 \text{ nm}}$ de 1 dans le dosage de l'étalon.

Dosage du pouvoir bactéricide du sérum comme mesure de la fonctionnalité des anticorps

Les bactéries *S. sonnei* et *S. flexneri* ont été cultivées jusqu'à la phase logarithmique (DO : 0,2), diluées au 1/15 000 dans du PBS et distribuées dans des plaques de microtitrage stériles en polystyrène à fond en U de 96 puits. Dans chaque puits, il a été ajouté des échantillons des sérums dilués en série du 1/8 au 1/12 (en démarrant à partir d'une dilution au 1/100 dans le puits). Avant utilisation, les sérums ont été chauffés à 56 °C pendant 30 min pour inactiver le complément endogène. Du complément de lapin bébé actif (BRC, Cederlane CL3441 lot 6288) utilisé à 7 à 20 % de volume final a été ajouté dans chaque puits. La source, le lot et le pourcentage du BRC utilisé dans le mélange réactionnel du test de SBA ont été choisis auparavant pour une faible toxicité contre chaque bactérie spécifique. Pour évaluer des effets inhibiteurs non spécifiques possibles du BRC ou du sérum de souris, les bactéries ont été également incubées avec les mêmes sérums testés plus du BRC inactivé à la chaleur ; les sérums seuls (aucun BRC) ; le tampon du test de SBA et du BRC actif. Après 3 h d'incubation dans le mélange du test de SBA, l'inhibition de la croissance bactérienne a été mesurée. L'activité bactéricide a été mesurée en termes de titres sériques, qui sont définis comme les dilutions de sérums nécessaires pour obtenir 50 % de croissance bactérienne. Des titres sériques égaux à 10 ont été donnés lorsqu'aucune activité bactéricide n'a été détectée.

Pyrogénicité

Nous avons établi une modification du procédé du test de pyrogénicité intraveineux de la Pharmacopée

Européenne (Ph. Eur. 2.6.8 pyrogens, [25]) en utilisant l'administration d'une dose humaine entière administrée par voie intramusculaire. Deux ensembles d'expériences ont été réalisés pour établir le test. Dans la première
5 expérience (dans des conditions non GMP mais dans un établissement GMP), trois groupes de 3 lapins, présélectionnés selon le critère Ph. Eur. 2.6.8 pyrogens, ont été placés dans des boîtes de rétention et les températures corporelles ont été enregistrées en
10 utilisant une sonde rectale et la température initiale a été déterminée. Le lot du vaccin de toxicologie (0,5 ml) a été injecté par voie intramusculaire à chacun des trois lapins dans deux groupes de vaccin et 0,5 ml de sérum physiologique stérile aux trois lapins
15 du groupe témoin. La température a été enregistrée en continu par un système automatisé à partir de 90 min avant l'injection jusqu'à 3 h après l'administration pour déterminer la température initiale et une élévation possible de la température après
20 l'administration. La température a été enregistrée manuellement à 3,5, 4, 5, 5,5, 6, 6,5 et 7 h. Le jour suivant, les lapins ont été à nouveau placés dans la boîte de rétention, laissés s'acclimater et une autre lecture a été prise à 24 h.

25 Sur la base des données (voir Résultats), le test suivant a été choisi pour le test de pyrogénicité intramusculaire pour les 1790GAHB. Deux groupes de trois lapins, (un groupe test pour le vaccin et un groupe témoin), sont choisis selon le critère Ph. Eur.
30 2.6.8, placés dans des boîtes de rétention et la température initiale a été déterminée en utilisant une

sonde rectale. Le vaccin (0,5 ml) est injecté par voie intramusculaire aux lapins dans le groupe du vaccin et 0,5 ml de sérum physiologique stérile aux lapins du groupe témoin. La température est enregistrée en continu par un système automatisé pendant 3 h et des lectures supplémentaires sont prises manuellement à 3,5 et 4 h. L'élévation maximale de la température pour chaque lapin est déterminée (la différence entre la température la plus élevée mesurée durant la période de 4 h après l'administration et la température initiale). Pour que le test soit valide, la moyenne de l'élévation maximale de la température de trois témoins doit être $\leq 0,3$ °C. Le test passe si la moyenne de l'élévation maximale de la température des trois lapins du groupe du test pour le vaccin est $< 0,8$ °C, et échoue si la moyenne de l'élévation maximale de la température est $\geq 1,2$ °C. Le test sera répété si la moyenne de l'élévation maximale de la température des trois lapins est $> 0,8$ mais $< 1,2$ °C. Pour la répétition du test chez 3 lapins supplémentaires, le test passera si la moyenne de l'élévation maximale de la température des trois lapins est $\leq 0,8$ °C et sinon il échouera. La seconde étude a été réalisée dans des conditions GMP dans l'établissement GMP en utilisant les critères ci-dessus pour estimer la pyrogénicité des lots de vaccins de toxicologie et cliniques. L'enregistrement de la température dans l'étude a été étendu sur une période de 24 h pour fournir d'autres données sur la fiabilité du test et le choix de 4 h comme période de temps définitif pour estimer l'élévation de la température.

Le procédé du test de pyrogénicité IM a été utilisé pour libérer trois lots GMP de 1790GAHB de *S. sonnei*.

Etude de la toxicologie de doses répétées

Pour supporter l'administration clinique de
5 jusqu'à trois immunisations du vaccin à base de 1790GAHB de *S. sonnei*, une étude de toxicologie a été conduite avec des lapins New Zealand White en conformité avec les standards des bonnes pratiques de laboratoire (GLP) (WIL Research Europe, Lyon, France).
10 Le vaccin a été administré quatre fois, à deux semaines d'écart par la voie clinique intramusculaire (IM), intranasale (IN), ou intradermique (ID) ceci suivi d'une période d'observation de deux semaines. Les lapins ont été choisis comme modèle animal en se basant
15 sur des études de recherches préliminaires démontrant la capacité de produire une réponse immunitaire. La conception de l'étude est présentée dans le tableau 3. Tous les animaux ont été observés durant l'étude pour la morbidité/mortalité, les observations/examens
20 cliniques, les sites d'injection (test de Draize), l'ophtalmologie, les poids corporels, la consommation d'aliments. La pathologie clinique, y compris les paramètres de coagulation et la protéine C réactive (prétest, au jour 2 et aux deux nécropsies), l'analyse
25 des anticorps (prétest, prédose et aux deux nécropsies), les observations macroscopiques aux nécropsies, les poids des organes, et l'histopathologie (liste complète des tissus de l'OMS) ont tous été effectués dans tous les groupes. Les températures corporelles des groupes 2
30 et 5 (IM) à la première immunisation ont été mesurées à 1,5 h, 0,5 h, et 2 min (0 h) avant l'administration de

la dose et à 0,5, 2, 6, et 24 h après l'injection. La moyenne de la température à -0,5 h et 0 h a été considérée comme la température initiale des lapins. Aux 2ème, 3ème, et 4ème immunisations des groupes 2 et 5 et à toutes les immunisations des groupes 1, 3, 4, 6, et 7, les températures corporelles ont été enregistrées avant (0 h), et 2, 6, et 24 h après l'administration de la dose.

10

Tableau 3

Conception expérimentale de l'étude de toxicologie

Groupe/ Traitement		Voie(s) ^a	Antigène par injection (µg D'AgO/ µg de protéines)	Volume de la dose par injection (µl)	Nombre d'animaux			
					Nécropsiés au jour 44		Nécropsiés au jour 56	
					Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
1b	0,9 % de NaCl	IM IN ^c ID	0	500 400 50	4	4	4	4
2	GAHB- Placebo	IM	0	500	4	4	4	4
3	GAHB- Placebo	IN	0	400	4	4	4	4
4	GAHB- Placebo	ID	0	50	4	4	4	4
5	1790GAHB	IM	6,1 / 100	500	4	4	4	4
6	1790GAHB	IN	4,9 / 80	400	4	4	4	4
7	1790GAHB	ID	0,61 / 10	50	4	4	4	4

Jour d'administration des doses : 0, 14, 28 et 42.

^aIM : intramusculaire ; IN : intranasale ; ID : intradermique.

^bChaque animal dans le groupe 1 (témoin) a reçu le sérum physiologique stérile (0,9 % de NaCl) par les trois voies.

^c4 administrations de 100 µl par narine à 2 h d'écart, c'est-à-dire 400 µl/jour. Les narines ont été alternées entre les vaccinations.

15

Etude d'Irwin chez des rats avec une vaccination
IN

Pour encore supporter l'administration IN des
1790GAHB, un test GLP d'Irwin a été entrepris pour
5 identifier les effets indésirables potentiels des
1790GAHB sur le système nerveux central et périphérique,
jugés par une batterie d'observations
neurocomportementales [26]. Trois groupes de 6 rats Han
Wistar mâles, d'approximativement 0,3 kg, ont été
10 utilisés. Le premier groupe a reçu le témoin de sérum
physiologique, le deuxième le GAHB-Placebo et le
troisième les 1790GAHB. Chaque rat a reçu une seule
dose de 15 µl dans chaque narine (total de 30 µl). Ce
volume administré a été la dose pratique maximale. Le
15 groupe du test a reçu au total 6 µg de protéines de
1790GAHB. Sur la base du poids corporel, la dose de
6 µg de protéines chez un rat de 0,3 kg représente
approximativement 15 fois la dose prévue la plus élevée
qui sera administrée par voie IN à un sujet de 60 kg
20 dans l'essai en Phase 1. Les rats ont été suivis, avant
et à 0,5, 1, 2, 5, et 24 heures après l'administration.

Toutes les études animales se sont conformées à la
directive EU 2010/63 sur la protection des animaux pour
des objectifs scientifiques, et sa mise en œuvre dans
25 les lois locales pertinentes en Italie et en France,
respectivement. Le test GMP de pyrogénicité modifié a
été approuvé par le comité d'éthique de Charles River
France (Numéro d'étude T 13.1446-48, T 13.1678-80, T
13.1702).

