



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

(11) 1023915 B1

(47) Date de délivrance : 31/01/2018

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 31/01/2018

(21) Numéro de demande : BE2016/5611

(22) Date de dépôt : 25/07/2016

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A61K 39/04, C12N 7/00, C12N 15/861, C07K 14/075

(30) Données de priorité :

27/07/2015 GB 1513176.6

(73) Titulaire(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

(72) Inventeur(s) :

DEMOITIE Marie-Ange
1330 RIXENSART
Belgique

DONNER Marie-Noëlle
1330 RIXENSART
Belgique

OUAKED Nadia
1330 RIXENSART
Belgique

(54) NOUVEAUX PROCEDES POUR INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE

(57) La présente invention concerne des procédés pour induire une réponse immunitaire, en particulier des procédés pour induire une réponse immunitaire contre des infections ou des maladies mycobactériennes comprenant (1) au moins une administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et au moins une administration d'un adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ou (ii) au moins une administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 et au moins une administration d'un adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv0125. Des compositions associées, des constructions adénovirales et des séquences polynucléotidiques sont également fournies.

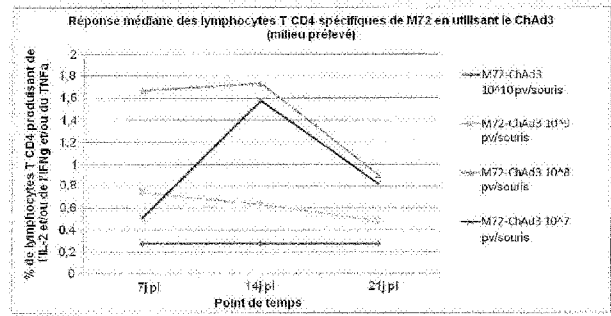


Figure 1

BREVET D'INVENTION BELGE

SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie

Numéro de publication : 1023915
Numéro de dépôt : BE2016/5611

Office de la Propriété intellectuelle

Classification Internationale : A61K 39/04 C12N 7/00 C12N 15/861
C07K 14/075
Date de délivrance : 31/01/2018

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 25/07/2016.

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 : NOUVEAUX PROCEDES POUR INDUIRE UNE

REPONSE IMMUNITAIRE.

INVENTEUR(S) :

DEMOITIE Marie-Ange, GlaxoSmithKline Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

DONNER Marie-Noëlle, GlaxoSmithKline Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

OUAKED Nadia, GlaxoSmithKline Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

PRIORITE(S) :

27/07/2015 GB 1513176.6;

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 31/01/2018,

Par délégation spéciale :

NOUVEAUX PROCÉDES POUR INDUIRE UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE

Domaine technique

5 La présente invention concerne des procédés pour induire une réponse immunitaire, en particulier des procédés pour induire une réponse immunitaire contre des infections ou des maladies mycobactériennes comprenant (i) au moins une administration d'un
10 antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et au moins une administration d'un adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ou (ii) au moins une administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 et au moins une administration d'un adénovirus
15 codant pour un antigène apparenté à Rv0125. Des compositions associées, des constructions adénovirales et des séquences polynucléotidiques sont également fournies.

20 Contexte de l'invention

 La vaccination est l'un des procédés les plus efficaces pour la prévention des maladies infectieuses. Toutefois, souvent une seule administration d'un
25 antigène n'est pas suffisante pour conférer une immunité optimale et/ou une réponse durable. Les approches pour établir une immunité forte et durable contre des agents pathogènes spécifiques comprennent l'addition d'adjuvants aux vaccins et/ou une
30 vaccination répétée, c'est-à-dire la stimulation d'une réponse immunitaire par l'administration d'une ou de

plusieurs autres doses d'antigène. Ces autres administrations peuvent être effectuées avec le même vaccin (rappel homologue) ou avec un vaccin différent (rappel hétérologue).

5 La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse chronique provoquée par une infection avec *Mycobacterium tuberculosis* et d'autres espèces de *Mycobacterium*. Il s'agit d'une maladie majeure dans les pays en développement, ainsi qu'un problème croissant
10 dans les régions développées du monde.

Mtb72f et M72 sont des antigènes à base de protéines de fusion dérivés des protéines Rv1196 et Rv0125 de *Mycobacterium tuberculosis*. Mtb72f et M72 (décrits, par exemple, dans les demandes de brevet
15 international WO 2006/117240, WO 2012/080369 et WO 2012/080370 qui sont incorporées ici en référence) ou leurs fragments ou dérivés sont des antigènes protéiniques d'un bénéfice potentiel pour le traitement ou la prévention de la tuberculose.

20 Des recherches précliniques et cliniques ont mené à l'administration de M72 chez des êtres humains conjointement avec les immunostimulants monophosphoryl-lipide A 3-O-désacylé (3D-MPL) et QS21 dans une formulation liposomique et dans un calendrier de
25 0,1 mois en utilisant 10 µg de polypeptide M72, 25 µg de 3D-MPL et 25 µg de QS21 (Leroux-Roels et al. Vaccine 2013 31 2196-2206, Montoya et al. J. Clin. Immunol. 2013 33(8): 1360-1375 ; Thacher EG et al. AIDS 2014 28(12): 1769-1781 ; Idoko OT et al. Tuberculosis (Edinb)
30 2014 94(6): 564-578 ; Penn-Nicholson A, et al. Vaccine 2015 33(32): 4025-4034 doi:10.1016/j.vaccine.

2015.05.088). Un vaccin candidat utilisant l'antigène M72 est actuellement dans un essai en phase IIB (identifiant ClinicalTrials.gov : NCT01755598) pour évaluer l'efficacité protectrice de deux doses de protéine adjuvée contre la TB pulmonaire, comparativement à un placebo, chez des adultes âgés de 18 à 50 ans vivant dans des pays endémiques de la tuberculose.

Le document WO 2008107370A1 (incorporé ici en référence) décrit l'administration simultanée d'un antigène polypeptidique et d'un adénovirus codant pour un antigène polypeptidique.

Le document WO 2010023260 (incorporé ici en référence) décrit l'administration simultanée d'un antigène polypeptidique et d'un vecteur viral codant pour un antigène polypeptidique.

Il y a un besoin constant de nouvelles méthodes pour l'immunisation contre des maladies, notamment la tuberculose, qui sont hautement efficaces, sûres, pratiques, rentables, durables et qui induisent un large spectre de réponses immunitaires.

Résumé de l'invention

Il a été à présent découvert de façon surprenante que la sensibilisation avec un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196/Rv0125 et le rappel avec un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196/Rv0125, ou la sensibilisation avec un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196/Rv0125 et un rappel avec un antigène

polypeptidique apparenté à Rv1196/Rv0125 peuvent fournir des réponses immunitaires qui sont sensiblement améliorées par rapport à d'autres approches potentielles.

5 Par conséquent, dans un premier aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet, suivie de l'administration d'un
10 adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

Dans un deuxième aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant l'administration d'un
15 adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui
20 comprend également un adjuvant. Eventuellement, l'adjuvant comprend un agoniste des TLR et/ou une saponine immunologiquement active. L'agoniste des TLR est de façon appropriée un agoniste du TLR4.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique
25 apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

De façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est
30 fourni dans une composition qui ne comprend pas un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

Dans un troisième aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet, suivie de
5 l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

Dans un quatrième aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant l'administration d'un
10 adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui
15 comprend également un adjuvant. Eventuellement, l'adjuvant comprend un agoniste des TLR et/ou une saponine immunologiquement active. L'agoniste des TLR est de façon appropriée un agoniste du TLR4.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique
20 apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

De façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est
25 fourni dans une composition qui ne comprend pas un antigène apparenté à Rv0125.

Brève description des figures

30 Figure 1 - Pourcentage médian de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 à partir de souris

CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 7, 14 et 21 jours après l'immunisation en utilisant le ChAd3 dans une plage de doses.

5 Figure 2 - Pourcentage médian de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 à partir de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 7, 14 et 21 jours après l'immunisation en utilisant le ChAd63 dans une plage de
10 doses.

Figure 3 - Pourcentage médian de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 à partir de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 7, 14 et 21 jours après
15 l'immunisation en utilisant le ChAd3 dans une plage de doses.

Figure 4 - Pourcentage médian de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 à partir de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 7, 14 et 21 jours après
20 l'immunisation en utilisant le ChAd63 dans une plage de doses.

Figure 5 - Pourcentage de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 à partir du sang total de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 14 PI et 14 PII en utilisant des stratégies de vaccinations de sensibilisation-rappel hétérologues (ChAd/Prot et Prot/ChAd).
25

30 Figure 6 - Pourcentage de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 à partir du sang

total de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 14 PI et 14 PII en utilisant des stratégies de vaccinations de sensibilisation-rappel homologues (ChAd/ChAd) et en
5 combinaison avec M72/AS01E (mélange ou coadministration).

Figure 7 - Pourcentage de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 à partir du sang total de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 14 PI et 14 PII en
10 utilisant des stratégies de vaccinations de sensibilisation-rappel hétérologues (ChAd/Prot et Prot/ChAd).

Figure 8 - Pourcentage de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 à partir du sang total de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 14 PI et 14 PII en
15 utilisant des stratégies de vaccinations de sensibilisation-rappel homologues (ChAd/ChAd) et en
20 combinaison avec M72/AS01E (mélange ou coadministration).

Figure 9 - Pourcentage de la réponse de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 à partir du tissu pulmonaire de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 14 PII.
25

Figure 10 - Pourcentage de la réponse de lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 à partir du tissu pulmonaire de souris CB6F1 exprimant les cytokines IFN-gamma et/ou IL-2 et/ou TNF-alpha à 14 PII.

Figure 11 - Profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PI chez des souris CB6F1 immunisées.

5 Figure 12 - Tableau présentant les valeurs des données du profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PI chez des souris CB6F1 immunisées.

10 Figure 13 - Profil des cytokines de la réponse de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PI chez des souris CB6F1 immunisées.

Figure 14 - Tableau présentant les valeurs des données du profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées.

15 Figure 15 - Profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le poumon à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées.

20 Figure 16 - Tableau présentant les valeurs des données du profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le poumon à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées.

Figure 17 - Profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PI chez des souris CB6F1 immunisées.

25 Figure 18 - Tableau présentant les valeurs des données du profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PI chez des souris CB6F1 immunisées.

30 Figure 19 - Profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées.

Figure 20 - Tableau présentant les valeurs des données du profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans le sang total (WBLO) à 14 PII chez des souris CB6F1.

5 Figure 21 - Profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans le poumon à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées.

Figure 22 - Tableau présentant les valeurs des données du profil des cytokines de la réponse des
10 lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans le poumon à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées.

Figure 23 - Sérologie des Ig totales anti-M72 à 13 j PII.

Figure 24 - Représentation schématique de
15 l'arrangement de la construction M72-ChAd3.

Figure 25 - Représentation schématique de l'arrangement de la construction M72-ChAd63.

Brève description des identificateurs de séquences

20

SEQ ID NO : 1 - Séquence polypeptidique de Rv1196 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

SEQ ID NO : 2 - Séquence polypeptidique de Rv1196 de *Mycobacterium tuberculosis* F11

25 SEQ ID NO : 3 - Séquence polypeptidique de Rv0125 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (séquence mature)

SEQ ID NO : 4 - Séquence polypeptidique de M72 2-his

SEQ ID NO : 5 - Polynucléotide de M72 2-his

30 SEQ ID NO : 6 - Séquence polypeptidique de M72 sans his

- SEQ ID NO : 7 - Polynucléotide de M72 sans his
- SEQ ID NO : 8 - Polynucléotide humain optimisé de M72 sans his
- SEQ ID NO : 9 - Polynucléotide de ChAd3
- 5 SEQ ID NO : 10 - Séquence polypeptidique du penton de ChAd3
- SEQ ID NO : 11 - Séquence polypeptidique de l'hexon de ChAd3
- SEQ ID NO : 12 - Séquence polypeptidique de la
- 10 fibre de ChAd3
- SEQ ID NO : 13 - ADN de la construction M72-ChAd3
- SEQ ID NO : 14 - Polynucléotide de ChAd63
- SEQ ID NO : 15 - Séquence polypeptidique du penton de ChAd63
- 15 SEQ ID NO : 16 - Séquence polypeptidique de l'hexon de ChAd63
- SEQ ID NO : 17 - Séquence polypeptidique de la fibre de ChAd63
- SEQ ID NO : 18 - ADN de la construction M72-ChAd63
- 20 SEQ ID NO : 19 - Polynucléotide de ChAd155
- SEQ ID NO : 20 - Séquence polypeptidique du penton de ChAd155
- SEQ ID NO : 21 - Séquence polypeptidique de l'hexon de ChAd155
- 25 SEQ ID NO : 22 - Séquence polypeptidique de la fibre de ChAd155

Description détaillée

- 30 La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse chronique provoquée par une infection avec

Mycobacterium tuberculosis et d'autres espèces de *Mycobacterium*. Il s'agit d'une maladie majeure dans les pays en développement, ainsi qu'un problème croissant dans les régions développées du monde. On pense qu'environ un tiers de la population mondiale est infecté de façon latente par les bacilles de la TB, avec environ 9 millions de nouveaux cas de TB active et 1,5 million de décès tous les ans. Environ 10 % de ces personnes infectées par les bacilles de la TB développeront une TB active, chaque personne atteinte d'une TB active infectant en moyenne de 10 à 15 autres personnes par an. (World Health Organisation Tuberculosis Facts 2014)

Mycobacterium tuberculosis infecte les individus par la voie respiratoire. Les macrophages alvéolaires engloutissent la bactérie, mais elle est capable de survivre et de proliférer en inhibant la fusion des phagosomes avec les lysosomes acides. Une réponse immunitaire complexe impliquant les lymphocytes T CD4+ et CD8+ s'ensuit, produisant finalement la formation d'un granulome. Au cœur de la réussite de *Mycobacterium tuberculosis* en tant qu'agent pathogène, il y a le fait que la bactérie isolée, mais pas éradiquée, peut persister pendant de longues périodes, laissant un individu vulnérable au développement ultérieur d'une TB active.

Moins de 5 % des individus infectés développent une TB active au cours des premières années après l'infection. Le granulome peut persister pendant des décennies et on pense qu'il contient le *Mycobacterium tuberculosis* vivant dans un état de dormance, privé

d'oxygène et de nutriments. Toutefois, il a été suggéré que la majorité des bactéries dans l'état de dormance sont localisées dans des types cellulaires non macrophagiques disséminés dans tout le corps (Locht et al., Expert Opin. Biol. Ther. 2007 7(11): 1665-1677).
5 Le développement d'une TB active survient lorsque l'équilibre entre l'immunité naturelle de l'hôte et l'agent pathogène change, par exemple comme résultat d'un événement immunosuppresseur (Anderson P Trends in
10 Microbiology 2007 15(1): 7-13 ; Ehlers S Infection 2009 37(2): 87-95).

Une hypothèse dynamique décrivant l'équilibre entre la TB latente et la TB active a été également proposée (Cardona P-J Inflammation & Allergy - Drug
15 Targets 2006 6: 27-39 ; Cardona P-J Infection 2009 37(2): 80-86).

Bien qu'une infection puisse être asymptomatique pendant une période de temps considérable, la maladie active se manifeste le plus couramment sous la forme
20 d'une inflammation aiguë des poumons, entraînant un état de fatigue, une perte de poids, de la fièvre et une toux persistante. Si elle n'est pas traitée, des complications sérieuses et le décès en découlent généralement.