30 Résultats

Expression de l'antigène O de la lignée cellulaire NVGH1790 de *S. sonnei*

La souche NVGH1790 a été génétiquement modifiée par l'intégration des gènes *nadA* et *nadB* d'*E. coli* dans
5 le plasmide de virulence pour éliminer l'auxotrophie à l'acide nicotinique de *Shigella* [18]. Ainsi, la rétention du plasmide de virulence et par conséquent la production de l'AgO codé par le plasmide [27] est assurée par une croissance dans un milieu sans acide
10 nicotinique. L'analyse FACS de *S. sonnei* NVGH1790 après 25 générations dans des flacons et après une fermentation de 30 l a montré que > 95 % des bactéries étaient positives pour l'AgO montrant ainsi la rétention de ce plasmide.

15 Production à l'échelle pilote et caractérisation des 1790-GMMA

Trois séries d'uniformité de 30 l ont été effectuées. Pour chaque lot, le procédé de fermentation optimisé à 30 l a été stoppé lorsque la DO600 a été
20 d'approximativement 35, en 20 ± 4 heures à partir de l'inoculation du bioréacteur, lorsqu'une surcharge de pO_2 dissous est survenue et que le pH a commencé à augmenter. Au terme de la fermentation, la culture a été récoltée par microfiltration. Ensuite, les GMMA ont
25 été purifiés par ultrafiltration. Le procédé a été transféré à un organisme de fabrication sous contrat externe pour la production de deux lots GMP de 1790-GMMA. Le lot GMP a été produit à une échelle de 25 l. Les données sont présentées pour l'un des lots
30 d'uniformité produits au NVGH, le lot de 1790-GMMA NVGH1883 (lot de référence), et pour les

deux substances médicamenteuses GMP, lot 1112 et lot 1014 de 1790-GMMA.

Rendement et caractérisation des GMMA

Taille et intégrité

5 Par microscopie électronique, les GMMA purifiés provenant des références et des lots GMP ont présenté des particules avec une distribution bimodale des tailles. La majorité des particules sont petites avec une taille moyenne d'approximativement 25 à 40 nm de
10 diamètre. Une fraction mineure des particules était plus grande avec des tailles situées entre 65 et 140 nm (16 % des particules).

L'analyse dimensionnelle par diffusion dynamique de la lumière (DDL) en utilisant un Zetasizer Malvern
15 Nano a donné une valeur Z moyenne de 117 nm, 113 nm et 116 nm pour la référence et les deux lots GMP, respectivement. Des résultats pour l'indice de polydispersité de 0,19, 0,21 et 0,20 ont été obtenus pour la référence et les deux lots GMP, respectivement.
20 De façon importante, les résultats de DDL ont été inchangés par des cycles multiples de congélation/décongélation ou un stockage à -80 °C indiquant que les GMMA sont demeurés intacts et ne se sont pas agrégés dans ces conditions. Ainsi, les 1790-GMMA ont été
25 stockés en routine à -80 °C avant la formulation.

Rendement

La référence et les deux lots GMP ont donné un rendement final de 2,4 g de protéines (à partir de 30 l), de 1,7 g de protéines (à partir de 25 l) et de
30 0,42 g de protéines (à partir de 25 l) dans les GMMA purifiés, respectivement. Ces lots contenaient 145 mg,

106 mg et 25 mg d'AgO, respectivement, avec des rapports d'AgO sur protéines presque identiques (60,3 µg/mg, 63,6 µg/mg et 59,0 µg/mg). Les deux autres lots d'uniformité (à partir de 30 l) ont été
5 similaires : rendement, 2,0 g et 3,2 g ; rapport d'AgO sur protéines, 61,6 µg/mg et 50,3 µg/mg, respectivement.

Profil des protéines

Le profil de SDS-PAGE des protéines des 1790-GMMA a été similaire à celui observé dans des études
10 précédentes [22,36]. Les bandes dominantes à une taille d'approximativement 39 kDa ont été identifiées comme l'OmpA et l'OmpC par une analyse de spectrométrie de masse.

Profil du LPS et de l'antigène O

15 La SDS-PAGE colorée à l'argent du LPS extrait de la référence et des lots GMP a montré une échelle de LPS avec une distribution bimodale (données non présentées). Les bandes prédominantes étaient du LPS de poids moléculaire bas avec jusqu'à 5 répétitions d'AgO ;
20 du LPS de poids moléculaire moyen a été visible sous la forme d'une fraction mineure. Ces données étaient cohérentes avec la chromatographie d'exclusion analytique de l'AgO/cœur extrait en utilisant la détection de l'indice de réfraction (données non
25 présentées). Le pic dominant était le polysaccharide de poids moléculaire bas. Cette distribution des tailles du LPS principalement de poids moléculaire bas dans les 1790-GMMA est de façon marquée différente de la taille dans le LPS de référence dérivé de la souche parente
30 sans la modification du LPS (1859-GMMA) qui présente une moyenne de 33 répétitions mesurée par RMN.

La composition du core du LPS a été déterminée par une analyse HPAEC-PAD. Ce procédé a démontré que le rapport molaire du galactose sur le glucose dans le LPS présent dans les 1790-GMMA est de 2/4, tandis que dans
5 les GMMA provenant de la souche parente sans la modification du LPS (1859-GMMA), le rapport était de 2/3 et similaire aux souches de type sauvage de *S. sonnei* [22]. Le changement de teneur en glucose dans le cœur de LPS des 1790-GMMA a été confirmé par une
10 analyse d'un troisième sucre du cœur de LPS, le KDO terminal. Dans les 1790-GMMA et les 1859-GMMA, le rapport du galactose sur le KDO a été identique. Le rapport du glucose sur le KDO a différé confirmant une teneur supérieure en glucose dans le cœur de LPS des
15 1790-GMMA.

Structure du lipide A

La structure du lipide A purifié à partir du lot de référence a été déterminée par spectroscopie de masse en utilisant MALDI-TOF (données non présentées).
20 Les spectres enregistrés ont montré un lipide A penta-acylé correspondant au pic le plus élevé et à plusieurs autres pics dus à sa fragmentation (c'est-à-dire, la perte d'une ou de plusieurs chaînes d'acides gras), à la formation d'agrégats avec le sodium (+23 m/z) et à
25 la déphosphorylation (-80 m/z). Il n'a été détecté aucun lipide A hexa- ou hepta-acylé par MALDI-TOF.

Production d'IL-6 dans le test MAT

Les 1859-GMMA contenant un LPS non modifié ont induit des taux élevés de libération d'IL-6 à partir
30 des CMSP, provoquant une augmentation de 10 fois de la libération d'IL-6 par rapport au bruit de fond à une

concentration de 0,004 ng de protéines/ml, tandis que les 1790-GMMA, contenant un LPS penta-acylé, ont nécessité une concentration 600x supérieure (2,37 ng de protéines/ml) pour provoquer la même libération d'IL-6.

5 Test de pyrogénicité intramusculaire

Les augmentations moyennes de la température observées aux différents intervalles jusqu'à 7 h, et à 24 h après la vaccination chez les 12 lapins recevant les vaccins à base de GMMA (6 dans la première étude recevant le lot de toxicologie, 3 dans la seconde étude recevant le lot de toxicologie et 3 recevant le lot clinique) sont représentées sur la figure 1 comparativement à l'augmentation moyenne de la température des 6 animaux recevant le sérum physiologique. L'augmentation moyenne de la température dans le groupe du vaccin a encore augmenté au point final normal de 3 heures pour un test de pyrogénicité intraveineux. Après 5 h, l'augmentation moyenne de la température chez les animaux témoins a montré une augmentation significative et la différence entre les groupes du vaccin et témoin a diminué. A 24 h, les groupes du vaccin et témoin n'étaient pas significativement différents (le groupe du vaccin a présenté une augmentation moyenne de la température inférieure). En se basant sur ces résultats, 4 h a été choisi comme point de temps définitif. En utilisant les critères développés comme il a été détaillé ci-dessus, le groupe de la toxicologie et les deux groupes des vaccins cliniques ont passé le test de pyrogénicité sans nécessiter de répétition du test. « L'augmentation moyenne de la température maximale » sur les

4 premières heures après l'administration du lot de toxicologie et des deux lots cliniques ont été, respectivement, de 0,48 °C, 0,53 °C et 0,40 °C. Pour les groupes témoins, la valeur a été de 0,27 °C.

5 Etude de toxicologie

Il n'y a eu aucune mortalité, aucun signe clinique associé au traitement et aucun changement de poids corporel ou de consommation d'aliments chez les lapins traités avec le vaccin 1790GAHB ou le GAHB-Placebo. Il
10 n'y a eu aucune observation ophtalmologique associée au traitement. Aucun changement de poids d'organe considéré comme étant associé à l'administration soit du vaccin soit du placebo n'a été noté au jour 44 ou au jour 56 (c'est-à-dire, 2 ou 14 jours après la
15 vaccination finale). Le vaccin a été localement bien toléré par les voies intranasale et intramusculaire sans aucune réaction locale observée par la voie IN et des réactions locales très légères (érythème, œdème) jusqu'à modérées (œdème) observées chez certains des
20 lapins après l'administration IM. L'administration ID a induit des réactions locales très légères à modérées (induration, érythème et œdème) qui n'ont pas été plus prononcées dans le groupe des 1790GAHB que dans le groupe du GAHB-Placebo correspondant. La réactogénicité
25 locale s'est complètement ou partiellement résolue dès la fin de la phase de récupération de deux semaines au niveau des sites d'injection IM mais pas au niveau du site d'injection ID. Toutefois, la tolérance au vaccin par l'administration ID est demeurée acceptable. Des
30 changements inflammatoires de faible gravité et amplitude y compris dans les ganglions lymphatiques

drainants et la rate ont été notés lors de l'examen histopathologique ; ces changements se corrélaient avec les augmentations de la protéine C réactive et du fibrinogène et étaient cohérents avec cette réponse pharmacologique à un immunogène. Les changements des paramètres de pathologie clinique et les changements microscopiques minimes à modérés se sont généralement résolus dès la fin de la période de récupération dans les groupes traités par voie IN et ID alors que ceux observés dans le groupe traité par voie IM ont légèrement diminué, indiquant qu'une récupération depuis des changements inflammatoires était en cours.

Il y a eu une augmentation statistiquement significative de la température chez les lapins recevant les 1790GAHB par IM comparativement aux groupes du placebo par IM. Ceci n'a été observé que pour les groupes IM et principalement chez les mâles. Après la première vaccination IM, il y a eu une augmentation moyenne de la température de 0,43 °C pour les 1790GABH contre 0,12 °C pour le placebo ($p = 0,009$, test t) à 2 heures et de 0,64 °C pour les 1790GAHB contre 0,38 °C pour le placebo ($p = 0,005$, test t) à 6 h comparativement à la pré-vaccination. A 24 h après l'injection, il n'y a eu aucune différence dans ces groupes (augmentations de 0,21 et 0,22 °C comparativement aux températures initiales avant la vaccination, respectivement). Des augmentations similaires de la température ont été observées dans les groupes IM à la suite des 3ème et 4ème injections (augmentations de la température de 0,44 contre 0,11 °C et de 0,63 contre 0,33 °C à 6 h comparativement à la

pré-vaccination pour les 1790GAHB contre le placebo). Une augmentation plus petite mais statistiquement non significative a été observée à la suite de la deuxième immunisation (0,28 contre 0,14 °C à 6 h comparativement à la pré-vaccination). Alors que les différences ont été considérées comme étant associées aux 1790GAHB, au vu de la très faible amplitude de la variation et de la courte période des augmentations, l'effet n'a pas été

10 Etude d'Irwin

L'étude d'Irwin chez des rats pour estimer les effets neurotoxiques de la vaccination IN à la suite d'une seule administration de 1790GAHB n'a montré aucun effet pertinent sur une batterie de paramètres comportementaux et physiologiques couvrant les fonctions principales du système nerveux central et périphérique.

Immunogénicité et puissance chez les souris

L'étude d'immunogénicité initiale a évalué 7 doses différentes de 1790GAHB augmentant de 4 fois de 29 ng à 238 µg de protéines (1,75 ng à 14,35 µg d'AgO) par voie intrapéritonéale et a montré que le vaccin a été hautement immunogène. L'anticorps a été détectable à toutes les doses après une seule injection et a été réactivé à la suite d'une seconde injection. 1,86 µg de protéines (0,11 µg d'AgO) a déclenché la réponse maximale en anticorps. En se basant sur ces résultats, il a été développé un protocole d'immunogénicité pour former la base de tests de puissance et pour estimer la stabilité dans le temps, jugée par la puissance. La conception finale de l'étude de puissance a utilisé

quatre doses augmentant de 4 fois de 1790GAHB de 29 ng à 1,86 µg de protéines dans des groupes de 8 souris avec des taux sériques d'IgG estimés par un test ELISA sur le LPS avec l'AgO homologue trois semaines après
5 une seule immunisation. Une préparation de 1790GAHB de référence a été fraîchement formulée pour chaque étude de puissance, et administrée aux mêmes doses que le vaccin à tester. Les courbes dose-réponse des taux d'anticorps déclenchés par le vaccin à tester et
10 l'étalon de référence ont été comparées. Il n'y a pas eu de différences significatives de la pente ou de l'intersection à l'origine de la régression linéaire des anticorps anti-LPS transformés en log sur la dose en log montrant que le lot de stabilité du vaccin avait
15 la même puissance que le matériau de référence fraîchement formulé.

Immunogénicité chez des lapins

La réponse en IgG chez les lapins d'après les études de toxicologie a été estimée à la suite de
20 chaque vaccination et au prélèvement de sang final. Les trois voies ont donné des taux élevés d'IgG anti-LPS circulantes (données non présentées). La réponse maximale a été obtenue 14 jours à la suite d'une seule injection IM d'une dose de 100 µg de 1790GAHB. Pour la
25 voix IN, la réponse en anticorps maximale a nécessité deux immunisations. Les taux d'IgG anti-LPS circulantes 14 jours après la vaccination finale n'ont pas été significativement différents du taux obtenu avec l'administration par voie IM de la dose de 100 µg de
30 1790GAHB. La vaccination avec 10 µg par voie ID a également donné une augmentation de la réponse avec les

vaccinations subséquentes (test des rangs de Spearman $p < 0,0001$) mais l'effet a été moins prononcé qu'avec la voie IN. Les taux finaux d'IgG anti-LPS circulantes ont été significativement supérieurs par la voie ID comparativement à la voie IM (test t des anticorps transformés en log $p = 0,002$).

Essai clinique en phase I avec *S. sonnei* 1790GAHB

Cet essai clinique a été effectué pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité de 3 doses d'un vaccin candidat contre *Shigella sonnei* (vaccin 1790GAHB) lorsqu'il est administré à des dosages différents chez des adultes en bonne santé (âgés de 18 à 45 ans à l'enrôlement). Le profil d'innocuité du vaccin 1790GAHB est évalué comparativement à celui du placebo (GAHB-Placebo), constitué d'une suspension d'hydroxyde d'aluminium ayant la même concentration que les formulations vaccinales de l'étude. Les sujets ont été randomisés pour recevoir trois vaccinations, à quatre semaines d'écart, soit du vaccin 1790GAHB (à cinq concentrations de l'antigène) soit du placebo GAHB.

Souche productrice

Shigella sonnei contenant les modifications génétiques suivantes : $\Delta tolR$: rompt la liaison entre la membrane interne et externe pour donner une grande quantité de blebs de la membrane externe (GMMA) ; $\Delta htrB$: pour réduire la réactogène cité du LPS ; *virG nadA/B* knock-in (activation) : stabilise le plasmide de virulence codant pour l'antigène O (AgO).

Quantité maximale par dose de 0,5 ml (i.m.)

100 µg de protéines de GMMA

6,1 µg d'AgO

0,35 mg d'aluminium comme ALHYDROGEL®

Dans du sérum physiologique isotonique tamponné
par du Tris

Placebo par dose de 0,5 ml (i.m.)

5 0,35 mg d'aluminium comme ALHYDROGEL®

Dans du sérum physiologique isotonique tamponné
par du Tris

Doses inférieures pour l'administration préparées
en diluant la dose maximale dans le placebo

10 Volume d'injection : i.m. : 0,5 ml

Cohorte	Voie	Dose (AgO/ Protéines)	1790GAHB Nb de sujets	Placebo Nb de sujets	Estimation immunologique
A	IM	0,061/1 µg	8	2	IgG sériques
B	IM	0,31/5 µg	8	2	
C	IM	1,4/25 µg	8	2	
D	IM	3,0/50 µg	8	2	
E	IM	6,1/100 µg	8	2	

Toutes les doses de 1790GAHB ont été bien tolérées et les données d'innocuité supportent
15 l'utilisation de ≤ 100 µg de protéines de 1790GAHB lors
d'une administration par la voie IM. L'estimation
sérologique indique que des taux sériques suffisants
d'IgG anti-LPS de *S. sonnei* sont déclenchés un mois
après la première, la deuxième et la troisième
20 vaccination chez les sujets recevant 25 µg, 50 µg et
100 µg de 1790GAHB (figure 2(a) et (b)). Le taux médian
des anticorps dans ces groupes est supérieur à celui
observé dans le sérum des convalescents. Ces données
supportent l'utilisation des 1790GAHB en tant que
25 vaccin à base de GMMA pour *S. sonnei* et d'une
combinaison de quatre à six GMMA différents dans une

formulation multivalente, en supposant des profils de réactogénicité-immunogénicité similaires aux 1790GAHB.

Estimation de l'immunogénicité du vaccin multivalent contre *Shigella* (I) chez des souris

5 Dans cette étude, un vaccin multivalent à base de GMMA de *Shigella* a été testé, spécifiquement une formulation de ALHYDROGEL® contenant des GMMA provenant des 4 sérotypes les plus prévalents de l'étude GEMS, *S. sonnei*, et *S. flexneri* 2a, 3a, et 6.

10 Pour cet objectif, la production de GMMA par des souches de *S. flexneri* a été amplifiée par la délétion de *tolR* comme dans *S. sonnei* et la réactogénicité du LPS a été réduite par modification génétique du lipide A par l'intermédiaire de la délétion du gène
15 *htrB*. Une formulation de ALHYDROGEL® a été choisie pour la formulation tétravalente et les formulations simples de GMMA en se basant sur l'expérience avec les 1790GAHB chez des lapins que l'adsorption sur l'hydroxyde d'aluminium amplifie la tolérance. Cette étude a été la
20 première étude d'immunogénicité pour les sérotypes de *S. flexneri*. Les formulations ont été préparées en se basant sur la teneur en protéines comme il a été utilisé pour les 1790GAHB. En se basant sur la caractérisation biochimique, les GMMA de *S. flexneri* 2a
25 contiennent approximativement 10 fois plus d'AgO par mg de protéines que les 1790-GMMA. Ainsi, une concentration de départ 10 fois inférieure à celle dans l'étude de puissance des 1790GAHB réguliers (29 ng, voir ci-dessus) a été choisie. Des doses similaires ont
30 été établies pour les GMMA de *S. flexneri* 3a et les GMMA de *S. flexneri* 6. La réponse à l'AgO avec une

seule formulation de GMMA (*S. sonnei* ou *S. flexneri* 2a, 3a ou 6) a été comparée à la réponse au même AgO déclenchée par la formule tétravalente. La forte immunogénicité de tous les composants compris dans la formulation tétravalente fournira la preuve du concept d'immunogénicité pour une formulation multivalente et supportera un autre développement d'une formulation multivalente d'AgO-GMMA.