25 La tuberculose peut être généralement contrôlée en utilisant un traitement antibiotique étendu, bien que ce traitement ne soit pas suffisant pour prévenir la propagation de la maladie. Les individus infectés de façon active peuvent être grandement asymptomatiques,
30 mais contagieux, pendant un certain temps. En outre, bien que l'observance du régime thérapeutique (qui dure

généralement 6 mois ou plus) soit essentielle, le comportement des patients est difficile à surveiller. Certains patients ne terminent pas le cours du traitement, ce qui peut mener à un traitement
5 inefficace et au développement d'une résistance médicamenteuse.

La TB multirésistante (TB-MR) est une forme qui ne répond pas aux médicaments de première intention. Il est estimé que 480 000 personnes ont développé une
10 TB-MR en 2013. La TB-MR peut être traitée en utilisant des médicaments de seconde intention. Toutefois, les options de traitement de seconde intention sont limitées et les médicaments recommandés ne sont pas toujours disponibles. La chimiothérapie étendue requise
15 (jusqu'à deux ans de traitement) est coûteuse et peut produire des réactions indésirables sévères aux médicaments chez les patients.

Une TB ultrarésistante (TB-UR) survient lorsqu'une résistance aux médicaments de seconde intention se
20 développe en plus de la résistance aux médicaments de première intention. On estime qu'environ 9,0 % des cas de TB-MR souffraient d'une TB-UR (World Health Organisation Tuberculosis Facts 2014).

Même si un cours complet de traitement
25 antibiotique est complété, l'infection avec *M. tuberculosis* peut ne pas être éradiquée de l'individu infecté et peut demeurer sous la forme d'une infection latente qui peut être réactivée. Par conséquent, un diagnostic précis et précoce de la
30 maladie est d'une importance capitale.

Actuellement, une vaccination avec des bactéries vivantes atténuées représente le procédé le plus largement utilisé pour induire une immunité protectrice. Le *Mycobacterium* le plus courant employé pour cet objectif est le bacille de Calmette-Guérin (BCG), une souche avirulente de *M. bovis* qui a été développée pour la première fois il y a plus de 60 ans. Il est administré à la naissance dans les régions endémiques de la TB. Toutefois, l'innocuité et l'efficacité du BCG sont une source de controverse - tout en protégeant contre une manifestation sévère de la maladie chez les enfants, l'efficacité du BCG contre la maladie chez les adultes est variable. En outre, certains pays, comme les Etats-Unis, ne vaccinent pas le grand public avec cet agent.

Il a été montré que plusieurs des protéines qui sont fortement exprimées durant les stades précoces de l'infection par *Mycobacterium* fournissent une efficacité protectrice dans des modèles de vaccination animale. Toutefois, la vaccination avec des antigènes qui sont hautement exprimés durant les stades précoces de l'infection peut ne pas fournir une réponse immunitaire optimale pour faire face aux stades ultérieurs de l'infection. Un contrôle adéquat durant une infection latente peut nécessiter des lymphocytes T qui sont spécifiques des antigènes particuliers qui sont exprimés à ce moment-là. Des vaccins après exposition qui ciblent directement les bactéries persistantes dormantes peuvent aider dans la protection contre la réactivation de la TB, amplifiant de cette façon le contrôle de la TB, voire même permettant

l'élimination de l'infection. Un vaccin ciblant une TB latente pourrait par conséquent réduire significativement et économiquement les taux globaux d'infection de TB.

5 Des vaccins sous-unitaires à base d'antigènes des stades tardifs pourraient être également utilisés en combinaison avec des antigènes des stades précoces pour fournir un vaccin multiphase. En variante, des antigènes des stades précoces et/ou tardifs pourraient
10 être utilisés pour compléter et améliorer la vaccination par le BCG (soit en stimulant la réponse au BCG soit par le développement de souches recombinantes avancées du BCG).

Mtb72f et M72 sont des antigènes à base de
15 protéines de fusion d'un bénéfice potentiel pour le traitement ou la prévention de la tuberculose. Mtb72f et M72 sont dérivés des protéines de *Mycobacterium tuberculosis* Rv1196 et Rv0125, les deux gènes étant présents dans les souches à la fois virulentes et
20 avirulentes du complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, et dans le BCG.

Rv1196 (décrit, par exemple, sous le nom de Mtb39a dans Dillon et al. Infection and Immunity 1999 67(6): 2941-2950) est hautement conservé, avec 100 %
25 d'identité de séquence parmi les souches H37Rv, C, Haarlem, CDC1551, 94-M4241A, 98-R604INH-RIF-EM, KZN605, KZN1435, KZN4207, KZNR506, la souche F11 comportant une seule mutation ponctuelle Q30K (la plupart des autres isolats cliniques présentent plus de 90 % d'identité
30 avec H37Rv). Un adénovirus codant pour un antigène

apparenté à Rv1196 est décrit dans Lewinsohn et al. Am J Respir Crit Care Med 2002 116: 843-848.

Rv0125 (décrit, par exemple, sous le nom de Mtb32a dans Skeiky et al. Infection and Immunity 1999 67(8): 3998-4007) est également hautement conservé, avec 100 % d'identité de séquence parmi de nombreuses souches. Un adénovirus (Ad5 humain) codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est décrit dans Zhang et al. Human Vaccines & Therapeutics 2015 11(7): 1803-1813 doi:10.1080/21645515.2015.1042193. Le Rv0125 pleine longueur comprend une séquence signal N-terminale qui est clivée pour fournir la protéine mature.

Il a été montré que Mtb72f fournit une protection dans un certain nombre de modèles animaux (voir, par exemple : Brandt et al. Infect. Immun. 2004 72(11): 6622-6632 ; Skeiky et al. J. Immunol. 2004 172: 7618-7628 ; Tsenova et al. Infect. Immun. 2006 74(4): 2392-2401). Mtb72f a également fait l'objet de recherches cliniques (Von Eschen et al. 2009 Human Vaccines 5(7): 475-482). M72 est un antigène amélioré qui incorpore une seule mutation de sérine en alanine par rapport au Mtb72f, entraînant une amélioration des caractéristiques de stabilité. Il a été également montré que les antigènes apparentés au M72 sont utiles dans un modèle de TB latente (demande de brevet international WO 2006/117240, incorporée ici en référence). Des recherches précliniques et cliniques ont été menées sur M72 administré chez des êtres humains conjointement avec les immunostimulants monophosphoryl-lipide A 3-O-déscylé (3D-MPL) et QS21 dans une formulation liposomique et dans un calendrier

de 0,1 mois en utilisant 10 µg de polypeptide M72, 25 µg de 3D-MPL et 25 µg de QS21 (voir, par exemple, Leroux-Roels et al. Vaccine 2013 31 2196-2206, Montoya et al. J. Clin. Immunol. 2013 33(8): 1360-1375 ;
5 Thacher EG et al. AIDS 2014 28(12): 1769-1781 ; Idoko OT et al. Tuberculosis (Edinb) 2014 94(6): 564-578 ; Penn-Nicholson A, et al. Vaccine 2015 33(32): 4025-4034 doi:10.1016/j.vaccine.2015.05.088).

Un vaccin candidat utilisant l'antigène M72 est
10 actuellement dans un essai en phase IIB (identifiant ClinicalTrials.gov : NCT01755598) pour évaluer l'efficacité protectrice de deux doses de protéine adjuvée contre la TB pulmonaire, comparativement à un placebo, chez des sujets âgés de 18 à 50 ans vivant
15 dans des pays endémiques de la TB. Néanmoins, il demeure un besoin d'améliorer les approches de vaccination.

Dans un premier aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire
20 chez un sujet comprenant l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet, suivie de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

Dans un deuxième aspect de l'invention, il est
25 fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 au sujet, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

30 Dans un troisième aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire

chez un sujet comprenant l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet, suivie de l'administration d'une composition immunogène comprenant un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

Dans un quatrième aspect de l'invention, il est fourni un procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet.

Tel qu'utilisé ici, l'administration d'une première composition « suivie de » l'administration d'une seconde composition indique qu'un intervalle de temps s'est écoulé entre l'administration de la première composition et l'administration de la seconde composition. De façon appropriée, l'intervalle de temps entre les administrations est d'une semaine à deux ans, en particulier deux semaines à dix-huit mois, généralement trois semaines à quinze mois, comme trois semaines à six mois, par exemple trois semaines à deux mois, spécialement trois semaines à six semaines comme environ quatre semaines.

Il est également fourni un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

De façon similaire, il est fourni un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

En outre, il est fourni l'utilisation d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

En outre, il est fourni l'utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

Il est également fourni un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

De façon similaire, il est fourni un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à

Rv1196, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de
5 l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

En outre, il est fourni l'utilisation d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse
10 immunitaire chez un sujet où un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

Il est également fourni l'utilisation d'un
15 adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de
20 l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

Il est également fourni un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où
25 l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

De façon similaire, il est fourni un adénovirus
30 simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, pour une utilisation dans l'induction d'une

réponse immunitaire chez un sujet où un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

5 En outre, il est fourni l'utilisation d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de
10 l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

 En outre, il est fourni l'utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament
15 pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

20 Il est également fourni un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de
25 l'administration de l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

 De façon similaire, il est fourni un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, pour une utilisation dans l'induction d'une
30 réponse immunitaire chez un sujet où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à

Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

En outre, il est fourni l'utilisation d'un
5 antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de
10 l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

Il est également fourni l'utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament pour induire une réponse immunitaire chez un sujet où
15 l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique
20 apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui comprend également un adjuvant. Eventuellement, l'adjuvant comprend un agoniste des TLR et/ou une saponine immunologiquement active. L'agoniste des TLR est de façon appropriée un agoniste du TLR4.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique
25 apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui comprend également un adjuvant. Eventuellement, l'adjuvant comprend un agoniste des TLR et/ou une saponine immunologiquement active. L'agoniste des TLR
30 est de façon appropriée un agoniste du TLR4.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, de
5 telle façon qu'elle ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196. Par exemple, elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène mycobactérien (de telle façon
10 qu'elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun adénovirus simien non humain) en particulier elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun adénovirus codant pour un antigène mycobactérien (de telle façon qu'elle est sensiblement dépourvue de ou ne
15 comprend aucun adénovirus). Dans certains modes de réalisation, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun adénovirus codant pour un antigène mycobactérien.

20 En outre, de façon appropriée, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, comme un
25 adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196. Par exemple, un adénovirus simien non humain codant pour un antigène mycobactérien (tel qu'un adénovirus simien non humain quelconque) en particulier un adénovirus quelconque codant pour un
30 antigène mycobactérien (tel qu'un adénovirus quelconque). De façon appropriée, l'antigène

polypeptidique apparenté à Rv1196 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un adénovirus quelconque codant pour un antigène mycobactérien.

5 De façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue de ou ne comprend pas un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196. Par exemple, elle
10 est sensiblement dépourvue de ou ne comprend pas un antigène mycobactérien polypeptidique (de telle façon qu'elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun autre antigène). Dans certains modes de réalisation, l'adénovirus simien non humain codant pour
15 un antigène apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue de ou ne comprend pas un antigène mycobactérien polypeptidique.

En outre, de façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196
20 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196. Par exemple, un antigène mycobactérien polypeptidique (comme tout autre antigène). De façon appropriée, l'adénovirus simien non
25 humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un antigène mycobactérien polypeptidique.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique
30 apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue d'un adénovirus simien non

humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, de telle façon qu'elle ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125. Par exemple, elle est sensiblement dépourvue de
5 ou ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène mycobactérien (de telle façon qu'elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun adénovirus simien non humain) en particulier elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun
10 adénovirus codant pour un antigène mycobactérien (de telle façon qu'elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun adénovirus). Dans certains modes de réalisation, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui est
15 sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun adénovirus codant pour un antigène mycobactérien.

En outre, de façon appropriée, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou
20 six jours) d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, comme un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125. Par exemple, un adénovirus simien non humain codant pour un antigène mycobactérien (tel
25 qu'un adénovirus simien non humain quelconque) en particulier un adénovirus quelconque codant pour un antigène mycobactérien (tel qu'un adénovirus quelconque). De façon appropriée, l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 n'est pas administré
30 au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou

six jours) d'un adénovirus quelconque codant pour un antigène mycobactérien.

De façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est
5 fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue de ou ne comprend pas un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125. Par exemple, elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend pas un antigène mycobactérien polypeptidique (de telle façon
10 qu'elle est sensiblement dépourvue de ou ne comprend aucun autre antigène). Dans certains modes de réalisation, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue de ou ne
15 comprend pas un antigène mycobactérien polypeptidique.

En outre, de façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un antigène
20 polypeptidique apparenté à Rv0125. Par exemple, un antigène mycobactérien polypeptidique (comme tout autre antigène). De façon appropriée, l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme
25 deux, trois ou six jours) d'un antigène mycobactérien polypeptidique.

De façon appropriée, le sujet est un mammifère, tel qu'un bovin ou un être humain. En particulier, le sujet est un être humain.

30 Par sensiblement dépourvu de, dans le contexte d'un adénovirus, il est signifié généralement

comprenant moins de 10^4 , comme moins de 10^3 , en particulier moins de 10^2 ou moins de 10^1 particules virales du type pertinent par dose. Les procédés appropriés pour déterminer le nombre des particules virales comprennent l'analyse par PCR quantitative, la CLHP analytique ou des procédés spectrophotométriques basés sur l' $A_{260\text{ nm}}$.

Par sensiblement dépourvu de, dans le contexte d'un antigène polypeptidique, il est signifié généralement comprenant moins de 1 μg , en particulier moins de 0,01 μg de l'antigène ou des antigènes pertinents par dose. Les procédés appropriés pour déterminer la quantité d'antigène peptidique sont connus de l'homme du métier et selon la composition, ils peuvent combiner des procédés de purification pour aider à faciliter un procédé de quantification approprié (comme une CLHP analytique ou des procédés spectrophotométriques).

Généralement, l'objectif du procédé de l'invention est d'induire une réponse immunitaire protectrice, c'est-à-dire, d'immuniser ou de vacciner le sujet contre un agent pathogène apparenté. Par conséquent, l'invention peut être appliquée à la prophylaxie, au traitement ou à l'amélioration d'une infection par des mycobactéries, comme une infection par *Mycobacterium bovis* ou *Mycobacterium tuberculosis*, en particulier *Mycobacterium tuberculosis*.

L'invention peut être fournie dans l'objectif de :

- la prophylaxie d'une tuberculose active due à une infection (c'est-à-dire, une tuberculose primaire) ou d'une réactivation (c'est-à-dire, une tuberculose

secondaire), comme par une administration au sujet qui est non infecté, ou en variante au sujet qui souffre d'une infection latente ;

5 - la prophylaxie d'une tuberculose latente, comme par une administration à un sujet qui est non infecté ;

- le traitement d'une tuberculose latente ;

10 - la prévention ou le retard de la réactivation d'une tuberculose, spécialement le retard de la réactivation, par exemple, d'une période de plusieurs mois, années ou indéfiniment ; ou

15 - le traitement d'une tuberculose active (comme pour réduire le besoin d'un traitement chimiothérapeutique ; comme la réduction du terme d'un traitement chimiothérapeutique, de la complexité d'un régime médicamenteux ou du dosage du traitement chimiothérapeutique ; en variante, pour réduire le risque d'une rechute ultérieure à la suite d'un traitement chimiothérapeutique).