Dans la formule tétravalente, chacun des composants est présent à la même concentration que dans les formulations simples décrites auparavant. Ainsi, la teneur en protéines totales de la formulation tétravalente est de 160 µg/ml. Pour la formulation tétravalente, les GMMA de *S. sonnei*, les GMMA de *S. flexneri* 2a, les GMMA de *S. flexneri* 3a et les GMMA de *S. flexneri* 6 sont mélangés à la même concentration puis formulés avec de l'hydroxyde d'aluminium comme il a été spécifié ci-dessus. Le placebo diluant GAHB ALHYDROGEL® contenait : ALHYDROGEL® dans du sérum physiologique tamponné par du Tris aux mêmes concentrations que dans les 1790GAHB (ALHYDROGEL® 0,7 mg de Al³⁺/ml, 10 mM de Tris, pH 7,4, 9 g/l de chlorure de sodium).

Immunisation

Des souris BALB/c (8 par groupe) ont été immunisées par voie intrapéritonéale au jour 0 avec 4 doses différentes des formulations, comme il est décrit dans le tableau ci-dessous. Un groupe a été immunisé avec le diluant ALHYDROGEL® (GAHB-Placebo) en tant que témoin. Toutes les formulations ont été testées pour une contamination bactérienne avant

l'immunisation. En bref, 50 µl de chaque formulation ont été déposés sur des plaques de gélose LB en triple et après 24 h d'incubation à 37 °C, les plaques ont été examinées pour la croissance. Seules les formulations
 5 sans aucune croissance bactérienne ont été utilisées pour l'immunisation.

No. du groupe	No. des souris	Nom de l'antigène	Dosage de l'antigène (en protéines)	Adjuvant (0,35 mg de Al ³⁺ par dose)	VPA	Voie
1	1-8	<i>S. sonnei</i> (1790GAHB)	2 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
2	9-16	<i>S. flexneri</i> 2a	2 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
3	17-24	<i>S. flexneri</i> 3a	2 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
4	25-32	<i>S. flexneri</i> 6	2 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
5	33-40	Combinaison tétravalente	8 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
6	41-48	<i>S. sonnei</i> (1790GAHB)	20 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
7	49-56	<i>S. flexneri</i> 2a	20 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
8	57-64	<i>S. flexneri</i> 3a	20 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
9	65-72	<i>S. flexneri</i> 6	20 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
10	73-80	Combinaison tétravalente	80 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
11	81-88	<i>S. sonnei</i> (1790GAHB)	200 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
12	89-96	<i>S. flexneri</i> 2a	200 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
13	97-104	<i>S. flexneri</i> 3a	200 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
14	105-112	<i>S. flexneri</i> 6	200 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
15	113-120	Combinaison tétravalente	800 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
16	121-128	<i>S. sonnei</i> (1790GAHB)	2000 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
17	129-136	<i>S. flexneri</i> 2a	2000 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
18	137-144	<i>S. flexneri</i> 3a	2000 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
19	145-152	<i>S. flexneri</i> 6	2000 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
20	153-160	Combinaison tétravalente	8000 ng	Alhydrogel	500 µl	IP
21	161-168	GAHB-Placebo	-	Alhydrogel	500 µl	IP

Prélèvement de sang pour la sérologie : du sang a
 10 été obtenu au jour 21 de tous les animaux, les sérums

ont été recueillis et les sérums ont été stockés à une température de 2 à 8 °C jusqu'au test.

Test ELISA

Des tests ELISA ont été effectués pour déterminer les taux d'anticorps anti-LPS de *S. sonnei*, anti-AgO de *S. flexneri* 2a, anti-AgO de *S. flexneri* 3a, anti-AgO de *S. flexneri* 6 de souris immunisées respectivement avec des GMMA formulés avec ALHYDROGEL® provenant de *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a et *S. flexneri* 6 administrés seuls ou faisant partie d'un vaccin tétravalent. Les résultats pour *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a et *S. flexneri* 3a sont présentés sur les figures 3 et 4.

Les souris immunisées avec des concentrations croissantes de 1790GAHB ont développé des anticorps spécifiques anti-LPS de *S. sonnei* (mesurés en unités ELISA) qui ont donné un rang de Spearman significatif avec $P < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) et un coefficient de corrélation de 0,86, les souris immunisées avec des concentrations croissantes de la formulation tétravalente ont développé des anticorps spécifiques anti-LPS de *S. sonnei* (mesurés en unités ELISA) avec un rang de Spearman significatif avec $P < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) et un coefficient de corrélation de 0,86.

Les souris immunisées avec des concentrations croissantes de *S. flexneri* 3a ont développé des anticorps spécifiques anti-AgO de *S. flexneri* 3a avec un rang de Spearman significatif avec $P < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) et un coefficient de corrélation de 0,84. De façon similaire, les souris immunisées avec des concentrations croissantes de la formulation

tétravalente ont développé des anticorps spécifiques anti-AgO de *S. flexneri* 3a OAg avec un rang de Spearman significatif avec $P < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) et un coefficient de corrélation de 0,73. La DO ELISA des anticorps anti-AgO de *S. flexneri* 2a obtenue avec les sérums de souris immunisées avec des concentrations croissantes de *S. flexneri* 2a a donné un rang de Spearman significatif avec $P < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) et un coefficient de corrélation de 0,75. En outre, les souris immunisées avec des concentrations croissantes de la formulation tétravalente ont développé des anticorps anti-AgO de *S. flexneri* 2a qui ont présenté un rang de Spearman significatif avec $P < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) et un coefficient de corrélation de 0,75. Les résultats des comparaisons des courbes dose-réponse respectives sont présentés sur la figure 4. Il n'a été observé aucune différence significative entre elles pour n'importe quelle réponse spécifique d'un sérovar entre la formulation simple de GMMA et la formulation tétravalente indiquant qu'il n'y a eu aucune interférence.

Analyse FACS

Les antisérums produits contre la formulation tétravalente de GMMA ont reconnu les *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a et *S. flexneri* 6 de type sauvage. Tandis que les antisérums produits contre les GMMA individuels ont reconnu la souche bactérienne homologue.

Conclusions

La réponse en anticorps sériques contre le sérovar spécifique de *Shigella* déclenchée par la formulation

tétravalente de *Shigella* n'a pas été différente des composants individuels. Ainsi, il n'existe aucune preuve d'interférence.

Vaccin multivalent contre *Shigella* (II)

5 Un vaccin multivalent à base de GMMA de *Shigella* est exemplifié, spécifiquement une formulation de ALHYDROGEL® contenant des GMMA provenant de *S. sonnei*, et *S. flexneri* 1b, 2a, 3a, et 6.

10 La production de GMMA par les souches de *S. flexneri* est amplifiée par la délétion de *tolR* comme dans *S. sonnei* et la réactogénicité du LPS est réduite par modification génétique du lipide A par l'intermédiaire de la délétion du gène soit *msbB* soit *htrB*. Comme précédemment, une formulation de
15 ALHYDROGEL® est choisie pour la formulation pentavalente et les formulations simples de GMMA en se basant sur l'expérience avec les 1790GAHB chez des lapins que l'adsorption sur de l'hydroxyde d'aluminium amplifie la tolérance.

20 Dans la formulation pentavalente, chacun des composants est présent à la même concentration que dans les formulations simples décrites au préalable. Pour la formulation pentavalente, les GMMA de *S. sonnei*, les GMMA de *S. flexneri* 1b, les GMMA de *S. flexneri* 2a, les
25 GMMA de *S. flexneri* 3a et les GMMA de *S. flexneri* 6 sont mélangés aux mêmes concentrations puis formulés avec de l'hydroxyde d'aluminium comme il a été spécifié ci-dessus.

Vaccin multivalent contre *Shigella* (III)

30 Un vaccin multivalent à base de GMMA de *Shigella* est exemplifié, spécifiquement une formulation de

ALHYDROGEL® contenant des GMMA provenant de *S. sonnei*,
et *S. flexneri* 1b, 2a, 2b, 3a, et 6.

La production de GMMA par les souches de
S. flexneri est amplifiée par la délétion de *tolR* comme
5 dans *S. sonnei* et la réactogénicité du LPS est réduite
par modification génétique du lipide A par
l'intermédiaire de la délétion du gène soit *msbB* soit
htrB. Comme précédemment, une formulation de
ALHYDROGEL® est choisie pour la formulation hexavalente
10 et les formulations simples de GMMA en se basant sur
l'expérience avec les 1790GAHB chez des lapins que
l'adsorption sur de l'hydroxyde d'aluminium amplifie la
tolérance.

Dans la formulation hexavalente, chacun des
15 composants est présent à la même concentration de
protéines ou d'AgO que dans les formulations simples
décrites au préalable. Pour la formulation hexavalente,
les GMMA de *S. sonnei*, les GMMA de *S. flexneri* 1b, les
GMMA de *S. flexneri* 2a, les GMMA de *S. flexneri* 2b, les
20 GMMA de *S. flexneri* 3a et les GMMA de *S. flexneri* 6
sont mélangés aux mêmes concentrations puis formulés
avec de l'hydroxyde d'aluminium comme il a été spécifié
ci-dessus.

Combinaisons spécifiques

25 A) Une composition immunogène comprenant (a) des
GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella sonnei*
53G $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, *virG::nadAB*, (b) des GMMA purifiés à
partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 2a 2457T $\Delta tolR$,
 $\Delta msbB1$, (c) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de
30 *Shigella flexneri* 3a 6885 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (d) des GMMA
purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 6

10.8537 $\Delta tolR$, $\Delta htrB$ $\Delta msbB1$ et (e) un adjuvant d'aluminium, dans laquelle les GMMA comprennent un lipide A modifié et dans laquelle les souches de *Shigella flexneri* sont dépourvues du plasmide de virulence.