20 La réponse immunitaire déclenchée peut être une réponse des lymphocytes T spécifiques de l'antigène (qui peut être une réponse systémique et/ou locale). Les réponses systémiques peuvent être détectées, par exemple, à partir d'un échantillon de sang total. Les réponses locales (par exemple, la réponse locale dans
25 le poumon) peuvent être détectées à partir d'un échantillon de tissu approprié (par exemple, du tissu pulmonaire) ou un autre procédé d'échantillonnage concentré localement (par exemple, un lavage bronchoalvéolaire). La réponse des lymphocytes T
30 spécifiques de l'antigène peut comprendre une réponse des lymphocytes T CD4+, comme une réponse impliquant

les lymphocytes T CD4+ exprimant une pluralité de cytokines (par exemple, l'IFN-gamma, le TNF-alpha ou l'IL-2, spécialement l'IFN-gamma, le TNF-alpha et l'IL-2). En variante, ou en outre, la réponse des lymphocytes T spécifiques de l'antigène comprend une réponse des lymphocytes T CD8+, comme une réponse impliquant les lymphocytes T CD8+ exprimant une pluralité de cytokines (par exemple, l'IFN-gamma, le TNF-alpha ou l'IL-2, spécialement l'IFN-gamma, le TNF-alpha et l'IL-2).

Le terme « infection active » se rapporte à une infection, par exemple une infection par *M. tuberculosis*, avec des symptômes manifestes de la maladie et/ou des lésions, de façon appropriée avec des symptômes manifestes de la maladie.

Les termes « infection inactive », « infection dormante » ou « infection latente » ou « tuberculose latente » se rapportent à une infection, par exemple une infection par *M. tuberculosis* sans symptômes manifestes de la maladie et/ou lésions, de façon appropriée sans symptômes manifestes de la maladie. Un sujet souffrant d'une infection latente sera un sujet dont le résultat de test est positif pour une infection, par exemple par le test cutané à la tuberculine (TCT) ou les tests de libération d'interféron gamma (TLIG), mais qui n'a pas démontré les symptômes de la maladie et/ou des lésions qui sont associés à une infection active.

Le terme « tuberculose primaire » se rapporte à une maladie clinique, par exemple, la manifestation des symptômes de la maladie, directement à la suite de

l'infection, par exemple une infection par *M. tuberculosis*. Voir, Harrison's Principles of Internal Medicine, chapitre 150, pp. 953-966 (16ème éd., Braunwald, et al., éd., 2005).

5 Les termes « tuberculose secondaire » ou « tuberculose post-primaire » se rapportent à la réactivation d'une infection dormante, inactive ou latente, par exemple une infection par *M. tuberculosis*. Voir, Harrison's Principles of Internal Medicine,
10 chapitre 150, pp. 953-966 (16ème éd., Braunwald, et al., éd., 2005).

Le terme « réactivation d'une tuberculose » se rapporte à la manifestation ultérieure des symptômes de la maladie chez un individu dont le résultat de test
15 est positif pour une infection (par exemple, par le test cutané à la tuberculine (TCT) ou les tests de libération d'interféron gamma (TLIG)) mais qui ne présente pas de symptômes apparents de la maladie. De façon appropriée, l'individu n'aura pas été réexposé à
20 une infection. Le test de diagnostic positif indique que l'individu est infecté, toutefois, l'individu peut avoir présenté ou pas auparavant des symptômes manifestes de la maladie active qui avait été traitée suffisamment pour conduire la tuberculose dans un état
25 inactif ou latent.

De façon appropriée, les procédés sont appliqués à un sujet qui est non infecté ou qui souffre d'une infection latente par des mycobactéries, comme une infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Dans un mode
30 de réalisation, les procédés sont appliqués à un sujet qui ne souffre pas d'une infection par *Mycobacterium*

tuberculosis (dans le contexte des sujets humains) ou *Mycobacterium bovis* (dans le contexte des sujets bovins). Dans un autre mode de réalisation, les procédés sont appliqués à un sujet qui souffre d'une
5 infection latente par des mycobactéries, telles que *Mycobacterium tuberculosis* (dans le contexte des sujets humains) ou *Mycobacterium bovis* (dans le contexte des sujets bovins).

Dans certains modes de réalisation, le sujet a été
10 vacciné auparavant par le BCG. Les approches de la présente invention peuvent, par exemple, être utilisées pour un sujet au moins un an après la vaccination par le BCG, par exemple au moins deux ans après la vaccination par le BCG comme au moins cinq ans après la
15 vaccination par le BCG.

Dans certains modes de réalisation, le sujet a été infecté auparavant par *M. tuberculosis*.

Antigènes d'utilisation dans l'invention

Les épitopes des lymphocytes T sont des séquences
20 contiguës courtes d'acides aminés qui sont reconnues par les lymphocytes T (par exemple, les lymphocytes T CD4+ ou CD8+). L'identification des épitopes des lymphocytes T peut être obtenue par des expériences de cartographie des épitopes qui sont connues de l'homme
25 du métier (voir, par exemple, Paul, *Fundamental Immunology*, 3ème éd., 243-247 (1993) ; Beißbarth et al. *Bioinformatics* 2005 21(Suppl. 1): i29-i37). Dans une population non consanguine diversifiée, telle que les êtres humains, les différents types HLA signifient que
30 des épitopes particuliers peuvent ne pas être reconnus par tous les membres de la population. Comme

conséquence de l'implication essentielle de la réponse de lymphocytes T dans la tuberculose, pour maximiser le taux de reconnaissance et l'échelle de la réponse immunitaire, un dérivé immunogène d'une séquence de référence est de façon souhaitable un dérivé qui contient la majorité (ou de façon appropriée la totalité) des épitopes des lymphocytes T intacts. Mortier et al. BMC Immunology 2015 16: 63 ont entrepris l'analyse de la conservation des séquences et des prédictions *in silico* des liaisons antigène-peptide dans des leucocytes humains pour les antigènes vaccinaux candidats contre la tuberculose Mtb72f et M72.

L'homme du métier comprendra que des substitutions, des délétions ou des additions individuelles dans une protéine qui modifient, ajoutent ou délètent un seul acide aminé ou un petit pourcentage des acides aminés est un « dérivé immunogène » où la modification ou les modifications entraînent la substitution d'un acide aminé par un acide aminé fonctionnellement similaire ou la substitution/délétion/addition de résidus qui n'ont sensiblement aucun impact sur la fonction immunogène.

Les tableaux de substitutions conservatives fournissant des acides aminés fonctionnellement similaires sont bien connus dans l'art. En général, de telles substitutions conservatives se situeront au sein de l'un des regroupements d'acides aminés spécifiés ci-dessous, bien que dans certaines circonstances d'autres substitutions puissent être possibles sans affecter sensiblement les propriétés immunogènes de l'antigène. Les huit groupes suivants contiennent chacun des acides

aminés qui sont généralement des substitutions conservatives à un autre :

- 1) alanine (A), glycine (G) ;
- 2) acide aspartique (D), acide glutamique (E) ;
- 5 3) asparagine (N), glutamine (Q) ;
- 4) arginine (R), lysine (K) ;
- 5) isoleucine (I), leucine (L), méthionine (M),
valine (V) ;
- 6) phénylalanine (F), tyrosine (Y), tryptophane
10 (W) ;
- 7) sérine (S), thréonine (T) ; et
- 8) cystéine (C), méthionine (M)

(voir, par exemple, Creighton, Proteins 1984).

De façon appropriée, ces substitutions ne
15 surviennent pas dans la région d'un épitope et, par
conséquent, n'ont pas un impact significatif sur les
propriétés immunogènes de l'antigène.

Les dérivés immunogènes peuvent également
comprendre ceux dans lesquels des acides aminés
20 supplémentaires sont insérés comparativement à la
séquence de référence. De façon appropriée, de telles
insertions ne surviennent pas dans la région d'un
épitope, et, par conséquent, n'ont pas un impact
significatif sur les propriétés immunogènes de
25 l'antigène. Un exemple d'insertions comprend une
séquence courte de résidus d'histidine (par exemple, 2
à 6 résidus) pour aider l'expression et/ou la
purification de l'antigène en question.

Les dérivés immunogènes comprennent ceux dans
30 lesquels des acides aminés ont été délétés
comparativement à la séquence de référence. De façon

appropriée, de telles délétions ne surviennent pas dans la région d'un épitope, et, par conséquent, n'ont pas un impact significatif sur les propriétés immunogènes de l'antigène.

5 L'homme du métier comprendra qu'un dérivé immunogène particulier peut comprendre des substitutions, des délétions et des additions (ou l'une quelconque de leurs combinaisons).

10 Les termes « identique » ou pourcentage « d'identité », dans le contexte de deux séquences polypeptidiques ou plus, se rapportent à deux séquences ou sous-séquences ou plus qui sont les mêmes ou qui présentent un pourcentage spécifié de résidus d'acides aminés qui sont les mêmes (c'est-à-dire, 70 %
15 d'identité, éventuellement 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % d'identité sur une région spécifiée), lorsqu'elles sont comparées et alignées pour une correspondance maximale sur une fenêtre de comparaison, ou une région désignée mesurée en utilisant l'un des
20 algorithmes de comparaison de séquences suivants ou par un alignement manuel et un examen visuel. Cette définition se rapporte également au complémentaire d'une séquence à tester. Eventuellement, l'identité existe sur une région qui a une longueur d'au moins
25 200 acides aminés, comme au moins 300 acides aminés ou au moins 400 acides aminés. De façon appropriée, la comparaison est effectuée sur une fenêtre correspondant à la longueur entière de la séquence de référence (par opposition à la séquence du dérivé).

30 Pour la comparaison de séquences, une séquence agit comme la séquence de référence, à laquelle les

séquences à tester sont comparées. Lorsque l'on utilise un algorithme de comparaison de séquences, les séquences à tester et de référence sont entrées dans un ordinateur, les coordonnées des sous-séquences sont désignées, si nécessaire, et les paramètres du programme de l'algorithme des séquences sont désignés. Les paramètres par défaut du programme peuvent être utilisés, ou des paramètres alternatifs peuvent être désignés. L'algorithme de comparaison de séquences calcule ensuite les pourcentages d'identité de séquence pour les séquences à tester par rapport à la séquence de référence, en se basant sur les paramètres du programme.

Une « fenêtre de comparaison », tel qu'utilisé ici, se rapporte à un segment dans lequel une séquence peut être comparée à une séquence de référence du même nombre de positions consécutives après que les deux séquences sont alignées de façon optimale. Les procédés d'alignement de séquences pour une comparaison sont bien connus dans l'art. L'alignement optimal de séquences pour une comparaison peut être conduit, par exemple, par l'algorithme d'homologie locale de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), par l'algorithme d'alignement des homologies de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), dans la recherche pour le procédé de similarité de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), par des mises en œuvre informatisées de ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA, et TFASTA dans le progiciel de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou par un alignement manuel et un examen

visuel (voir, par exemple, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., éd. supplément de 1995)).

Un exemple d'un algorithme utile est PILEUP.
5 PILEUP crée un alignement de séquences multiples à partir d'un groupe de séquences apparentées en utilisant des alignements progressifs par paires pour montrer la relation et le pourcentage d'identité des séquences. Il trace également un arbre ou dendrogramme
10 montrant les relations des regroupements utilisés pour créer l'alignement. PILEUP utilise une simplification du procédé d'alignement progressif de Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351-360 (1987). Le procédé utilisé est similaire au procédé décrit par Higgins & Sharp,
15 CABIOS 5: 151-153 (1989). Le programme peut aligner jusqu'à 300 séquences, chacune d'une longueur maximale de 5000 nucléotides ou acides aminés. La procédure des alignements multiples débute par l'alignement par paires des deux séquences les plus similaires,
20 produisant un groupe de deux séquences alignées. Ce groupe est ensuite aligné avec la séquence suivante la plus apparentée ou à un groupe de séquences alignées. Deux groupes de séquences sont alignés par une simple extension de l'alignement par paires de deux séquences
25 individuelles. L'alignement final est obtenu par une série d'alignements progressifs par paires. Le programme est exécuté en désignant des séquences spécifiques et leurs coordonnées d'acides aminés pour des régions de comparaison de séquences et en désignant
30 les paramètres du programme. En utilisant PILEUP, une séquence de référence est comparée à d'autres séquences

à tester pour déterminer la relation du pourcentage d'identité de séquence en utilisant les paramètres suivants : poids de la brèche par défaut (3,00), poids de la longueur de la brèche par défaut (0,10), et
5 brèches terminales pondérées. PILEUP peut être obtenu à partir du progiciel d'analyse de séquences de GCG, par exemple, version 7.0 (Devereaux et al., Nuc. Acids Res. 12: 387-395 (1984)).

Un autre exemple d'algorithme qui est approprié
10 pour la détermination du pourcentage d'identité de séquence et de similarité de séquence consiste en les algorithmes BLAST et BLAST 2.0, qui sont décrits dans Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977) et Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990),
15 respectivement. Le logiciel pour effectuer les analyses BLAST est disponible au public par l'intermédiaire du National Center for Biotechnology Information (site Web à www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cet algorithme implique d'abord l'identification des paires de séquences de
20 score élevé (HSP) en identifiant des mots courts de longueur W dans la séquence de requête, qui soit correspondent soit satisfont un certain score seuil de valeur positive T lorsqu'ils sont alignés avec un mot de la même longueur dans une séquence de la base de
25 données. T est appelé seuil du score des mots du voisinage (Altschul et al., ci-dessus). Ces correspondances des mots du voisinage agissent comme des graines pour initier des recherches afin de trouver des HSP plus longues les contenant. Les correspondances
30 des mots sont étendues dans les deux directions le long de chaque séquence tant qu'il est possible d'augmenter

le score d'alignement cumulatif. Les scores cumulatifs sont calculés en utilisant, pour les séquences nucléotidiques, les paramètres M (score de récompense pour une paire de résidus correspondants ; toujours > 0) et N (score de pénalité pour les résidus ne correspondant pas ; toujours < 0). Pour les séquences d'acides aminés, une matrice de score est utilisée pour calculer le score cumulatif. L'extension des correspondances des mots dans chaque direction est stoppée lorsque : le score de l'alignement cumulatif baisse de la quantité X à partir de sa valeur maximale obtenue ; le score cumulatif atteint zéro ou en dessous, à cause de l'accumulation d'un ou de plusieurs alignements de résidus de score négatif ; ou l'extrémité de l'une ou l'autre séquence est atteint. Les paramètres de l'algorithme BLAST W, T, et X déterminent la sensibilité et la rapidité de l'alignement. Le programme BLATN (pour les séquences nucléotidiques) utilise comme paramètres par défaut une longueur de mot (W) de 11, une espérance (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ et une comparaison des deux brins. Pour les séquences d'acides aminés, le programme BLASTP utilise comme paramètres par défaut une longueur de mot de 3, et une espérance (E) de 10, et la matrice de score BLOSUM62 (voir Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)) des alignements (B) de 50, une espérance (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, et une comparaison des deux brins.

L'algorithme BLAST effectue également une analyse statistique de la similarité entre deux séquences (voir, par exemple, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci.

USA 90: 5873-5787 (1993)). Une mesure de similarité fournie par l'algorithme BLAST est la somme des probabilités la plus basse ($P(N)$), qui fournit une indication de la probabilité selon laquelle une correspondance entre deux séquences nucléotidiques ou d'acides aminés est due au hasard. Par exemple, un acide nucléique est considéré comme similaire à une séquence de référence si la somme des probabilités la plus basse dans une comparaison de l'acide nucléique à tester à l'acide nucléique de référence est inférieure à environ 0,2, de façon davantage préférée inférieure à environ 0,01, et de façon préférée entre toutes inférieures à environ 0,001.

Dans tous les cas, les dérivés immunogènes d'une séquence polypeptidique utiliseront habituellement essentiellement la même activité que la séquence de référence. Par essentiellement la même activité, il est signifié au moins 50 %, de façon appropriée au moins 75 % et spécialement au moins 90 % de l'activité de la séquence de référence dans un test de restimulation *in vitro* de CMSP, de sang total, de tissu pulmonaire ou de lavage bronchoalvéolaire avec des antigènes spécifiques (par exemple, une restimulation pendant une période située entre plusieurs heures à jusqu'à deux semaines, comme jusqu'à un jour, 1 jour à 1 semaine ou 1 à 2 semaines) qui mesure l'activation des cellules par lymphoprolifération, production de cytokines dans le surnageant de culture (mesurées par des tests ELISA, CBA, etc.) ou caractérisation des réponses des lymphocytes T et B par coloration intra- et extracellulaire (par exemple, en utilisant des

anticorps spécifiques de marqueurs immunitaires, tels que CD3, CD4, CD8, l'IL-2, le TNF-alpha, l'IFN-gamma, l'IL-17, CD40L, CD69, etc.) suivie de l'analyse par un cytomètre en flux. De façon appropriée, par
5 essentiellement la même activité, il est signifié au moins 50 %, de façon appropriée au moins 75 % et spécialement au moins 90 % de l'activité de la séquence de référence dans un test de prolifération des lymphocytes T et/ou de production d'IFN-gamma.

10 Dans un mode de réalisation, l'antigène polypeptidique et l'antigène codé sont des antigènes apparentés à Rv1196. Le terme « antigène apparenté à Rv1196 » se rapporte à la protéine Rv1196 fournie par SEQ ID NO : 1 ou à l'un de ses dérivés immunogènes. Tel
15 qu'utilisé ici, le terme « dérivé » se rapporte à un antigène qui est modifié par rapport à la séquence de référence. Les dérivés immunogènes sont suffisamment similaires à la séquence de référence pour conserver sensiblement les propriétés immunogènes que la séquence
20 de référence et demeurer capables de permettre le soulèvement d'une réponse immunitaire contre la séquence de référence. Un dérivé immunogène peut comprendre, par exemple, une version modifiée de la séquence de référence ou en variante, il peut être
25 constitué d'une version modifiée de la séquence de référence.

L'antigène apparenté à Rv1196 peut contenir, par exemple, 2500 résidus d'acides aminés ou moins, comme 1500 résidus d'acides aminés ou moins, en particulier
30 1200 résidus d'acides aminés ou moins, spécialement

1000 résidus d'acides aminés ou moins, généralement 800 résidus d'acides aminés ou moins.

De façon appropriée, l'antigène apparenté à Rv1196 comprendra, comme sera constitué de, une séquence
5 présentant au moins 70 % d'identité avec SEQ ID NO : 1, comme au moins 80 %, en particulier au moins 90 %, spécialement au moins 95 %, par exemple au moins 98 %, comme au moins 99 %.

Un exemple spécifique d'un antigène apparenté à
10 Rv1196 est Rv1196 issu de la souche de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, tel que fourni par SEQ ID NO : 1. Par conséquent, dans un mode de réalisation de l'invention, l'antigène apparenté à Rv1196 est une protéine comprenant SEQ ID NO : 1. Dans un second mode
15 de réalisation de l'invention, l'antigène apparenté à Rv1196 est une protéine constituée de SEQ ID NO : 1.

Un autre exemple d'un antigène apparenté à Rv1196 est Rv1196 issu de la souche de *Mycobacterium tuberculosis* F11. Dans un mode de réalisation de
20 l'invention, l'antigène apparenté à Rv1196 est une protéine comprenant SEQ ID NO : 2. Dans un second mode de réalisation de l'invention, l'antigène apparenté à Rv1196 est une protéine constituée de SEQ ID NO : 2.

Les antigènes apparentés à Rv1196 types
25 comprendront (comme seront constitués de) un dérivé immunogène de SEQ ID NO : 1 présentant un petit nombre de délétions, d'insertions et/ou de substitutions. Des exemples sont ceux présentant des délétions de jusqu'à 5 résidus au niveau de 0 à 5 emplacements, des
30 insertions de jusqu'à 5 résidus au niveau de 0 à

5 emplacements et une substitution de jusqu'à 20 résidus.

D'autres dérivés immunogènes de Rv1196 sont ceux comprenant (comme constitués de) un fragment de
5 SEQ ID NO : 1 qui a une longueur d'au moins 200 acides aminés, comme une longueur d'au moins 250 acides aminés, en particulier une longueur d'au moins 300 acides aminés, spécialement une longueur d'au moins 350 acides aminés.

10 D'autres dérivés immunogènes de Rv1196 sont ceux comprenant, comme constitués de, un fragment de SEQ ID NO : 2 qui a une longueur d'au moins 200 acides aminés, comme une longueur d'au moins 250 acides aminés, en particulier une longueur d'au moins 300 acides
15 aminés, spécialement une longueur d'au moins 350 acides aminés.

Les antigènes apparentés à Rv1196 peuvent être préparés par des procédés décrits auparavant (par exemple, Dillon et al. Infection and Immunity 1999
20 67(6): 2941-2950 ; WO 2006/117240), ceux fournis dans les exemples, ou des procédés qui y sont analogues.

Dans un mode de réalisation, l'antigène polypeptidique et l'antigène codé sont des antigènes apparentés à Rv0125. Le terme « antigène apparenté à
25 Rv0125 » se rapporte à la protéine Rv0125 fournie par SEQ ID NO : 3 ou à l'un de ses dérivés immunogènes. Tel qu'utilisé ici, le terme « dérivé » se rapporte à un antigène qui est modifié par rapport à la séquence de référence. Les dérivés immunogènes sont suffisamment
30 similaires à la séquence de référence pour conserver sensiblement les propriétés immunogènes que la séquence

de référence et demeurer capables de permettre le soulèvement d'une réponse immunitaire contre la séquence de référence. Un dérivé immunogène peut comprendre, par exemple, une version modifiée de la séquence de référence ou en variante, il peut être
5 constitué d'une version modifiée de la séquence de référence.

L'antigène apparenté à Rv0125 peut contenir, par exemple, 2500 résidus d'acides aminés ou moins, comme
10 1500 résidus d'acides aminés ou moins, en particulier 1200 résidus d'acides aminés ou moins, spécialement 1000 résidus d'acides aminés ou moins, généralement 800 résidus d'acides aminés ou moins.

De façon appropriée, l'antigène apparenté à Rv0125
15 comprendra, comme sera constitué de, une séquence présentant au moins 70 % d'identité avec SEQ ID NO : 1, comme au moins 80 %, en particulier au moins 90 %, spécialement au moins 95 %, par exemple au moins 98 %, comme au moins 99 %.

Un exemple spécifique d'un antigène apparenté à Rv0125 est Rv0125 issu de la souche de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, tel que fourni par SEQ ID NO : 3. Par conséquent, dans un mode de réalisation de l'invention, l'antigène apparenté à Rv0125 est une
20 protéine comprenant SEQ ID NO : 3. Dans un second mode de réalisation de l'invention, l'antigène apparenté à Rv0125 est une protéine constituée de SEQ ID NO : 3.
25

Les antigènes apparentés à Rv0125 types comprendront (comme seront constitués de) un dérivé
30 immunogène de SEQ ID NO : 3 présentant un petit nombre de délétions, d'insertions et/ou de substitutions. Des

exemples sont ceux présentant des délétions de jusqu'à 5 résidus au niveau de 0 à 5 emplacements, des insertions de jusqu'à 5 résidus au niveau de 0 à 5 emplacements et une substitution de jusqu'à 5 20 résidus.

D'autres dérivés immunogènes de Rv0125 sont ceux comprenant (comme constitués de) un fragment de SEQ ID NO : 3 qui a une longueur d'au moins 150 acides aminés, comme une longueur d'au moins 200 acides aminés, 10 en particulier une longueur d'au moins 250 acides aminés, spécialement une longueur d'au moins 300 acides aminés. Des dérivés immunogènes particuliers de Rv0125 sont ceux comprenant (comme constitués de) le fragment de SEQ ID NO : 3 correspondant aux résidus 1 à 195 de 15 SEQ ID NO : 3. D'autres dérivés immunogènes de Rv0125 sont ceux comprenant (comme constitués de) le fragment de SEQ ID NO : 3 correspondant aux résidus 192 à 323 de SEQ ID NO : 3.

Des antigènes apparentés à Rv0125 particulièrement 20 préférés sont des dérivés de SEQ ID NO : 3 dans lesquels au moins l'un (par exemple un, deux, voire même les trois) de la triade catalytique a été substitué ou délété, de telle façon que l'activité protéase a été réduite et la protéine plus facilement 25 produite - le résidu de sérine catalytique peut être délété ou substitué (par exemple, substitué par l'alanine) et/ou le résidu d'histidine catalytique peut être délété ou substitué et/ou le résidu d'acide aspartique catalytique peut être délété ou substitué. 30 Sont d'un intérêt spécial, les dérivés de SEQ ID NO : 3 dans lesquels le résidu de sérine catalytique a été

substitué (par exemple, substitué par l'alanine). Sont également d'un intérêt, les antigènes apparentés à Rv0125 qui comprennent, comme sont constitués de, une séquence présentant au moins 70 % d'identité avec
5 SEQ ID NO : 3, comme au moins 80 %, en particulier au moins 90 %, spécialement au moins 95 %, par exemple au moins 98 %, comme au moins 99 % et dans lesquels au moins l'un de la triade catalytique a été substitué ou délété ou ceux comprenant, comme constitués de, un
10 fragment de SEQ ID NO : 3 qui a une longueur d'au moins 150 acides aminés, comme une longueur d'au moins 200 acides aminés, en particulier une longueur d'au moins 250 acides aminés, spécialement une longueur d'au moins 300 acides aminés et dans lesquels au moins l'un
15 de la triade catalytique a été substitué ou délété. D'autres dérivés immunogènes de Rv0125 sont ceux comprenant (comme constitués de) le fragment de SEQ ID NO : 3 correspondant aux résidus 192 à 323 de SEQ ID NO : 3 dans lequel au moins l'un (par exemple,
20 un, deux, voire même les trois) de la triade catalytique a été substitué ou délété. Des dérivés immunogènes particuliers de Rv0125 sont ceux comprenant (comme constitués de) le fragment de SEQ ID NO : 3 correspondant aux résidus 1 à 195 de SEQ ID NO : 3 dans
25 lequel le résidu de sérine catalytique (position 176 de SEQ ID NO : 3) a été substitué (par exemple, substitué par l'alanine).

Dans certains modes de réalisation, l'antigène polypeptidique et l'antigène codé sont des antigènes
30 apparentés à Rv1196 et Rv0125, tels que des antigènes apparentés au M72. Des dérivés particuliers de la

protéine M72 comprennent ceux avec des résidus His supplémentaires à l'extrémité N-terminale (par exemple, deux résidus His, comme fournis dans SEQ ID NO : 4 ; ou un marqueur polyhistidine de cinq ou particulièrement de six résidus His, qui peut être utilisé pour la purification par affinité au nickel). Mtb72f qui contient le résidu de sérine d'origine qui a été muté dans M72, est un autre dérivé de M72, comme le sont les protéines Mtb72f avec des résidus His supplémentaires à l'extrémité N-terminale (par exemple, deux résidus His ; ou un marqueur polyhistidine de cinq ou particulièrement de six résidus His, qui peut être utilisé pour une purification par affinité au nickel).

Néanmoins, l'homme du métier comprend que dans certains modes de réalisation, deux polypeptides distincts, un étant un antigène apparenté à Rv1196 et un étant un antigène apparenté à Rv0125, peuvent être fournis au sein d'une composition. Dans de tels cas, il faudra comprendre que les exclusions indiquées auparavant en ce qui concerne des adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv1196 et des adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv0125 peuvent être toutes les deux appliquées à la composition *mutatis mutandis*. De la même façon, les exclusions indiquées auparavant en ce qui concerne l'administration simultanée d'adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv1196 et d'adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv0125 peuvent être toutes les deux appliquées *mutatis mutandis*.

De même dans certains modes de réalisation, un seul adénovirus peut coder pour deux polypeptides

distincts, un étant un antigène apparenté à Rv1196 et un étant un antigène apparenté à Rv0125. Dans de tels cas, il faudra comprendre que les exclusions indiquées auparavant en ce qui concerne un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 peuvent être toutes les deux appliquées à la composition *mutatis mutandis*. De la même façon, les exclusions indiquées auparavant en ce qui concerne l'administration simultanée d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 peuvent être toutes les deux appliquées *mutatis mutandis*.

En variante, deux constructions adénovirales distinctes peuvent être fournies, une codant pour un antigène apparenté à Rv1196 et une codant pour un antigène apparenté à Rv0125. Dans de tels cas, il faudra comprendre que les exclusions indiquées auparavant en ce qui concerne un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 peuvent être toutes les deux appliquées à la composition *mutatis mutandis*. De la même façon, les exclusions indiquées auparavant en ce qui concerne l'administration simultanée d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 peuvent être toutes les deux appliquées *mutatis mutandis*.

De façon appropriée, un antigène apparenté au M72 comprendra, comme sera constitué de, une séquence présentant au moins 70 % d'identité avec SEQ ID NO : 6, comme au moins 80 %, en particulier au moins 90 %,

spécialement au moins 95 %, comme au moins 98 %, par exemple au moins 99 %.

Les antigènes apparentés au M72 types comprendront, comme seront constitués de, un dérivé de SEQ ID NO : 6
5 comportant un petit nombre de délétions, d'insertions et/ou de substitutions. Les exemples sont ceux comportant des délétions de jusqu'à 5 résidus au niveau de 0 à 5 emplacements, des insertions de jusqu'à 5 résidus au niveau de 0 à 5 emplacements et une
10 substitution de jusqu'à 20 résidus.

D'autres dérivés de M72 sont ceux comprenant, comme constitués de, un fragment de SEQ ID NO : 6 qui a une longueur d'au moins 450 acides aminés, comme une longueur d'au moins 500 acides aminés, comme une
15 longueur d'au moins 550 acides aminés, comme une longueur d'au moins 600 acides aminés, comme une longueur d'au moins 650 acides aminés ou une longueur d'au moins 700 acides aminés. Parce que M72 est une protéine de fusion dérivée de deux antigènes
20 individuels, tout fragment d'au moins 450 résidus comprendra une pluralité d'épitopes provenant de la séquence pleine longueur (Skeiky et al. J. Immunol. 2004 172: 7618-7628 ; Skeiky Infect. Immun. 1999 67(8): 3998-4007 ; Dillon Infect. Immun. 1999 67(6): 2941-
25 2950).

Dans des modes de réalisation particuliers, l'antigène apparenté au M72 comprendra les résidus 2 à 723 de SEQ ID NO : 6, par exemple comprendra (ou sera constitué de) SEQ ID NO : 6.

Dans un mode de réalisation, l'antigène polypeptidique correspond à SEQ ID NO : 4 et l'antigène codé à SEQ ID NO : 6.

5 Les antigènes apparentés au M72 peuvent être préparés par des procédés décrits auparavant (WO 2006/117240) ou des procédés qui y sont analogues.

L'antigène polypeptidique peut être le même que ou peut être similaire à l'antigène codé. Dans un mode de réalisation, l'antigène polypeptidique est le même que
10 l'antigène codé.

De façon appropriée, l'antigène polypeptidique est similaire à l'antigène codé. Par exemple, l'antigène codé peut présenter 70 % d'identité, comme au moins 80 % d'identité, de façon appropriée au moins 90 %
15 d'identité, en particulier au moins 95 % d'identité avec l'antigène polypeptidique. En variante, l'antigène codé peut comprendre un fragment d'au moins 100 résidus d'acides aminés, comme au moins 200 résidus d'acides aminés, de façon appropriée au moins 300 résidus
20 d'acides aminés de l'antigène polypeptidique. Dans certains cas, l'antigène codé comprend un fragment d'au moins 400 résidus d'acides aminés, en particulier 500 résidus d'acides aminés, comme au moins 600 et de façon appropriée au moins 700 résidus de l'antigène
25 mycobactérien polypeptidique.