B) Une composition immunogène comprenant (a) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella sonnei* 53G $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, $virG::nadAB$, (b) des GMMA purifiés à partir de *Shigella flexneri* 2a 2457T $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$,
10 (c) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 3a 6885 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (d) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 6 10.8537 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (e) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 1b STANSFIELD $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$ et (f) un
15 adjuvant d'aluminium, dans laquelle les GMMA comprennent un lipide A et dans laquelle les souches de *Shigella flexneri* sont dépourvues du plasmide de virulence.

C) Une composition immunogène comprenant (a) des
20 GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella sonnei* 53G $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, $virG::nadAB$, (b) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 2a 2457T $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (c) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 3a 6885 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (d) des GMMA
25 purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 6 10.8537 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (e) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 2b 69/50 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$ et (f) un adjuvant d'aluminium, dans laquelle les GMMA comprennent un lipide A et dans laquelle les souches de
30 *Shigella flexneri* sont dépourvues du plasmide de virulence.

D) Une composition immunogène comprenant (a) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella sonnei* 53G $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, $virG::nadAB$, (b) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 2a 2457T $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (c) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 3a 6885 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (d) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 6 10.8537 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (e) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 1b STANSFIELD $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$, (f) des GMMA purifiés à partir d'un mutant de *Shigella flexneri* 2b 69/50 $\Delta tolR$, $\Delta msbB1$ et (g) un adjuvant d'aluminium, dans laquelle les GMMA comprennent un lipide A et dans laquelle les souches de *Shigella flexneri* sont dépourvues du plasmide de virulence.

E) La composition immunogène de (A), (B), (C) ou (D) dans laquelle l'adjuvant est l'hydroxyde d'aluminium, par exemple, ALHYDROGEL®.

F) La composition immunogène de l'une quelconque de (A), (B), (C), (D) ou (E) qui comprend au moins un ou plusieurs supports et/ou excipients pharmaceutiques.

G) La composition immunogène de F qui est une composition pharmaceutique ou vaccinale.

H) La composition pharmaceutique ou vaccinale de G pour une utilisation dans la prévention ou le traitement d'une infection par *Shigella* chez un animal, particulièrement un être humain.

Alors que certains modes de réalisation de la présente invention ont été décrits et exemplifiés spécifiquement ci-dessus, il n'est pas prévu que l'invention soit limitée à de tels modes de réalisation.

Diverses modifications peuvent y être apportées sans s'écarter de l'étendue et de l'esprit de la présente invention telle que présentée dans les revendications suivantes.

Références

1. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380: 2197-2223.
5
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380: 2095-2128.
10
3. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013;382: 209-222.
15
4. Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, Marohn ME, et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clin Infect Dis*. 2014;59: 933-941.
20
5. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, Sztein MB. Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5: 540-553.
25
6. Chang Z, Lu S, Chen L, Jin Q, Yang J. Causative species and serotypes of shigellosis in mainland China: systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7: e52515.
30

7. Vinh H, Nhu NTK, Nga TVT, Duy PT, Campbell JI, Hoang NVM, et al. A changing picture of shigellosis in southern Vietnam: shifting species dominance, antimicrobial susceptibility and clinical presentation. BMC Infect Dis. 2009;9: 204.
8. Kweon, 2008 Curr Opin Infect Dis. 21(3):313-8.
9. Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, Gdalevich M, Robin G, Slepon R, et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. Lancet. 1997;349: 155-159.
10. Passwell JH, Ashkenzi S, Banet-Levi Y, Ramon-Saraf R, Farzam N, Lerner-Geva L, et al. Age-related efficacy of *Shigella* O-specific polysaccharide conjugates in 1-4-year-old Israeli children. Vaccine. 2010;28: 2231-2235.
11. Susanna Esposito, Roman Prymula, Gian Vincenzo Zuccotti, Fang Xie, Michelangelo Barone, Peter M Dull, Daniela Toneatto, A phase II randomized controlled trial of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine, 4CMenB, in infants (II). Human Vaccines & Immunotherapeutics Vol. 10, Iss. 7, 2014.
12. Erlandson and Mackey (1958) J Bacteriol 75(3): 253-7.
13. US 5 681 736.
14. Uyttendaele et al. (2001) International journal of food microbiology 70(3):255-65.
15. Formal SB, Kent TH, May HC, Palmer A, Falkow S, LaBrec EH. Protection of monkeys against experimental shigellosis with a living attenuated oral polyvalent dysentery vaccine. J Bacteriol. 1966;92: 17-22.

16. Makino S, Sasakawa C, Kamata K, Kurata T, Yoshikawa M. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *S. flexneri* 2a. *Cell*. 1986;46: 551-555.
- 5 17. Berlanda Scorza F, Colucci AM, Maggiore L, Sanzone S, Rossi O, Ferlenghi I, et al. High yield production process for *Shigella* outer membrane particles. *PLoS One*. 2012;7: e35616.
- 10 18. Prunier A-L, Schuch R, Fernandez RE, Mumy KL, Kohler H, McCormick BA, et al. *nadA* and *nadB* of *Shigella flexneri* 5a are antivirulence loci responsible for the synthesis of quinolinate, a small molecule inhibitor of *Shigella* pathogenicity. *Microbiology*. 2007;153: 23632372.
- 15 19. Clementz T, Bednarski JJ, Raetz CR. Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherchia coli* in the acylation of lipid A. *J Biol Chem*. 1996;271: 12095-12102.
- 20 20. Rossi O, Pesce I, Giannelli C, Aprea S, Caboni M, Citiulo F, et al. Modulation of Endotoxicity of *Shigella* Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA) by Genetic Lipid A Modifications: Relative Activation of TLR4 and TLR2 Pathways in Different Mutants. *J Biol Chem*. 2014;289: 24922-24935.
- 25 21. Micoli F, Rondini S, Gavini M, Pisoni I, Lanzilao L, Colucci AM, et al. A scalable method for O-antigen purification applied to various *Salmonella* serovars. *Anal Biochem*. 2013;434: 136-145.
- 30 22. Robbins JB, Kubler-Kielb J, Vinogradov E, Mocca C, Pozsgay V, Shiloach J, et al. Synthesis, characterization, and immunogenicity in mice of

Shigella sonnei O-specific oligosaccharide-core-protein conjugates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106: 7974-7978.

23. Westphal O, Jann K. Bacterial
5 lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure. 1965;5: 83-91.

24. Stoddard MB, Pinto V, Keiser PB, Zollinger W. Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B
10 *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants. Clin Vaccine Immunol. 2010;17: 98-107.

25. Pyrogens. In: European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasbourg, Cedex: Directorate for the Quality of
15 Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM). 2013. chapter 2.6.8.

26. Moscardo E, Maurin A, Dorigatti R, Champeroux P, Richard S. An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodents. J Pharmacol
20 Toxicol Methods. 2007;56: 239-255.

27. Jiang Y, Yang F, Zhang X, Yang J, Chen L, Yan Y, et al. The complete sequence and analysis of the large virulence plasmid pSS of *Shigella sonnei*. Plasmid. 2005;54: 149-159.

25 28. Rossi O, Maggiore L, Necchi F, Koeberling O, MacLennan CA, Saul A, et al. Comparison of Colorimetric Assays with Quantitative Amino Acid Analysis for Protein Quantification of Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA). Mol Biotechnol. 2014;in press.

30 29. [A]. Maggiore L, Yu L, Omasits U, Rossi O, Dougan G, Thomson NR, Saul A, Choudhary JS, Gerke C.

Quantitative proteomic analysis of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA) reveals highly pure preparations. Int J Med Microbiol. 2016 Feb;306(2):99-108

5 30. [B]. Christiane Gerke, Anna Maria Colucci, Carlo Giannelli, Silvia Sanzone, Claudia Giorgina Vitali, Luigi Sollai, Omar Rossi, Laura B. Martin, Jochen Auerbach, Vito Di Cioccio, Allan Saul. Production of a *Shigella sonnei* Vaccine Based on
10 Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA), 1790GAHB.

 31. PLoS One. 2015; 10(8): e013447831. Zhu D, Huang S, Gebregeorgis E, McClellan H, Dai W, Miller L, Saul A. Development of a Direct ALHYDROGEL®Formulation
15 Immunoassay (DAFIA). J Immunol Methods. 2009 May 15;344(1):73-8

 32. Datsenko et al. (Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6; 97(12):6640-5.

REVENDICATIONS

1. Composition immunogène comprenant (a) des GMMA purifiés de *Shigella sonnei*, (b) des GMMA purifiés de *Shigella flexneri* et (c) un adjuvant, dans laquelle les GMMA comprennent un lipide A modifié.

5 2. Composition immunogène selon la revendication 1, dans laquelle le lipide A modifié est un lipide A penta-acylé.

3. Composition immunogène selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle les GMMA de *Shigella flexneri* sont purifiés à partir d'au moins une souche choisie dans le groupe constitué de 2a, 3a et 6.

4. Composition immunogène selon la revendication 3, la composition immunogène comprenant des GMMA de *Shigella flexneri* purifiés à partir de chacune des
15 souches 2a, 3a et 6.

5. Composition immunogène selon la revendication 4, dans laquelle les GMMA sont purifiés à partir de (a) *Shigella sonnei* $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, $virG::nadAB$, (b) *Shigella flexneri* 2a $\Delta tolR$, $\Delta msbB$ ou *Shigella flexneri* 2a $\Delta tolR$, $\Delta htrB$, (c) *Shigella flexneri* 3a $\Delta tolR$, $\Delta msbB$ ou *Shigella flexneri* 3a $\Delta tolR$, $\Delta htrB$ et (d) *Shigella flexneri* 6 $\Delta tolR$, $\Delta msbB$ ou *Shigella flexneri* 6 $\Delta tolR$, $\Delta htrB$.

6. Composition immunogène selon l'une quelconque
25 des revendications précédentes, dans laquelle la souche de *S. sonnei* est *S. sonnei* 53G.

7. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle la ou les souches de *S. flexneri* sont choisies dans le groupe

constitué de *S. flexneri* 2457T (2a), *S. flexneri* 6885 (3a) et *S. flexneri* 10.8537 (6).

8. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, ladite composition comprenant
5 au moins une autre souche de *Shigella flexneri* choisie dans le groupe constitué de 1b et 2b.

9. Composition immunogène selon la revendication 8, dans laquelle l'autre ou les autres souches de *Shigella flexneri* sont choisies dans le groupe constitué de
10 *S. flexneri* STANSFIELD (sérotype 1b) et *S. flexneri* 69/50 (sérotype 2b).

10. Composition immunogène selon la revendication 4, dans laquelle au moins deux des quatre types de GMMA sont présents dans un rapport de
15 1/4 à 4/1.

11. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle l'adjuvant est l'hydroxyde d'aluminium.

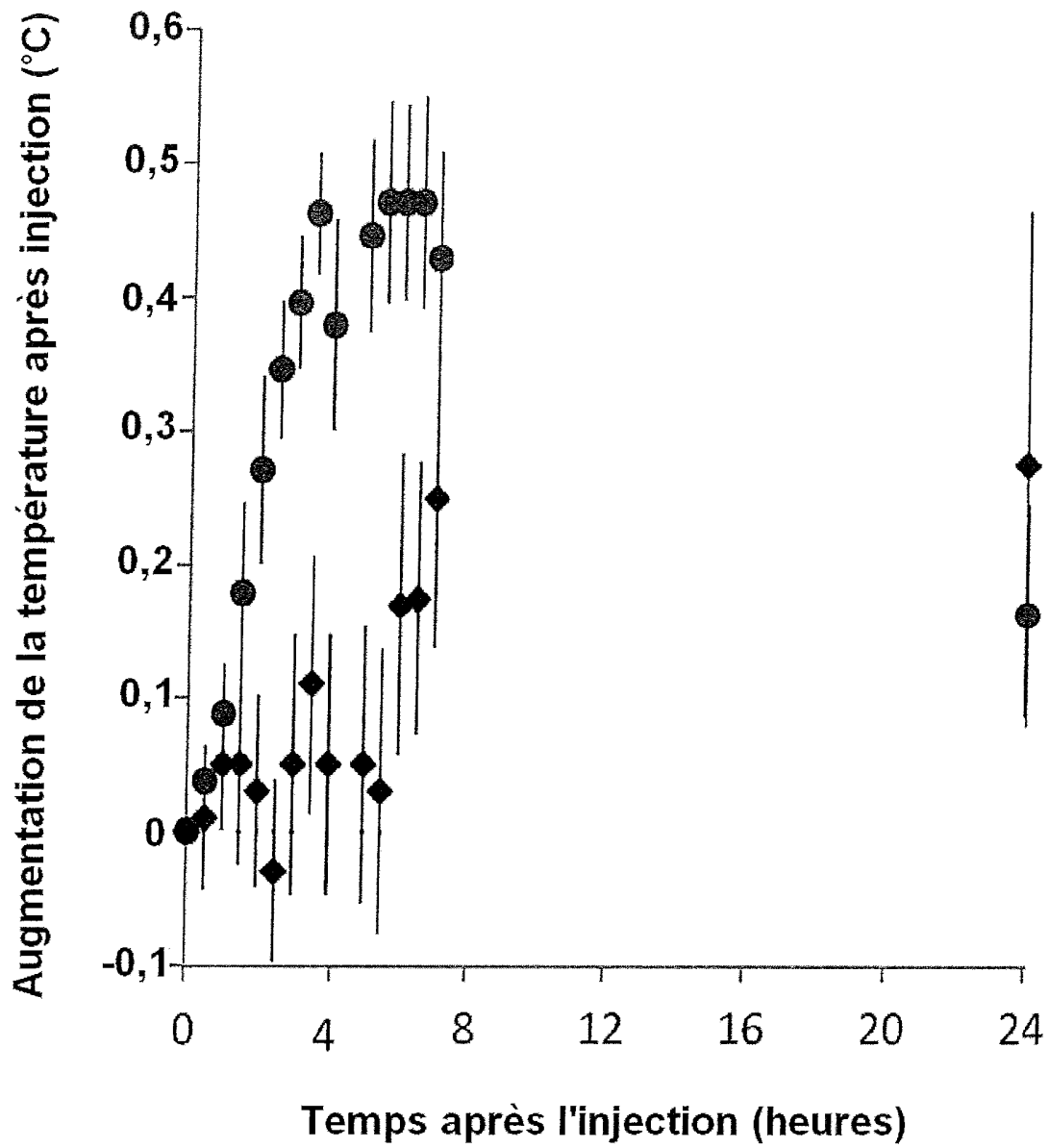
12. Composition immunogène selon l'une quelconque
20 des revendications précédentes, dans laquelle au moins 75 % des GMMA ont un diamètre situé dans la plage de 25 nm à 40 nm.

13. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications précédentes, ladite composition
25 comprenant au moins un ou plusieurs supports et/ou excipients pharmaceutiques.

14. Composition immunogène selon la revendication 13, ladite composition étant une composition pharmaceutique ou vaccinale.

30 15. Composition pharmaceutique ou vaccinale selon la revendication 14 pour une utilisation dans la

prévention ou le traitement d'une infection par *Shigella* chez un animal, particulièrement un être humain.

**Figure 1**

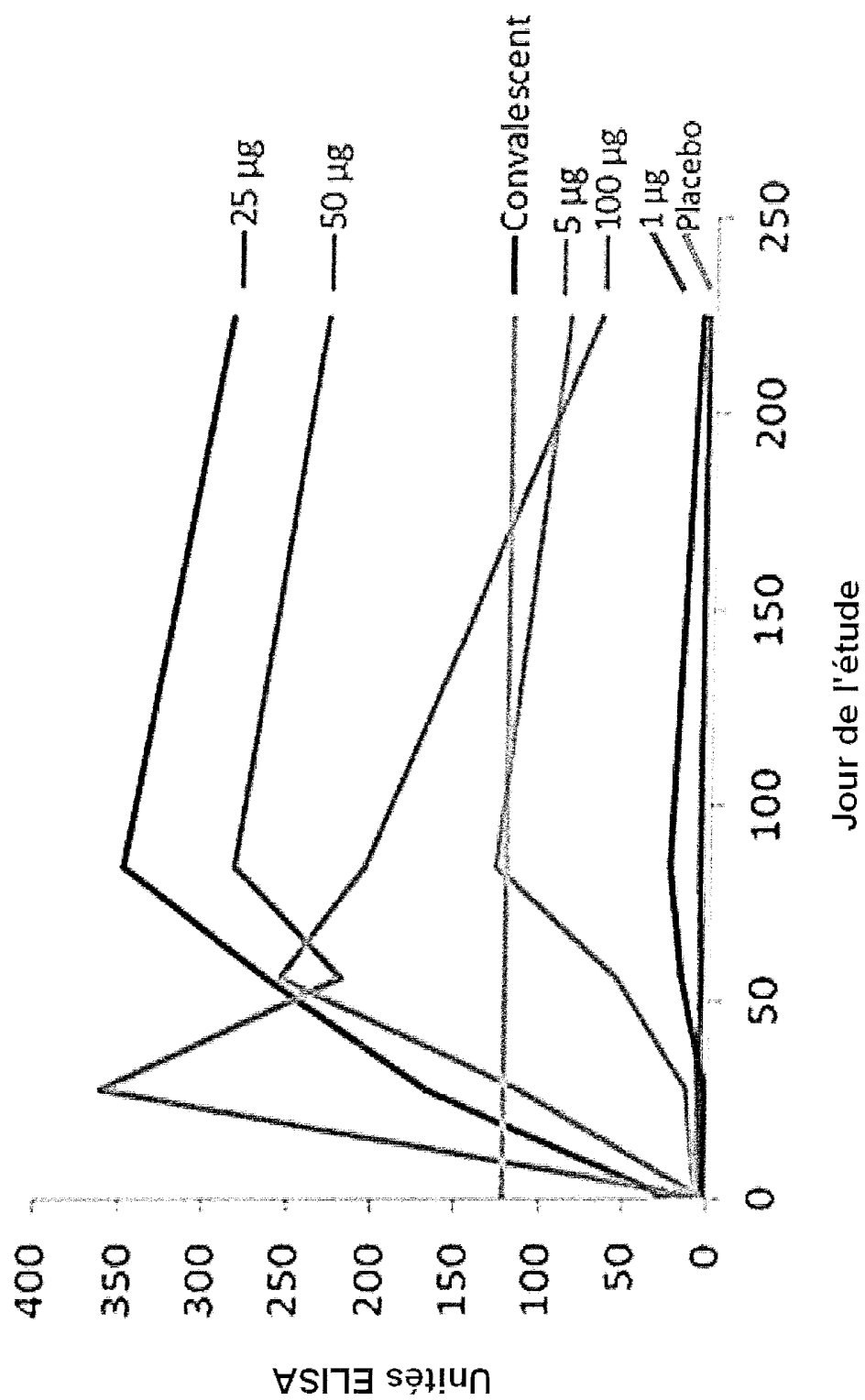


Figure 2(b)