L'antigène polypeptidique et l'adénovirus peuvent être fournis sous la forme de compositions immunogènes qui comprennent un ou plusieurs autres composants antigéniques.

30 Les composants antigéniques supplémentaires peuvent être prévus pour renforcer ou compléter les

réponses immunitaires sollicitées dans le domaine de la
prévention et du traitement de la tuberculose ou des
antigènes supplémentaires pourront être associés à
d'autres agents pathogènes et sont prévus pour une
5 coadministration pour des raisons de commodité.
Lorsqu'un certain nombre de composants antigéniques
sont présents au sein d'une composition, ceux-ci
peuvent être fournis sous la forme de polypeptides
individuels ou de protéines de fusion. Dans certains
10 cas, les composants antigéniques supplémentaires
peuvent être fournis sous la forme d'un polynucléotide
(ou de polynucléotides) codant pour un ou plusieurs
polypeptides.

Généralement, pour une administration à des êtres
15 humains, les compositions contenant un antigène
polypeptidique apparenté à Rv1196 comprendront entre
1 µg et 100 µg d'antigène apparenté à Rv1196, comme
entre 1 µg et 50 µg par dose. De façon appropriée,
entre 1 µg et 50 µg d'antigène apparenté à Rv1196
20 (comme entre 5 µg et 50 µg), spécialement entre 1 µg et
20 µg (comme entre 5 µg et 20 µg) et en particulier
autour de ou exactement 10 µg sont fournis.

Généralement, pour une administration à des êtres
humains, des compositions contenant un antigène
25 polypeptidique apparenté à Rv0125 comprendront entre
1 µg et 100 µg d'antigène apparenté à Rv0125, comme
entre 1 µg et 50 µg par dose. De façon appropriée,
entre 1 µg et 50 µg d'antigène apparenté à Rv0125
(comme entre 5 µg et 50 µg), spécialement entre 1 µg et
30 20 µg (comme entre 5 µg et 20 µg) et en particulier
autour de ou exactement 10 µg sont fournis.

Généralement, pour une administration à des êtres humains, des compositions contenant un antigène apparenté au polypeptide M72 comprendront entre 1 µg et 100 µg d'antigène apparenté au M72, comme entre 1 µg et 50 µg par dose. De façon appropriée, entre 1 µg et 50 µg d'antigène apparenté au M72 (comme entre 5 µg et 50 µg), spécialement entre 1 µg et 20 µg (comme entre 5 µg et 20 µg) et en particulier autour de ou exactement 10 µg sont fournis.

10 Généralement, un polypeptide d'utilisation dans l'invention (si trouvé dans la nature) sera un polypeptide isolé (c'est-à-dire, séparé de ces composants avec lesquels il peut être trouvé habituellement). Par exemple, une protéine existant à l'état naturel est isolée si elle est séparée de
15 certains ou de la totalité des matériaux coexistants dans le système naturel. De préférence, de tels polypeptides sont au moins purs à environ 90 %, de façon davantage préférée au moins purs à environ 95 % et de façon préférée entre toutes au moins purs à
20 environ 99 %. Un polynucléotide est considéré comme étant isolé si, par exemple, il est cloné dans un vecteur qui ne fait pas partie de l'environnement naturel.

25 Adjuvants d'utilisation dans l'invention

Comme il a été décrit ci-dessus, dans un aspect de l'invention, l'antigène polypeptidique est fourni dans une composition immunogène qui comprend un adjuvant. De façon appropriée, l'adjuvant comprend un agoniste des
30 TLR et/ou une saponine immunologiquement active.

Dans certains modes de réalisation, l'adjuvant peut comprendre de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium.

Ainsi, dans un mode de réalisation, l'adjuvant
5 comprend un agoniste des TLR. Dans un autre mode de réalisation, l'adjuvant comprend une saponine immunologiquement active. Dans encore un autre mode de réalisation, l'adjuvant comprend un agoniste des TLR et une saponine immunologiquement active.

10 L'adjuvant peut comprendre un agoniste des TLR et une saponine dans une formulation liposomique. Le rapport de l'agoniste des TLR sur la saponine peut se situer entre 5/1 et 1/5 (p/p), de façon appropriée entre 2/1 et 1/2, généralement autour de 1/1.

15 L'utilisation d'agonistes des TLR dans des adjuvants est bien connue dans l'art et a été décrite, par exemple, par Lahiri et al. (2008) Vaccine 26: 6777. Les TLR qui peuvent être stimulés pour obtenir un effet d'adjuvant comprennent les agonistes des TLR2, TLR4,
20 TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9. Les agonistes des TLR2, TLR4, TLR7 et TLR8, particulièrement les agonistes du TLR4 sont préférés.

Les agonistes appropriés du TLR4 comprennent des lipopolysaccharides, tels que le monophosphoryl-
25 lipide A (MPL) et le monophosphoryl-lipide A 3-O-désacylé (3D-MPL). Le brevet US 4 436 727 divulgue le MPL et sa fabrication. Le brevet US 4 912 094 et le certificat de réexamen B1 4 912 094 divulgue le 3D-MPL et un procédé pour sa fabrication. Un autre agoniste du
30 TLR4 est l'adjuvant glucopyranosyl-lipide A (GLA), une molécule synthétique de type lipide A (voir, par

exemple, Fox et al. (2012) Clin. Vaccine Immunol 19: 1633). Dans un autre mode de réalisation, l'agoniste du TLR4 peut être un agoniste synthétique du TLR4 comme une molécule synthétique de disaccharide, similaire en structure au MPL et au 3D-MPL ou ce peut être des molécules synthétiques de monosaccharides, comme les composés aminoalkyl-glucosaminide phosphate (AGP) divulgués dans, par exemple, les documents WO 9850399, WO 0134617, WO 0212258, WO 3065806, WO 04062599, WO 06016997, WO 0612425, WO 03066065, et WO 0190129. De telles molécules ont été également décrites dans la littérature scientifique et des brevets comme des mimétiques du lipide A. Les mimétiques du lipide A partagent une certaine activité fonctionnelle et/ou structurale avec le lipide A, et dans un aspect, ils sont reconnus par les récepteurs TLR4. Les AGP tels que décrits ici sont parfois appelés mimétiques du lipide A dans l'art. Dans un mode de réalisation préféré, l'agoniste du TLR4 est le 3D-MPL. Des agonistes du TLR4, tels que le monophosphoryl-lipide A 3-O-désacylé (3D-MPL), et leur utilisation en tant qu'adjuvants dans des vaccins ont été décrits, par exemple, dans les documents WO 96/33739 et WO 2007/068907 et décrits dans Alving et al. (2012) Curr Opin Immunol 24: 310.

L'adjuvant peut comprendre une saponine immunologiquement active, telle qu'une fraction de saponine immunologiquement active, comme le QS21.

Des adjuvants comprenant des saponines ont été décrits dans l'art. Des saponines ont été décrites dans : Lacaille-Dubois and Wagner (1996) A review of the biological and pharmacological activities of

saponins. *Phytomedicine* vol 2: 363. Les saponines sont connues en tant qu'adjuvants dans des vaccins. Par exemple, Quil A (dérivé de l'écorce de l'arbre d'Amérique du Sud *Quillaja Saponaria* Molina), a été décrit par Dalsgaard et al. en 1974 ("Saponin adjuvants", *Archiv. fur die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, 243) comme possédant une activité d'adjuvant. Il a été isolé par CLHP des fractions purifiées de Quil A qui conservent l'activité d'adjuvant sans la toxicité associée au Quil A (Kensil et al. (1991) *J. Immunol.* 146: 431. Des fractions du Quil A sont également décrites dans le brevet US 5 057 540 et dans "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55.

Deux de ces fractions, appropriées pour une utilisation dans la présente invention, sont QS7 et QS21 (également connues sous le nom de QA-7 et QA-21). QS21 est une fraction de saponine immunologiquement active préférée pour une utilisation dans la présente invention. QS21 a été décrit par Kensil (2000) dans O'Hagan: *Vaccine Adjuvants: preparation methods and research protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, chapitre 15. Des systèmes adjuvants particuliers comprenant des fractions du Quil A, comme QS21 et QS7, sont décrits, par exemple, dans les documents WO 96/33739, WO 96/11711 et WO 2007/068907.

En plus des autres composants, l'adjuvant comprend de préférence un stérol. La présence d'un stérol peut réduire en outre la réactogénicité des compositions comprenant des saponines, voir, par exemple, le

document EP 0 822 831. Les stérol appropriés comprennent le bêta-sitostérol, le stigmastérol, l'ergostérol, l'ergocalciférol et le cholestérol. Le cholestérol est particulièrement approprié. De façon appropriée, la fraction de saponine immunologiquement active est le QS21 et le rapport QS21/stérol est de 1/100 à 1/1 p/p, comme de 1/10 to 1/1 p/p, par exemple de 1/5 à 1/1 p/p.

Dans un mode de réalisation préféré des procédés de l'invention, l'agoniste du TLR4 est le 3D-MPL et la saponine immunologiquement active est le QS21.

Dans certains modes de réalisation, l'adjuvant se présente sous la forme d'une émulsion huile dans l'eau, par exemple, comprenant du squalène, de l'alpha-tocophérol et un tensioactif (voir, par exemple, WO 95/17210) ou sous la forme d'un liposome. Une présentation liposomique est préférée.

Le terme « liposome » lorsqu'il est utilisé ici se rapporte à des structures lipidiques uni- ou multilamellaires (particulièrement, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 lamellaires selon le nombre de membranes lipidiques formées) renfermant un intérieur aqueux. Les liposomes et les formulations liposomiques sont bien connus dans l'art. Des présentations liposomiques sont décrites, par exemple, dans les documents WO 96/33739 et WO 2007/068907. Les lipides qui sont capables de former des liposomes comprennent toutes les substances dotées de propriétés grasses ou de type gras. Les lipides qui peuvent constituer les lipides dans les liposomes peuvent être choisis dans le groupe comprenant des glycérides, des glycérophospholipides,

des glycérophosphinolipides, des glycérophosphonolipides, des sulfolipides, des sphingolipides, des phospholipides, des isoprénoïdes, des stéroïdes, des stéarines, des stérols, des archéolipides, des lipides cationiques de synthèse et des glucides contenant des lipides. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les liposomes comprennent un phospholipide. Les phospholipides appropriés comprennent (mais n'y sont pas limités) : la phosphocholine (PC) qui est un intermédiaire dans la synthèse de la phosphatidylcholine ; des dérivés phospholipidiques naturels : la phosphocholine de l'œuf, la phosphocholine hydrogénée de l'œuf, la phosphocholine du soja, la phosphocholine hydrogénée du soja, la sphingomyéline en tant que phospholipides naturels ; et des dérivés phospholipidiques synthétiques : la phosphocholine (didécanoyl-L- α -phosphatidylcholine [DDPC], la dilauroylphosphatidylcholine [DLPC], la dimyristoylphosphatidylcholine [DMPC], la dipalmitoyl-phosphatidylcholine [DPPC], la distéaroylphosphatidyl-choline [DSPC], la dioléoyl-phosphatidylcholine [DOPC], la 1-palmitoyl, 2-oléoylphosphatidylcholine [POPC], la diélaïdoyl-phosphatidylcholine [DEPC]), le phosphoglycérol (1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [DMPG], 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [DPPG], 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [DSPG], 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [POPG]), l'acide phosphatidique (acide 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphatidique [DMPA], acide dipalmitoyl-phosphatidique [DPPA], acide distéaroyl-phosphatidique

[DSPA]), la phosphoéthanolamine (1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DMPE], 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DPPE], 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DSPE], 5 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DOPE]), la phosphosérine, le polyéthylène glycol [PEG] phospholipide.

La taille des liposomes varie de 30 nm à plusieurs μ m selon la composition phospholipidique et le procédé utilisé pour leur préparation. Dans des 10 modes de réalisation particuliers de l'invention, la taille des liposomes sera située dans la plage de 50 nm à 500 nm et dans d'autres modes de réalisation, de 50 nm à 200 nm. La diffusion dynamique de la lumière au 15 laser est un procédé utilisé pour mesurer la taille des liposomes, bien connu de l'homme du métier.

Dans un mode de réalisation particulièrement approprié, les liposomes utilisés dans l'invention comprennent de la DOPC et un stérol, en particulier le 20 cholestérol. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, les compositions de l'invention comprennent du QS21 dans une quantité quelconque décrit ici sous la forme d'un liposome, où ledit liposome comprend de la DOPC et un stérol, en particulier le 25 cholestérol.

De préférence, l'adjuvant comprend du 3D-MPL et du QS21 dans une formulation liposomique.

L'adjuvant peut comprendre 1 à 100 microgrammes d'agoniste du TLR4 par dose.

30 L'adjuvant peut comprendre 1 à 100 microgrammes de saponine immunologiquement active par dose.

Dans un mode de réalisation pour une utilisation chez l'être humain, l'adjuvant comprend entre 12,5 et 75 microgrammes de 3D-MPL, et entre 12,5 et 75 microgrammes de QS21 par dose dans une formulation liposomique.

Dans un autre mode de réalisation, l'adjuvant comprend entre 12,5 et 37,5, comme entre 20 et 30 microgrammes (par exemple environ ou exactement 25 microgrammes) de 3D-MPL et entre 12,5 et 37,5, comme entre 20 et 30 microgrammes (par exemple environ ou exactement 25 microgrammes) de QS21 dans une formulation liposomique par dose. De façon appropriée, la quantité de 3D-MPL est la même que la quantité de QS21.

Le polypeptide ou l'adénovirus se présentera sous une forme pharmaceutiquement acceptable, appropriée pour la voie d'administration prévue. Les solutions présenteront une osmolalité pharmaceutiquement acceptable pour éviter la distorsion ou la lyse des cellules. Une osmolalité pharmaceutiquement acceptable signifiera généralement que les solutions présenteront une osmolalité qui est approximativement isotonique ou légèrement hypertonique. De façon appropriée, les compositions immunogènes de la présente invention présenteront une osmolalité située dans la plage de 250 à 750 mOsm/kg, par exemple, l'osmolalité peut se situer dans la plage de 250 à 550 mOsm/kg, comme dans la plage de 280 à 500 mOsm/kg. L'osmolalité peut être mesurée selon des techniques connues dans l'art, comme par l'utilisation d'un osmomètre disponible dans le commerce, par exemple Advanced® Model 2020 disponible

chez Advanced Instruments Inc. (Etats-Unis). Un « agent d'isotonicité » est un composé qui est physiologiquement toléré et qui confère une tonicité appropriée à une formulation (par exemple, des compositions immunogènes de l'invention) pour prévenir le flux net d'eau à travers les membranes qui sont en contact avec la formulation. On connaît des compositions adjuvantes aqueuses qui contiennent 100 mM de chlorure de sodium ou plus, par exemple le système adjuvant A (ASA) dans les documents WO 2005/112991 et WO 2008/142133 ou les adjuvants liposomiques divulgués dans le document WO 2007/068907.

Dans certains modes de réalisation, l'agent d'isotonicité utilisé pour la composition est un sel. Toutefois, dans d'autres modes de réalisation, la composition comprend un agent d'isotonicité non ionique et la concentration de chlorure de sodium ou la force ionique dans la composition est inférieure à 100 mM, comme inférieure à 80 mM, par exemple inférieure à 30 mM, comme inférieure à 10 mM ou inférieure à 5 mM. La composition peut comprendre un agent d'isotonicité non ionique et la conductivité de la composition est inférieure à 5 mS/cm, comme inférieure à 4 mS/cm. Dans un mode de réalisation préféré, l'agent d'isotonicité non ionique est un polyol, comme le sorbitol. La concentration de sorbitol peut être, par exemple, située entre environ 3 % et environ 15 % (p/v), comme entre environ 4 % et environ 10 % (p/v). Des adjuvants comprenant une fraction de saponine immunologiquement active et un agoniste du TLR4 où l'agent d'isotonicité est un sel ou un polyol ont été décrits dans les

documents WO 2012/080369 et WO 2012/080370 qui sont incorporés ici en référence.

Le pH des compositions immunogènes devra être approprié pour une administration. Généralement, le pH se situera dans la plage de 6,0 à 9,0, comme 7,0 à 9,0, spécialement 7,25 à 8,75, comme 7,5 à 8,5, en particulier pH 7,75 à 8,25. Un pH d'environ 8,0 est d'un intérêt particulier.

Pour les compositions liquides administrées par voie parentérale, le volume de la composition se situera généralement dans la région de 50 µl à 2 ml (selon la voie spécifique). Un volume de 400 à 600 µl, comme autour de 500 µl est généralement utilisé, en particulier pour une administration par la voie intramusculaire.

Les compositions seront généralement stériles.

Vecteurs adénoviraux

L'adénovirus a été largement utilisé pour des applications de transfert de gènes grâce à sa capacité d'obtenir un transfert de gènes hautement efficace dans divers tissus cibles et à sa grande capacité de transgènes. Les vecteurs adénoviraux d'utilisation dans la présente invention peuvent être dérivés de tout un éventail d'hôtes mammifères. Il a été isolé plus de 100 sérotypes distincts d'adénovirus qui infectent diverses espèces de mammifères. Ces sérotypes adénoviraux ont été classés en six sous-genres (A à F ; B est sous-divisé en B1 et B2) selon l'homologie de séquence et selon leur capacité d'agglutiner les hématies (Tatsis and Ertl Molecular Therapy (2004) 10: 616-629).

Les exemples d'adénovirus d'origine humaine sont Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad34 et Ad35. Bien que les vecteurs à base d'Ad5 aient été largement utilisés dans un certain nombre d'essais de thérapie génique, il peut y avoir des limitations sur l'utilisation de l'Ad5 et d'autres vecteurs adénoviraux humains du groupe C à cause d'une immunité préexistante dans la population générale due à une affection naturelle. L'Ad5 et d'autres membres humains du groupe C tendent à faire partie des sérotypes les plus séroprévalents. En outre, il peut se développer une immunité contre des vecteurs existants comme conséquence d'une exposition au vecteur durant le traitement. Ces types d'immunité préexistante ou développée contre des vecteurs séroprévalents peuvent limiter l'efficacité d'une thérapie génique ou des efforts de vaccination. Des sérotypes adénoviraux alternatifs constituent ainsi des cibles très importantes à la poursuite de systèmes d'administration de gènes capables d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

Le vecteur adénoviral d'utilisation dans la présente invention est dérivé d'un adénovirus simien non humain. De nombreux adénovirus ont été isolés à partir de simiens non humains tels que les chimpanzés, les bonobos, les macaques Rhésus et les gorilles, et les vecteurs dérivés de ces adénovirus induisent de fortes réponses immunitaires contre des transgènes codés par ces vecteurs (Colloca et al. (2012) Sci. Transl. Med. 4: 1-9 ; Roy et al. (2004) Virol. 324: 361-372 ; Roy et al. (2010) J. of Gene Med. 13: 17-25).

Certains avantages des vecteurs à base d'adénovirus simiens non humains comprennent le manque relatif d'anticorps de neutralisation croisée contre ces adénovirus dans la population cible. Par exemple, une
5 réaction croisée de certains adénovirus de chimpanzé avec des réponses d'anticorps neutralisants préexistants n'est seulement présente que chez 2 % de la population cible comparativement à 35 % dans le cas de certains vecteurs adénoviraux humains candidats.

10 De façon spécifique, le vecteur adénoviral est dérivé d'un adénovirus simien non humain, en particulier un adénovirus de chimpanzé tel que ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (également appelé C7) ou Pan 9. Des exemples de telles souches
15 sont décrits dans les documents WO 03/000283, WO 2005/071093, WO 2010/086189 et GB 1510357.5 et sont également disponibles à l'American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, et d'autres sources. En variante,
20 les vecteurs adénoviraux peuvent être dérivés d'adénovirus simiens non humains isolés à partir de bonobos, tels que PanAd1, PanAd2 ou PanAd3. Des exemples de tels vecteurs décrits peuvent être trouvés par exemple dans les documents WO2005/071093 et
25 WO2010/086189. Des vecteurs adénoviraux peuvent également dériver d'adénovirus isolés de gorilles comme décrit dans les documents WO2013/52799, WO2013/52811 et WO2013/52832.

Certains vecteurs adénoviraux peuvent démontrer
30 une ou plusieurs des caractéristiques suivantes améliorées par rapport à d'autres vecteurs : une

productivité supérieure, une immunogénicité améliorée et une expression de transgènes augmentée.

Dans un mode de réalisation, le vecteur adénoviral est un adénovirus simien non humain contenant au moins
5 un penton choisi parmi SEQ ID NO : 10 ou SEQ ID NO : 20, un hexon choisi parmi SEQ ID NO : 11 ou SEQ ID NO : 21 ou une fibre choisie parmi SEQ ID NO : 12 ou SEQ ID NO : 22, en particulier un penton et un hexon, un penton et une fibre, ou un hexon et une fibre, comme
10 un penton, un hexon et une fibre. Dans certains exemples, le vecteur adénoviral est un adénovirus simien non humain contenant au moins le penton de SEQ ID NO : 10, l'hexon de SEQ ID NO : 11 ou la fibre de SEQ ID NO : 12, en particulier un penton et un hexon,
15 un penton et une fibre, ou un hexon et une fibre. Dans d'autres exemples, le vecteur adénoviral est un adénovirus simien non humain contenant au moins le penton de SEQ ID NO : 20, l'hexon de SEQ ID NO : 21 ou la fibre de SEQ ID NO : 22, en particulier un penton et
20 un hexon, un penton et une fibre, ou un hexon et une fibre.

Dans un mode de réalisation, le vecteur adénoviral est dérivé du ChAD3 et contient au moins un penton (SEQ ID NO : 10), un hexon (SEQ ID NO : 11) et une
25 fibre (SEQ ID NO : 12) qui en proviennent.

Dans un mode de réalisation, le vecteur adénoviral est dérivé du ChAd155 et contient un penton (SEQ ID NO : 20), un hexon (SEQ ID NO : 21) et une fibre (SEQ ID NO : 22) qui en proviennent.

30 Dans un mode de réalisation, le vecteur adénoviral est un adénovirus simien non humain contenant au moins

le penton de SEQ ID NO : 15, l'hexon de SEQ ID NO : 16 ou la fibre de SEQ ID NO : 17, en particulier un penton et un hexon, un penton et une fibre, ou un hexon et une fibre. Dans certains exemples, le vecteur adénoviral est dérivé du ChAd63 contenant au moins le penton de
5 SEQ ID NO : 15, l'hexon de SEQ ID NO : 16 et la fibre de SEQ ID NO : 17.

Structure des vecteurs adénoviraux

Les adénovirus ont une morphologie caractéristique
10 avec une capsid icosaédrique comprenant trois protéines majeures, l'hexon (II), le penton (III) et une fibre globulaire (IV), accompagnées d'un certain nombre d'autres protéines mineures, VI, VIII, IX, IIIa et IVa2. L'hexon représente la majorité des composants
15 structuraux de la capsid, qui est constituée de 240 capsomères d'hexons trimères et 12 bases de pentons. L'hexon comporte trois structures en tonneau conservées, alors que le haut comporte trois structures en forme de tour, chaque tour contenant une boucle issue de chaque
20 sous-unité qui forme la majeure partie de la capsid. La base de l'hexon est hautement conservée entre les sérotypes adénoviraux, alors que les boucles à la surface sont variables (Tatsis and Ertl Molecular Therapy (2004) 10: 616-629). Le penton est une autre
25 protéine de la capsid adénovirale qui forme une base pentamère à laquelle la fibre se fixe. La protéine trimère de la fibre dépasse de la base du penton au niveau de chacun des 12 sommets de la capsid et est une structure de type bâtonnet globulaire. Le rôle
30 principal de la protéine fibre est la fixation de la capsid virale à la surface cellulaire par

l'interaction de la région globulaire avec un récepteur cellulaire, et les variations de la tige flexible ainsi que des régions globulaires de la fibre sont caractéristiques des différents sérotypes (Nicklin et
5 al. Molecular Therapy 2005 12: 384-393).

Le génome adénoviral est bien caractérisé. L'ADN double brin linéaire est associé à la protéine VII hautement basique et à un petit peptide pX (également nommé mu). Une autre protéine, V, est encapsidée avec
10 ce complexe ADN-protéine et fournit un lien structural à la capside par l'intermédiaire de la protéine VI. Il n'existe une conservation générale dans l'organisation globale du génome adénoviral par rapport à des cadres de lecture ouverts spécifiques positionnés de façon
15 similaire, par exemple l'emplacement des gènes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 de chaque virus. Chaque extrémité du génome adénoviral comprend une séquence connue comme une répétition terminale inversée (ITR), qui est nécessaire à la réplication virale.
20 L'extrémité 5' du génome adénoviral contient les éléments cis en 5' nécessaires à l'encapsidation et à la réplication ; c'est-à-dire, les séquences ITR en 5' (qui fonctionnent comme des origines de réplication) et les domaines amplificateurs de l'encapsidation en 5'
25 natifs (qui contiennent des séquences nécessaires à l'encapsidation des génomes linéaires des Ad et des éléments amplificateurs pour le promoteur E1). L'extrémité 3' du génome adénoviral comprend les éléments cis en 3' (y compris les ITR) nécessaires à
30 l'encapsidation. Le virus comprend également une protéase codée par le virus, qui est nécessaire au

traitement de certaines des protéines structurales
requis pour produire des virions infectieux. La
structure du génome adénoviral est décrite sur la base
de l'ordre selon lequel les gènes viraux sont exprimés
5 à la suite de la transduction des cellules hôtes. De
façon plus spécifique, les gènes viraux sont qualifiés
de gènes précoces (E) ou tardifs (L) selon si la
transcription survient avant ou après le début de la
réplication de l'ADN. Dans la phase précoce de la
10 transduction, les gènes E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4
des adénovirus sont exprimés pour préparer la cellule
hôte à la réplication virale. Durant la phase tardive
de l'infection, l'expression des gènes tardifs L1 à L5,
qui codent pour les composants structuraux des
15 particules virales, est activée.

L'annotation de la séquence de type sauvage du
ChAd3 (SEQ ID NO : 9) est fournie ci-dessous.

séquences codantes (38 au total)

E1A 30.8K

Début : 589 Fin : 1544

20 Description de l'emplacement d'origine :
jonction (589..1129, 1243..1544)

E1A 25.5K

Début : 589 Fin : 1544

Description de l'emplacement d'origine :
25 jonction (589..991, 1243..1544)

E1B 22K

Début : 1716 Fin : 2279

Description de l'emplacement d'origine :
1716..2279

E1B 57K

Début : 2021 Fin : 3544

30 Description de l'emplacement d'origine :
2021..3544

IX

Début : 3640 Fin : 4104

Description de l'emplacement d'origine :

3640..4104

IVa2

5 Début : 4163 Fin : 5790 (complémentaire)

Description de l'emplacement d'origine :

complémentaire (4163..5499, 5778..5790)

pol

Début : 5269 Fin : 14236 (complémentaire)

Description de l'emplacement d'origine :

10 complémentaire (5269..8865, 14228..14236)

pTP

Début : 8664 Fin : 14236 (complémentaire)

Description de l'emplacement d'origine :

complémentaire (8664..10667, 14228..14236)

48K

15 Début : 11120 Fin : 12379

Description de l'emplacement d'origine :

11120..12379

pIIIIa

Début : 12403 Fin : 14181

Description de l'emplacement d'origine :

20 12403..14181

III

Début : 14273 Fin : 16054

Penton

Description de l'emplacement d'origine :

14273..16054

25 pVII

Début : 16069 Fin : 16665

Description de l'emplacement d'origine :

16069..16665

V

Début : 16738 Fin : 17853

30 Description de l'emplacement d'origine :

16738..17853

pX

- Début : 17878 Fin : 18123
Description de l'emplacement d'origine :
17878..18123
pVI
- 5 Début : 18219 Fin : 18974
Description de l'emplacement d'origine :
18219..18974
hexon
- Début : 19086 Fin : 21968
Description de l'emplacement d'origine :
19086..21968
- 10 protéase
Début : 21998 Fin : 22627
Description de l'emplacement d'origine :
21998..22627
DBP
- 15 Début : 22743 Fin : 24395 (complémentaire)
Description de l'emplacement d'origine :
complémentaire (22743..24395)
92K
- Début : 24445 Fin : 26940
Description de l'emplacement d'origine :
24445..26940
- 20 22K
Début : 26630 Fin : 27229
Description de l'emplacement d'origine :
26630..27229
33K
- Début : 26630 Fin : 27551
- 25 Description de l'emplacement d'origine :
jonction (26630..26966, 27169..27551)
pVIII
- Début : 27626 Fin : 28309
Description de l'emplacement d'origine :
27626..28309
- 30 E3 12K
Début : 28310 Fin : 28627
Description de l'emplacement d'origine :

- 28310..28627
E3 CR1-alphap0
Début : 29125 Fin : 29325
Description de l'emplacement d'origine :
29125..29325
- 5 E3 gp18K
Début : 29328 Fin : 29819
Description de l'emplacement d'origine :
29328..29819
E3 33K
Début : 29848 Fin : 30738
- 10 Description de l'emplacement d'origine :
29848..30738
E3A 11 K
Début : 31293 Fin : 31589
Description de l'emplacement d'origine :
31293..31589
- 15 E3 RID alpha
Début: 31601 Fin: 31873
Description de l'emplacement d'origine :
31601..31873
E3 RID bêta
Début : 31876 Fin : 32274
- 20 Description de l'emplacement d'origine :
31876..32274
E3 15K
Début : 32267 Fin : 32653
Description de l'emplacement d'origine :
32267..32653
- 25 exon U
Début : 32684 Fin : 32848 (complémentaire)
Description de l'emplacement d'origine :
complémentaire (32684..32848)
fibre
Début : 32859 Fin : 34490
- 30 Description de l'emplacement d'origine :
32859..34490
ORF6/7 de E4

- Début : 34698 Fin : 35858 (complémentaire)
 Description de l'emplacement d'origine :
 complémentaire (34698..34973, 35685..35858)
 ORF6 de E4
- 5 Début : 34974 Fin : 35858 (complémentaire)
 Description de l'emplacement d'origine :
 complémentaire (34974..35858)
 ORF4 de E4
- Début : 35758 Fin : 36123 (complémentaire)
 Description de l'emplacement d'origine :
 complémentaire (35758..36123)
- 10 ORF3 de E4
 Début : 36139 Fin : 36486 (complémentaire)
 Description de l'emplacement d'origine :
 complémentaire (36139..36486)
 ORF2 de E4
- Début : 36483 Fin : 36875 (complémentaire)
- 15 Description de l'emplacement d'origine :
 complémentaire (36483..36875)
 ORF1 de E4
- Début : 36928 Fin : 37314 (complémentaire)
 Description de l'emplacement d'origine :
 complémentaire (36928..37314)
- 20 diverses caractéristiques (3 au total)
 ARN VA I
 Début : 10693 Fin : 10860
 Description de l'emplacement d'origine :
 10693..10860
 VA II
- 25 Début : 10927 Fin : 11102
 Description de l'emplacement d'origine :
 10927..11102
 délétion de E3 ~ 5'
- Début : 28642 Fin : 28647
 Description de l'emplacement d'origine :
- 30 28642..28647