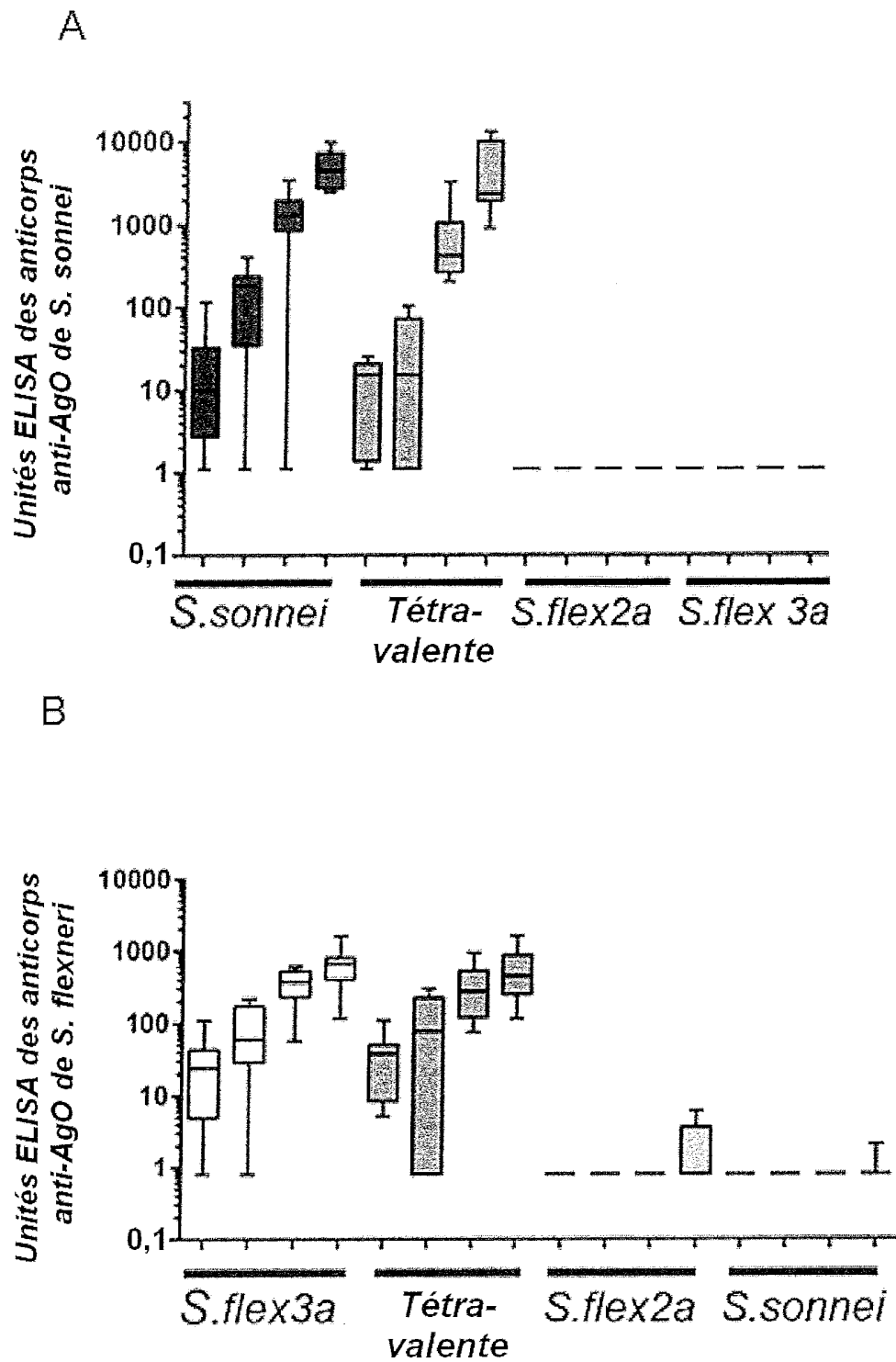


Figure 3

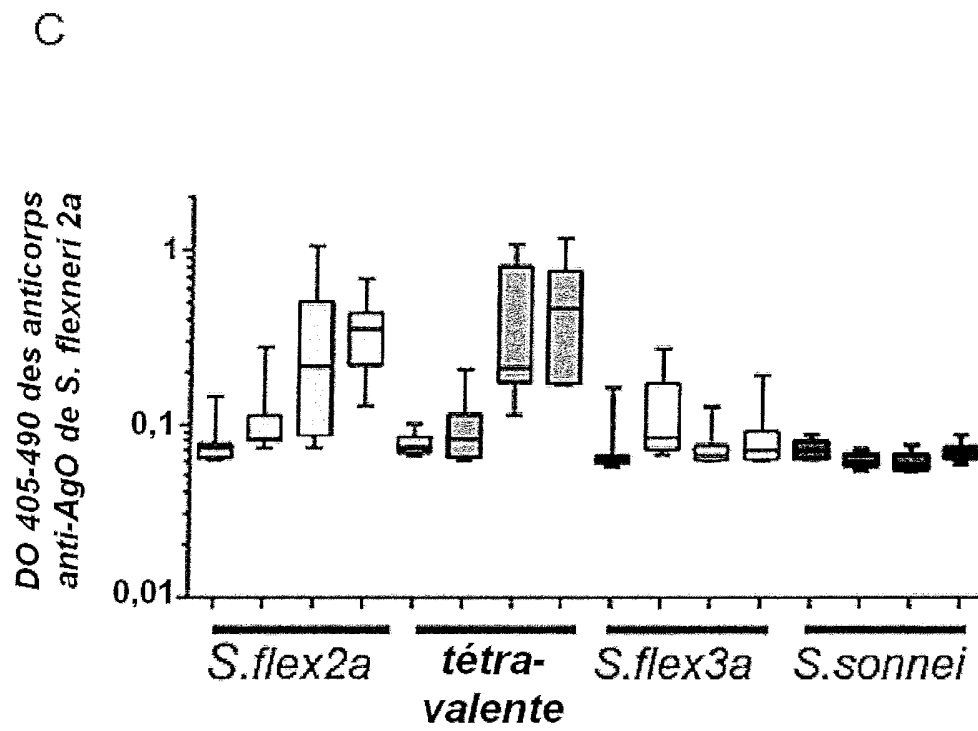


Figure 3 (suite)

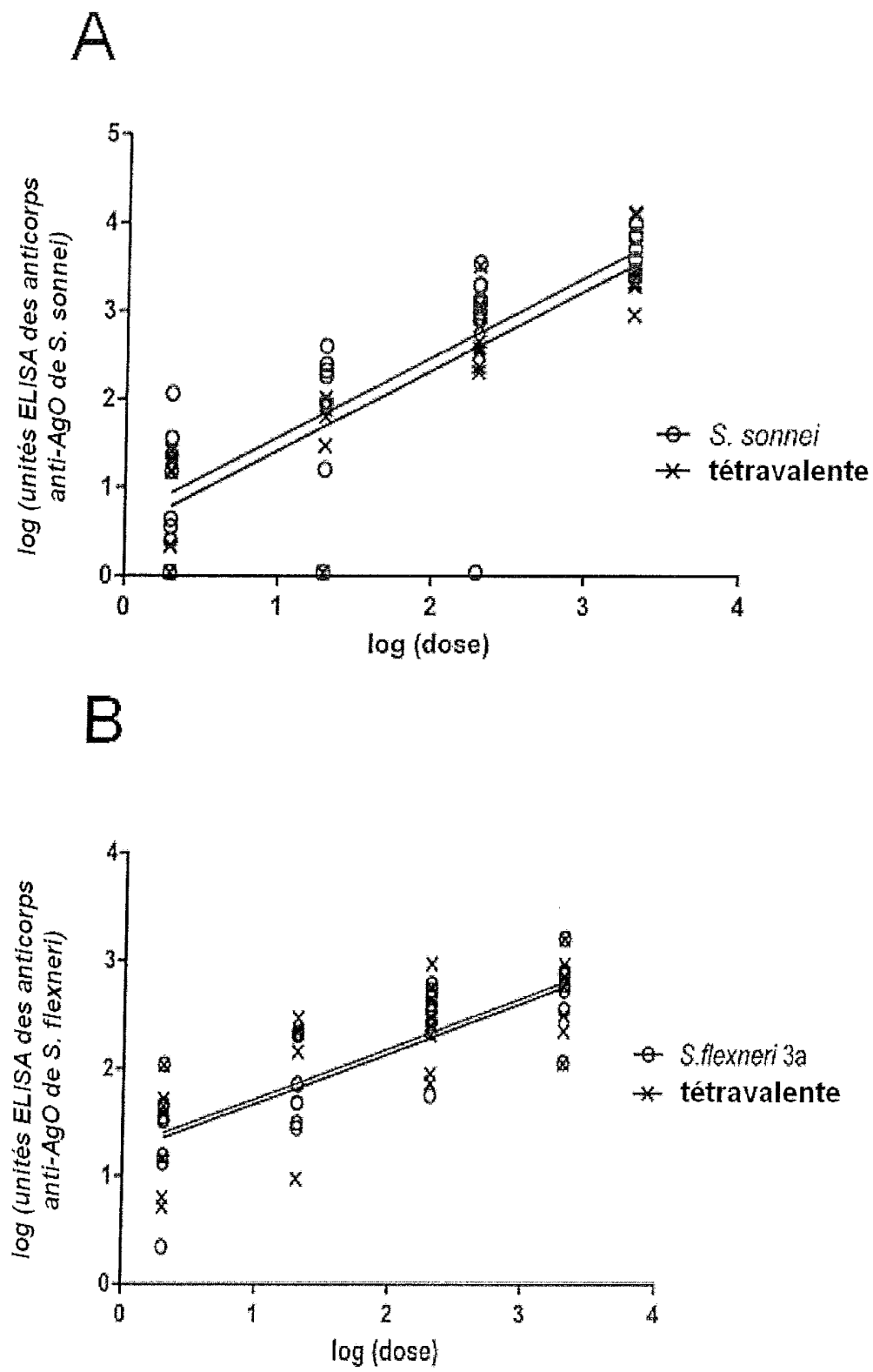


Figure 4

ABREGECOMPOSITIONS IMMUNOGENES

Cette invention concerne des compositions immunogènes, particulièrement des compositions vaccinales, pour une utilisation permettant de fournir
5 une protection contre une maladie provoquée suite à une infection bactérienne par des souches de *Shigella*.



RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1964

BO 11308
BE 201605444

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	FRANCESCO BERLANDA SCORZA ET AL: "High Yield Production Process for Shigella Outer Membrane Particles", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 6 juin 2012 (2012-06-06), page e35616, XP055145618, DOI: 10.1371/journal.pone.0035616 * résumé, p. 2 colonne de gauche premier paragraphe - 3ième paragraphe, p. 5 colonne de droite 2ième paragraphe entier, p. 11 colonne de gauche dernier paragraphe - p. 13 colonne de gauche premier paragraph entier et Fig. 6 *	1-15	INV. A61K39/112 A61K39/00
A	WO 2012/049662 A1 (NOVARTIS VACCINES INST FOR GLOBAL HEALTH SRL [IT]; MARTIN LAURA [IT];) 19 avril 2012 (2012-04-19) * résumé, p. 9 lignes 29-36 *	1-15	
A	S. LIVIO ET AL: "Shigella Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, vol. 59, no. 7, 1 octobre 2014 (2014-10-01), pages 933-941, XP055145528, ISSN: 1058-4838, DOI: 10.1093/cid/ciu468 * résumé, p. 938 premier paragraphe - p. 939 colonne de gauche dernier paragraphe entier et Tableau 2 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
25 novembre 2016		Hermann, Patrice	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1
EPO FORM 1503 03 02 (P/4C/25)



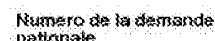
RAPPORT DE RECHERCHE
 établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
 de la loi belge sur les brevets d'invention
 du 28 mars 1964

Numero de la demande
nationale

BO 11308
BE 201605444

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
A	MITRA SOMA ET AL: "Multi-serotype outer membrane vesicles of Shigella confer passive protection to the neonatal mice against shigellosis", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 31, no. 31, 15 mai 2013 (2013-05-15), pages 3163-3173, XP028568394, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2013.05.001 * résumé, p. 3164 colonne de gauche lignes 4-8 et 14-27, colonne de droite 1er paragraph entier et 3ème paragraph entier, p. 3170 colonne de droite dernier paragraph - p. 3172 colonne de gauche ligne 9, Tableaux 1 et 4 et Fig. 2-6 *	1-15	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
A	WO 2014/192031 A1 (INDIAN COUNCIL OF MEDICAL RES [IN]) 4 décembre 2014 (2014-12-04) * résumé, p. 1 avant-dernier paragraph - p. 2 3ème paragraph, p. 4 dernier paragraph - p. 12 dernière phrase, Fig. 1-8 et revendications 1-7 *	1-15	
A	O. ROSSI ET AL: "Modulation of Endotoxicity of Shigella Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMs) by Genetic Lipid A Modifications: RELATIVE ACTIVATION OF TLR4 AND TLR2 PATHWAYS IN DIFFERENT MUTANTS", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 36, 5 septembre 2014 (2014-09-05), pages 24922-24935, XP055214631, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.566570 * le document en entier *	1-15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
25 novembre 2016		Hermann, Patrice	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

1
EPO FORM 1503 (02/02/16) (P/4C/25)



établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

BO 11308
BE 201605444

find

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

BO 11308
BE 201605444

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.

25-11-2016

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012049662	A1	19-04-2012	AUCUN
WO 2014192031	A1	04-12-2014	AUCUN



OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11308	Date du dépôt (jour/mois/année) 15.06.2016	Date de priorité (jour/mois/année) 16.06.2015	Demande n° BE201605444
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/112 A61K39/00			
Déposant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA			

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

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

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

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201605444

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	1-15
	Non :	Revendications	
Activité inventive	Oui :	Revendications	
	Non :	Revendications	1-15
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-15
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- 1 Il est fait référence au document suivant ; cette numérotation des documents sera suivie tout au long de la procédure.

- D1 FRANCESCO BERLANDA SCORZA ET AL: "High Yield Production Process for Shigella Outer Membrane Particles", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 6 June 2012 (2012-06-06), page e35616
- D2 WO 2012/049662 A1 (NOVARTIS VACCINES INST FOR GLOBAL HEALTH SRL [IT]; MARTIN LAURA [IT];) 19 April 2012 (2012-04-19)
- D3 S. LIVIO ET AL: "Shigella Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, vol. 59, no. 7, 1 October 2014 (2014-10-01), pages 933-941
- D4 MITRA SOMA ET AL: "Multi-serotype outer membrane vesicles of Shigellae confer passive protection to the neonatal mice against shigellosis", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 31, no. 31, 15 May 2013 (2013-05-15), pages 3163-3173
- D5 WO 2014/192031 A1 (INDIAN COUNCIL OF MEDICAL RES [IN]) 4 December 2014 (2014-12-04)
- D6 O. ROSSI ET AL: "Modulation of Endotoxicity of Shigella Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA) by Genetic Lipid A Modifications: RELATIVE ACTIVATION OF TLR4 AND TLR2 PATHWAYS IN DIFFERENT MUTANTS", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 36, 5 September 2014 (2014-09-05), pages 24922-24935
- D7 Marie-Laure Rosso: "Periodic Report Summary 1 - STOPENTERICS (Vaccination against Shigella and ETEC: novel antigens, novel approaches)", ST OPENT ERICS Report Summary, 18 January 2013 (2013-01-18), Retrieved from the Internet:
URL:http://cordis.europa.eu/result/rcn/55744_en.pdf

- D8 Marie-Laure Rosso: "Periodic Report Summary 2 - STOPENTERICS (Vaccination against Shigella and ETEC: Novel antigens, novel approaches)", ST OPENT ERICS Report Summary, 12 June 2013 (2013-06-12), Retrieved from the Internet:
URL:http://cordis.europa.eu/result/rcn/56779_en.pdf

- 2 Aucun des documents de l'art antérieur à disposition ne décrit l'objet des revendications 1-15. Les revendications 1-15 apparaissent donc remplir les critères de nouveauté.
- 3 Cependant, l'objet des revendications 1-15 ne semble pas basé sur une quelconque activité inventive pour les raisons suivantes:
- 3.1 Le document D1 décrit déjà une composition pouvant être utilisée comme composition vaccinale comprenant un adjuvant et des modules généralisés pour les antigènes membranaires (GMMA) purifiés à partir d'une souche de *Shigella sonnei* de phénotype $\Delta TolR \Delta msbB$. Ce phénotype particulier permet d'améliorer la production de vésicules de membrane externe comprenant du lipide A modifié, i.e. lipide A penta-acylé. L'utilisation de cette composition vaccinale chez la souris induit la production d'immunoglobulines anti-*Shigella* (cf. D1 résumé, p. 2 colonne de gauche 1er paragraphe - 3ème paragraphe, p. 5 colonne de droite second paragraphe entier, p. 11 colonne de gauche dernier paragraphe - p. 13 colonne de gauche premier paragraphe en entier et Fig. 6).
- 3.2 Le document D1 peut donc être considéré comme représentant l'art antérieur le plus proche pour l'objet de la revendication 1. L'objet de la revendication 1 diffère de celui du document D1 par le fait qu'il comprend des GMMA provenant d'une souche supplémentaire de *Shigella* conduisant ainsi à l'obtention d'une composition vaccinale ayant la propriété de protection potentielle contre des sérotypes variés de *Shigella*.
- 3.3 Au vu de l'art antérieur le plus proche, le problème technique objectif que se propose de résoudre l'objet de la revendication indépendante 1 peut être considéré comme étant l'approvisionnement en une composition vaccinale améliorée.
- 3.4 La solution à ce problème technique objectif ne peut cependant pas être considérée comme étant inventive. Il est en effet bien connu dans l'art concernant la conception des vaccins pour la prévention ou la protection des

infections par *Shigella* qu'afin d'obtenir des compositions vaccinales fournissant la plus grande protection possible contre les différents sérotypes de *Shigella*, lesdites compositions vaccinales doivent contenir des lipides A ou des lipides A modifiés provenant des souches *S. sonnei*, *S. flexneri* de sérotypes 2a, 3a et 6a, contenus soit dans des GMMA ou des vésicules de membranes externes (OMVs pour Outer membrane Vesicles) (pour revue voir D3 résumé, p. 938 le premier paragraphe entier - p. 939 colonne de gauche le dernier paragraphe entier et Tableau 2). Ainsi tout homme du métier spécialisé en conception de vaccins aurait, sans recourir à une quelconque activité inventive, la motivation instinctive d'ajouter des GMMAs de *S. flexneri* à la composition vaccinale du document D1 et arriverait ainsi, sans avoir recours à un quelconque savoir-faire inventif, à l'objet revendiqué. De plus il est ici important de souligner que des compositions vaccinales comprenant des sérotypes multiples de souches de *Shigella* sont déjà proposées dans le document D2, comme solution au problème posé en approvisionnement en compositions vaccinales offrant un large spectre de protection contre les shigelloses (cf. D2 résumé, p. 9 lignes 29-36). Ainsi, nonobstant le fait que le document D2 traite le problème d'obtention de composition vaccinale pour la protection contre les infections aux *Salmonelles*, les auteurs du document D2 ont déjà envisagé une composition vaccinale multivalente basée sur le mélange de GMMA provenant de sérotypes variés de souches de *Salmonella* et de *Shigella* fournissant ainsi directement une solution à l'homme du métier qui chercherait à résoudre le problème technique objectif comme défini ci-dessus.

- 3.5 La revendication indépendante 1 ne paraît donc pas satisfaire aux conditions requises concernant l'activité inventive.
- 3.6 Un raisonnement identique à celui exposé ci-dessus aux points 3.2-3.5, s'applique *mutatis mutandis* à l'objet de la revendication indépendante 15 qui concerne l'utilisation médicale de la composition vaccinale proposée dans la revendication indépendante 1.
- 3.7 Au vu de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche, les revendications dépendantes 2-14 n'apparaissent pas contenir des caractéristiques essentielles additionnelles qui, en combinaison avec les caractéristiques essentielles de l'objet de la revendication indépendante 1 auxquelles elles se réfèrent, satisfont aux conditions requises pour reconnaître une activité inventive. Ces caractéristiques additionnelles semblent en effet être conventionnelles et ne provoquent apparemment pas d'effet technique surprenant ou l'obtention de résultats inattendus par l'homme du métier.