L'annotation de la séquence de type sauvage du ChAd63 (SEQ ID NO : 14) est fournie ci-dessous.

| | | |
|----|--------------------------|---|
| | LOCUS | ChAd63 - ADN linéaire de 35994 pb - 27 juillet 2015 |
| 5 | DEFINITION | Adénovirus de chimpanzé 63, génome complet |
| | COMMENTAIRE | Annotation selon l'alignement du ChAd63 contre la souche de référence de l'adénovirus 4 humain NC_003266 |
| | CARACTERISTIQUES | Emplacement/Qualificateurs |
| | source | 1..35994 /organisme = « Adénovirus de chimpanzé 63 » /type de molécule = « ADN génomique » /acronyme = « ChAd63 » |
| 10 | région de répétitions | 1..129 /nom standard = « ITR » /type de répétition = inversée |
| 15 | gène | 479..1501 /gène = « E1A » |
| | séquence régulatrice | 479..484 /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » /gène = « E1A » |
| 20 | séquence codante | jonction (576..1143, 1229..1437) /gène = « E1A » /produit = « protéine de contrôle E1A » /traduction = « MRHLRDLPGNVFLATGNEILELVVDAMMGDDPPEPPTPFPEAPSLYDL YDLEVDVPENDPNEEAVNDLFSDAALLAAEQANTDSCGSDSDSSLHTPRP GRGEKKIPELKGEELDLRCEECLEPPSDDEEDEEAIRAAASEGVKVAGE SFSLDCTPLPGHGCKSCFEHRMNTGDKNVMCALCYMBRAYNHCVYSPVSD VDETTPTSECISSPPEIGEPEPPEDIHRPVAVRVTCRBAAVESLDDLLQG GDEPLDLCTRKRPRH » |
| 25 | intron | 1144..1228 /gène = « E1A » |
| 30 | | |

| | | |
|----|------------------|--|
| | séquence | 1495..1501 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /gène = « E1A » |
| 5 | gène | 1555..3953 /gène = « E1B » |
| | séquence | 1555..1664 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » /gène = « E1B » |
| 10 | séquence codante | 1601..2179 /gène = « E1B » /codon de départ = 1 /produit = « protéine de contrôle E1B 19K » /traduction = MEIWTVLEDFHQTRQLLENSSAEVSYLWRFCEGGPLAKLVYRAKQDYKD QFEDILRECPGIFDSLNLGHQSHFNQSILRALDFSTPGRTTAAVAFFAF 15 ILDKWSQETHFSRKYRLDCLAVLWRTWRCQRINAI SGYLPVQFPVDTLR ILSLQSPQEHQRROQFPQQEQQEEEEEDREENLRAGLDPVVAEEEE » |
| | séquence codante | 1906.. 3420 /gène = « E1B » /codon de départ = 1 /produit = « protéine de contrôle E1B 55K » /traduction = « MESRNFTQQGLPSGLLSSSFVENMEVPAPECNLRLLASTAGRHAEDP 20 ESPVTFGTPTPPAAAAGAAARGGGGPRREPESRSGPSGGGGGGVADLFP ELRRVLTRSSSGRERGIKRERHEETSHRTTELTVSLMSRRRPE SVWWHEV QSQGIDEVSVMHEKYSLEQVKTCWLEPEDDWEVAIRNYAKIALKPKDKY KITKLINIRNSCYTSCNGAEVEISTQERAAFRCCMMNMPGVVGMGVT 25 FMNTRFRGDGYNGVVFEMANTKLTVHGCSFFGFNNMCIEAWGSVSVRGCS FSANWMGVVGRTKSVVSVKKCLPERCHLGVMSEGEAKVKHCASTETGCF VLIKGNKVKHNMICGASDERGYQMLTCAGGNHMLATVHVASHPRKTW PEFEHNVMTRCNVHLGSRRGMPYQCNMQFVKVILEPDAMSRVSLTGV FDMNVELWKILRYDESKTRCRACECGGKHARLQPVCEVTEDLRPDHLV LSCNGTEFGSSGEESD » |
| 30 | gène | 3454.. 3953 /gène = « IX » |

| | | |
|----|------------------|--|
| | séquence | 3454.. 3459 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » /gène = « IX » |
| 5 | séquence codante | 3505.. 3933 /gène = « IX » /produit = « protéine de la capside IX » /traduction = MSGSSASFEGGVFSPYLTGRLPSWAGVRQNVMGSTVDGRFVQPNSSSTLT YATLSSSSVDAAAAAAAAASAASAVRGMALGAGYYSSLVANSSSTNNPAS LNEEKLLLLLMAQLEALTQRLGELTQQVAQLQAETRAAVATVTK |
| 10 | séquence | 3929..3934 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /note = « E1B, IX » |
| | séquence | 3944..3949 |
| 15 | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /note = « E1B, IX » |
| | séquence | 3948..3953 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /note = « E1B, IX » |
| 20 | gène | complémentaire (3992..26364) /gène = « E2B » |
| | gène | complémentaire (3992..5735) /gène = « IVa2 » |
| | séquence | complémentaire (3992..3997) |
| 25 | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /note = « IVa2, E2B » |

séquence codante complémentaire (jonction (3993..5326,
5605..5617))
/gène = « IVa2 »
/produit = « protéine d'encapsidation IVa2 »
/traduction =
5 « METRGRRPGAVLDQFDEFEAHPRKRPARRAPLHRDGDHADAADPATLE
GPDPGLAGRPSFGALLPQSPQPAKRGGLLDRDALEHITELWDRLELLQQ
TLKMPMADGLKPLKNFASLQELLSLGGERLLAELVRENMHVREMMNEV
APLLREDGSCLSLNYHLQPVIGVIYGPTGCGKSQLLRNLLSAQLISPAP
ETVFFIAPQVDMIPPSSELKAWEMQICEGNYAPGIEGTFTVPQSGTLRPF
10 IKMAYDELTDHNYDVSDPRNVFAQAAAHGPIATIMDEC MENLGGHKGV
SKFFHAFPSKLHDKFPKCTGYTVLVVLHNMNERRDLGGNIANLKIQAKM
HLISPRMHPSQLNRFVNTYTKGLPVAISLLKDIVQHHALRPCYDWVIY
NTTPEHEALQWSYLHPRDGLMEMYLNIOAHLYRVLEKIHRLNDRDRWS
RAYRARKIK »
15
20
25
30

| | |
|------------------|---|
| séquence codante | complémentaire (jonction (5096..8659, 13841..13849)) /gène = « E2B » /numéro EC = « 2.7.7.7 » /produit = « ADN polymérase » /traduction = « MALVQTHGSRGLHPEASDEGRQPSRRRSRQSSPGAVPEPARARRRRRA PAAPASGPRAAPAARRASSPPLLSMEPPPPKKKRGTVVAPQGRGTLQAV DVATNGAVEIKYHLDLPRALEKLLQVNRAPPLPTDLTFQRLRTLDSSSL RALVLALRPVRAEVWTCLPRGLVSMTTIEADDGHADGQDVVQHMQPPA LHCPLKFLVKGTVQVLVQHVPVQRCHEHCGRLYKHKHECSARRRHEFYTH HINSHSSNWWQEIQFFPIGSHFRTERLELTVDVETYTWMGSFGKQLVPPF MLVMKLSGDPPLVELAHDLLALQLKWDWRWHGDPRTFYCVTPEKMAVGQQF RQYRDLQOTALAVDLWTSFELSANPHVADWALEQHGLSDPAELTYDELKK LPHVKGRPRFVELYIVGHNINGFDEIVLAAQVINNRAEVPQPFRTITRNF MPRAGKILFNDVTFALPNPAYKKRTDFQLWEQGGCDDDLDFKHQFLKVMV RDTFALTHTSLRKAQAAYALPVEKGCCAYKAVNQFYMVGSYRADQDGGFF LEEYWKDREEFLLNRELWKOKGOLKYDIIQETLDYCALDVLVTAELVAK LQDSYAHFIRDSVGLPHAFENIFQRPTISSNSHAI FRQIVYRAEKPQRS NLGTGLLAPSHELYDYVRASIRGGRCYPTYIGVLQHEPLYVYDICGMYAS ALTHPMPWGTFLSPYERAI AVRDWQASLDDLGTCISYFDPPELLPGITFTV DADEPDELMILDPLPPFC SRKGGRLCWTNEPLRGEVATSVDLITLHNRGW RVRIVPDELTTVFPEWKCVAREYVQLNIAAKERADKEKNQTMRSIAKLL SNALYGSFATKLDNKKIVFSDQMDGLMKGVSNQTVNIKSSSFLETDM SAEVMFAFEREYLPQQLAILDSDPEDSEDEQGPAPFYTPEAGTFGHVAY TYKFITFLDVDEGDMCLHTLEKVDPLVDNDRYPSHVASFVLAWTRAFVS EWAGFLYDEDRGTPLED RPIKSVYGD TDSL FVTQRGHELMETRCKKRIK KHGGNIVFDPDRPDLTWLVECE TVCASCADAYAPESVFLAPKLYALKS LLCPVCGH TSKGKLRAKGHAAEALNYELMLNLCYLADAQGADRERFSTSR MSLKRTLASAQPGAHPTVTETTLTRTLRPWKDRTLASLDAHRLVPYSR SRPNPRNEEVCWIEMP » |
| 5 | |
| 10 | |
| 15 | |
| 20 | |
| 25 | |
| intron | Complémentaire (5327..5604) /gène = « IVa2 » |
| gène | 5917..33604 /gène = « L5 » |
| 30 | gène 5917..27469 /gène = « L4 » |

| | | |
|----|------------------|--|
| | gène | 5917..21839 |
| | | /gène = « L3 » |
| | gène | 5917..17466 |
| | | /gène = « L2 » |
| 5 | gène | 5917..13827 |
| | | /gène = « L1 » |
| | séquence | 5917..5922 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » |
| | | /note = « L » |
| 10 | intron | 5989..7009 |
| | | /note = « entre les séquences de tête de L1 et L2 » |
| | intron | 7082..9518 |
| | | /note = « entre les séquences de tête de L2 et L3 » |
| 15 | intron | 7082..7850 |
| | | /note = « entre les séquences de tête de L2 et i ; précède la séquence codante de la protéine 13,6 K » |
| | séquence codante | jonction (7877..8275, 9519..9539) |
| | | /gène = « L1 » |
| | | /codon de départ = 1 |
| 20 | | /produit = « protéine 13,6 K » |
| | | /traduction = |
| | | « MRADGEELDLLPFPVGMAVDVMEVEMPTARRALVLVFIQASAVLATL HGMHVLHELYLGSFDEREFQWAVERWRLHLVLYYVLAIGVAIVCLDGGHA DEPAREAGPDLGSDGSESEDEGAQAGAVQGFETLRSQGLRART » |

25

30

séquence codante complémentaire (jonction (8458..10392,
13841..13849)
/gène = « E2B »
/produit = « précurseur de la protéine terminale
pTP »
5 /traduction =
« MALSIHDCARLTGQTAATMNYFLPLRNIWNRVREFFRASTTAAGITW
MSRYIYGYHRLMLEDLAPGAPATERWPLYRQPPPHFLVGYQYLVRTCND
YIFDTRAYSRLKYHELVRPGHQTVNWSVMANCSYTTINTGAYHREVDVDD
FQTTILTQIQQAIIAERVVADLALVQPQRGFGLTRMHGRAGEEEVPVERL
MQDYKDLARCQDHAQWGMADRLRIQQAGPKDLVLLATIRRLRTAYFNEI
10 TS3IARPPPDQIPPEEQETGLSLPCDCDWLEAFVQRFSQVVDLETLSLR
GVPTGQLIRCIVSALSLENQDPPGGHLEMRGGVFTLRPREDGRAVTETM
RRRRGETIERFIDRLPVRRRRRRAPPPPPPEEEVEEMIVEEEEEEMEE
EPPGAFEREVRATIAELIRLLEEELTVSARNSQFFNFVDFYEAMERLE
ALGDVSEMPLRRWIMYFFVTEHIATTLNLYQRLCNVAVFTRHVELNLA
QVVMRARDPDGAVVYSRVWNEAGMNAFSQLMGRISNDLAATVERAGRGD
15 LQEEIEIQFMTEIAYQDNSGDVQEIILRQAAVNDTEIDSVELSERFKLTG
PVAFTQRRQIQDVNRVVAHASLLRAQYQNLARGADVFLPPLPPGPEP
PLPPGARERRRF
intron complémentaire (8660..26296)
/gène = « E2B »
intron 9606..32253
20 /gène = « L5 »
/note = « précède la séquence codante de la
fibre »
intron 9606..26463
/gène = « L4 »
/note = « précède la séquence codante du
25 précurseur de la protéine de la capside pVIII »
intron 9606..25554
/gène = « L4 »
/note = « précède les séquences codantes de la
protéine 33 K et de la protéine d'encapsidation
22 K »
30

| | | |
|----|--------|---|
| | intron | 9606..23430 /gène = « L4 » /note = « précède la séquence codante de la protéine d'assemblage de l'hexon 100 K » |
| 5 | intron | 9606..21177 /gène = « L3 » /note = « précède la séquence codante de la protéase » |
| | intron | 9606..18296 /gène = « L3 » /note = « précède la séquence codante de |
| 10 | | l'hexon » |
| | intron | 9606..17508 /gène = « L3 » /note = « précède la séquence codante du précurseur de la protéine de la capside pVI » |
| | intron | 9606..17201 /gène = « L2 » /note = « précède la séquence codante du précurseur de la protéine nucléocapsidique pX » |
| 15 | | |
| | intron | 9606..15498 /gène = « L2 » /note = « précède la séquence codante du précurseur de la protéine nucléocapsidique pVII » |
| 20 | | |
| | intron | 9606..13887 /gène = « L2 » /note = « précède la séquence codante de la base du penton » |
| | intron | 9606..12043 /gène = « L1 » /note = « précède la séquence codante du précurseur de la protéine de la capside pIIIa » |
| 25 | | |
| | intron | 9606..10844 /gène = « L1 » /note = « précède la séquence codante de la protéine d'encapsidation 52 K » |
| 30 | | |

intron complémentaire (10393..26296)
 /gène = « E2B »

gène 10426..10585
 /gène = « VAI »

ARN différent 10426..10585
 5 /gène = « VAI »
 /produit = « ARN associé au virus I »

gène 10648..10818
 /gène = « VAIL »

ARN différent 10648..10818
 /gène = « VAIL »

10 /produit = « ARN associé au virus II »

séquence codante 10845..12020
 /gène = « L1 »
 /produit = « protéine d'encapsidation 52 K »
 /traduction =

15 « MHPVLRQMRPHFPFPQPLPQQQQQPALLPPPQQQQPATTAAAVSGA
 GVQYDLALEEGEGLARLGASSPERHFRVQMKRDAREAYVPKQNLFRDRS
 GEEPEEMRASRFHAGBELRRGLDRKRVLRDEDFADELGTGTPARAHVA
 AANLVTAYEQTVKEESNFQKSFNNHVRTLIAREEVTLGLMHLWDLLEAI
 VQNPTSKPLTAQLFLVVQHSRDNETFREALLNITEPEGRWLLDLVNLQ
 SIVVQERGLFLSEKLAAINFVLSLGGKYYARKIYKTPYVPIDKEVKIDG
 FYMBMTLKVLTLSDDLG VYRNDRMHRAVSASRRRELSQELMHSLQRAL
 20 TGAGTEGESYFDMGADLRWQPSRRRALEAAGGVYVEEVDDEEEEGEYLE
 D »

25

30

séquence codante 12044..13810
 /gène = « L1 »
 /produit = « précurseur de la protéine de la
 capsid pIIIa »
 /traduction =

5 « MQQQPPPPPPDPAMRAALQSQPSGINSSDWTQAMQRIMALTTRNPE
 AFRQQFQANRLSAILEAVVPSRSNPTHEKVLAIVNALVENKAIRGDEAG
 LVYNALLERVARYNSTNVQTNLDRMVTDVREAVSQRRERFHRESNLGSMV
 ALNAFLSTQPANVPRGQEDYTNFISALRLMVAEVQSEVYQSGPDYFFQ
 TSRQGLQTVNLSQAFKNLQGLWGVQAPVGDRATVSSLLTPNSRLLLLLV
 APFTDSGSVSRDSYLGYLINLYREAIGQAHVDEQTYQEITHVSRALGQE
 10 DPGNLEATLNFLLTNRSQKIPQYALSTEERILRYVQOSVGLFLMQEG
 ATPSAALDMTARNMEPSMYARNRPFINKLMDYLHRAAAMNSDYFTNAIL
 NPHWLPPPGFYTG EYDMPDPNDGFLWDDVDSSVFSRPTTTTVWKKEGG
 DRRPSSALSGRAGAAA VPEAASPFP SLFSLNSVRSELGRLTRPRL
 GEEYILNDSLLKPEREKNFPNNGIESLVDKMSRWKTYAHEHRDEPRASS
 AGTERRQRHQRGLVWDDSDADDSSVLDLGGSGGNPFARLRPRIGR
 15 LM »

séquence 13822..13827
 régulatrice /classe des séquences régulatrices = « séquence
 signal polyA »
 /gène = « L1 »

20

25

30

séquence codante 13889..15511
 /gène = « L2 »
 /produit = « base du penton »
 /traduction =
 « MMRRVYPEGPPESYESVMOQAVAAAMOPPLEAPYVPPRYLAPTEGRN
 5 SIRYSELAPLYDTRRLYLVDNKSADIASLNYQNDHSNFLT TVVQNNDET
 PTEASTQTINFDERSEWGGQLKTIMHTNMPNVNEFMYSNKF KARVMVSR
 KTPNGVTVGDDYDGSQDELTYEWVEFELPEGNF SVTMTIDL MNNAIIDN
 YLAVGRONGVLES DIGVKFDTRNFR LGWDPVTELVM PGVYTNEAFHPDI
 VLLPGCGVDFTESRLSNLLGIRKRQPFQEGFQILYEDLEGGNIPALLOV
 EAYEESKEKAEAEATTAVATAATVADATVTRGDTFATQAEFAAALAATD
 10 DSESKIVIKPVEKDSKNRSYNVLPDGKNTAYRSWYLAYNYGDPEKGVRS
 WTLTTSDVTCGVEQVYWSLPDMMQDPVTFRSTRQVSNYPVVGAE LLPV
 YSKSFFNEQAVYSQQLRAFTSLTHVFNRF PENQILVRFPAPTITTVSEN
 VPALTDHGTLP LRSIRGVQRVTVTDARRRTC PYVYKALGVVAPRVLSS
 RTF »

intron complémentaire (14013..26296)
 15 /gène = « E2B »
 /note = « précède les séquences codantes de l'ADN
 polymérase et du précurseur de la protéine
 terminale pTP »

séquence codante 15515..16099
 /gène = « L2 »
 20 /produit = « précurseur de la protéine
 nucléocapsidique pVII »
 /traduction =
 « MSILISPSNNTGWGLRAPSKMYGGARQ RSTQHPVVRVGHFRAPWGAL
 KGRVRSRTTVDEVIDQVVADARNYTPAAAPASTVDAVIDSVVADARRYA
 RAKSRRRRRIARRHRSTFAMKAARALLRKARRTGRRAMLRAARRAASGSS
 25 SAGRTRRRRAATAAAAAIASMSRPRRG NVYWVRDAATGVRVPVVRTRPRT
 »

30

| | | |
|----|------------------|--|
| | séquence codante | 16144..17181 /gène = « L2 » /produit = « protéine nucléocapsidique V » /traduction = |
| 5 | | « MSKRKYKEEMLOVIAPEIYGPAAVKEERKPRKLKRVKKDKKEEEDD GLVEFVREFAPRRRVQWRGRKVKPVLRPGTTVVFTPGERSGSASKRSYD EYVGDEDILEQAVERLGEFAYGKRSRPAPLKEEAVSIPLDHGNPTPSLK FVTLOQVLFSAAPRRGFKREGGEDLYPTMQLMVPKRQKLEDVLEHMKVD PEVQPEVKVRPIKQVAPGLGVQTVDIKIPTFPMETQTEPVKPTSTMEV QTDPMWPAASTTTTTRRRRKYGAASLLMPNYALHPSIIPTPGYRGTRFYR GYTSSRRRKTITRRRRRSRRSSTATSALVRRVYRSGREPLTLPRARYHP SIAI » |
| 10 | séquence codante | 17204..17437 /gène = « L2 » /produit = « précurseur de la protéine nucléocapsidique pX » /traduction = |
| 15 | | « MALTCLRLVPITGYRGRKPRRRRLTGNGLRRHHHRRRRRAISKRLGGG FLPALIPILAAAIGAIFGLASVAVQASQRH » |
| | séquence | 17461..17466 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /gène = « L2 » |
| 20 | séquence codante | 17509..18237 /gène = « L3 » /produit = « précurseur de la protéine de la capside pVI » /traduction = |
| 25 | | « MEDINFSSLAPRHGTRPFMGTWSDIGNSQLNGGAFNWSSLW3GLKNF GSTLKTYGNKAWNSSTQALREKLKEQNFQOKVVOGLASGINGVVDLAN QAVQKQINSRLDAVFPAGSVEMPQVEEELPPLDKRGDKRPRPDAEETLL THTDEPPPYEEAVKLGLPTTRPVAPLATGVLPSSSSQPATLDLPPPAS RPSTVAKPLPPVAVASRAPRGRPOANWQSTLNSIVGLGVQSVKRRRCY » |
| 30 | | |

séquence codante 18329..21154
 /gène = « L3 »
 /produit = « protéine de la capside II »
 /produit = « hexon »
 /traduction =

5 « MATPSMLPQWAYMHIAQDASEYLSPLVQFARATDTYFSLGNKFRN
 PTVAPTHDVTDRSQRLTLRFVPVDRELNTYSYKVRVYTLAVGDNRVLDL
 ASTYFDIRGVLDRGPSFKPYSGTAYNSLAPKGAENTSQWKDSDSKMHTF
 GVAAMPGVVGKKLEADGLPIGIDSSSGTDTLLIYADKTFQPEPQVGSDSW
 VDTNGAEKYGGRALKDTTNMKPCYGSFARPTNKEGGQANIKDSETAST
 TPNYDIDLAFDCKNIAANYDPDIVMYTENVELQTPDTHIVFKPGTSDE

10 SSEANLGQQAMPNRPNIYIGFRDNFIGLMYYNSTGNMGVLAGQASQLNAV
 VDLQDRNTELSYQLLLDSLGDRTYFMSWNOAVDSYDPDVRIENHGE
 DELPNYCFPLNGVGFDTTYQGVKVKTDTAATGTNGTQWDKDDTTVSTAN
 EIHSGNPFAMEINIQANLWRNFLYANVALYLPDSYKYTPANITLPTNTN
 TYDYMNGRVVAPSLVDAYINIGARWSLDPMDNVNPFNNHHRNAGLRYRSM
 LLGNRGYVPFHQVFPQKFFAIKSLLLPGSYTYEWNFRKDVNMILQSSL

15 GNDLRTDGASTAFTSINLYATFFPMAHNTASTLEAMLRNDTNDQSFNDY
 LSAANMLYPIPANATNVPLSIPSRNWAAFRGWSFTRLKTRTPSLGSGF
 DPYFVYSGSIPYLDGTFYLNHTFKKVSITFDSSVSWPGNDRLLTPNEFE
 IKRTVDGEGYNVAQCNMTKDWFLVQMLAHYNIGYQGFFYVPEGYKDRMYS
 FFRNFQPMRQVVDEVNYKDYQAVTLAYQHNNSGFVGYLAPTMRQGQPY
 PANYPYPLIGKSAVASVTQKKFLCDRVMWRIPFSSNFMMSMGALTDLGQN

20 MLYANSAHALDMNFEVDPMDESTLLYVVFEVFDVRVMWRIPFSSNFMMSM
 GALTDLGQNMLYANSAHALDMNFEVDPMDESTLLYVVFEVFDVVRVHQP
 HRGVIEAVYLRTPFSSAGNATT »

séquence codante 21182..21802
 /gène = « L3 »
 /numéro EC = « 3.4.22.39 »

25 /produit = « protéase »
 /traduction =

« TACGSGEQELRAILLRDLGCGPCFLGTFDKRFPGFMAPHKLACAIVNT
 AGRETGGEHWLAFAWNPRSHTCYLFDPFGFSDELRKQIYQFEYEGLLRR
 SALATEDRCITILEKSTQTVQGPSAACGLFCCMFLHAFVHWPDRPMDKN
 PTMNLITGVFNGMLQSPQVEPTLRRNQEALYRFLNAHSAYFRSHRARI
 KATAFDRMNQDM »

30

| | | |
|----|------------------|---|
| | séquence | 21834..21839 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » /gène = « L3 » |
| 5 | gène | complémentaire (21877..26364) /gène = « E2A » |
| | gène | complémentaire (21877..25341) /gène = « E2A-L » |
| | séquence | complémentaire (21877..) |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « séquence signal polyA » |
| 10 | | /note = « E2A, E2A-L » |
| | séquence codante | complémentaire (21882..23417) /gène = « E2A » /produit = « protéine de liaison d'ADN simple brin » /traduction = |
| 15 | | « MAGRGGSQSEQRRQERTPERGRGSASRPPNRESPSPPLPQKRHAYR RVVSDDGQEEIIVVSENSRSPSTSPPPPLFPKKKPRKTKHVPLQDISQ DSEDERQAEELAAVGFSFPFVRITEKDGRVVFETLDENDPLTSAAATK MTVKNFLSLPIVSAWEKGMVMTLLMERYRVEDLKSASFQLMPEQGEVY RRICHLVNEEHRGIPLTFTSNKTLTMMGRFLQGFVHSHSQIAHKNWE CTGCALWLHGCTEAEGKLRCLHGTVMIQKEHTIEMDVASENGQRALKEN PDRAKITQNRWGRSVVQLANNDARCCVHDAGCATNQFSSKSCGVFFTEG GKAQQAQFRQLEAFMKAMYFGMSSEQAQMMLIPLHCDCNHNKPGCVPSMGR QTCKMTPFGMANAEDLDVEGITDATVLA SVKHPALMVFOCCNPVYRNSR AQNAGPNCDFKISAPDLLGALQLTRKLWSDSFPDLVPVKLLIPEFKWLP KYQFRNVSLPAGHAESRQNPFD » |
| 20 | | |
| | intron | complémentaire (23427..24079) |
| 25 | | /note = E2A, E2A-L ; précède la séquence codante de la protéine de liaison d'ADN simple brin » |
| 30 | | |

séquence codante 23443..25042
 /gène = « L4 »
 /produit = « protéine d'assemblage de l'hexon
 100 K »
 /traduction =

5 « METQPSSPTSPSAPAADENQQQQNESLTAPPPSPTSDAAAAPDMQEM
 EESIEIDLGYVTPAEHEEELAARFSAPENHQEQPEQEAESQEQQAGLE
 HGDYLSGAEDVLIKHLARQSIIVKDALLDRAEVPLSVAELSRAYERNLF
 SPRVPPKQFNGTCEPNFRLNFYPVEAVPEALATYHLFFKNQRIIPVSCR
 ANRTRADALLNLGPGARLPDITSLEEVPKIFEGLGSDETRAANALQGSG
 EEHEHHSALVELEGDNARLAVLKRTVELTHFAYPALNLFPKVMSAVMDQ
 10 VLIKRASELSEEMQOPESSDEGKPVVSDEQLARWLGA SSTPQSLEERR
 KLMMAVVLVTVELECLRRFFADAETLRKVEENLHYLFRHGFTVRQACKIS
 NVELTNLVSYMGI LHENRLGQNVLHTTLRGEARRDYIRDCVYLYLCHTW
 QTGMGVWQQCLEEQNLKELCKLLQKNL KALWTGFDERTTASDLADLIFF
 ERLRLTLRNLGPDFMSQSMLQNFERSFILERSGILPATCSALPSDFVPLT
 FRECPFFLWSHCYLLRLANV LAYHSDVIEDVSSEGLLECHCRCNLCPTH
 15 RSLACNFPQILSETQIIGTFELQGPGEKGGLKLT PGLWTSAYLRKFVPE
 DYHPFEIRFYEDQSOPPKAEL SACTVITOGATLAQLQATQKSRQEFLLKK
 GHGVYLDPQTGEELNPSFPQDAPRKQQAESGAAAAAGGFGGRLGEQSG
 RGDGRLGQHSGRGGQFARQSGGGRRGGGGGRGRSSRRQT VVLCGGESKQ
 HGYHLRSGSGSRRPGPQ »

intron complémentaire (24157..26296)

20 /note = « E2A, E2B »

intron complémentaire (24157..25253)
 /gène = « E2A-L »

séquence complémentaire (25336..25341)
 régulatrice /classe des séquences régulatrices = « boîte
 TATA »

25 /gène = « E2A-L »

30

| | | |
|----|------------------|---|
| | séquence codante | jonction (25556..25886, 26056..26399) /gène = « L4 » /produit = « protéine 33 K » /traduction = « MPRGSSKKLKVELPLPPEDLEEDWESSQAEEMEDWDSTQAEEDSLQD SLEEEDEVEEEAEAEAAAAARPSSSAEEKASSTDTISAPGRGRGGRAHSR WDETGRFPNPTTQTAPTTVSKKRQKPSSSSRKPAAAAAARKSTAAAGGL RIAANEPAQTRELRNRIFFPLYAIFQOSRGQEQELKVKNRSLRSLTRSC LYHKSEDQLQRTLEDAEALFNKYCALTLKE » |
| 5 | séquence codante | 25556..26125 /gène = « L4 » /produit = « protéine d'encapsidation 22 K » /traduction = « MPRGSSKKLKVELPLPPEDLEEDWESSQAEEMEDWDSTQAEEDSLQD SLEEEDEVEEEAEAEAAAAARPSSSAEEKASSTDTISAPGRGRGGRAHSR WDETGRFPNPTTQTGKKERQGYKSWRGHKNAIVSCLQACGGNISFTRRY LLFHRGVNFPNRLHYRHLHSPYYCFQEEAETQOOOQKTSQSS » |
| 10 | intron | 25887..26055 |
| | séquence | complémentaire (26388..26393) |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » |
| | séquence codante | 26471..27154 /gène = « L4 » /produit = « précurseur de la protéine de la capsid pVIII » /traduction = « MSKEIPTPYMWSYQPMGLAAGAAQDYSTRMNWLSAGPAMISRVNDI RAHRNQILLEQSATTATPRHHLNPRNWPAAALVYQEIQPTTVLLPRDAQ AEVQLTNSGVQLAGGAALCRHRPAQGIKRLVIRGRGTQLNDEVVSSSLG LRPDGVFQLAGSGRSSFTPRQAVLTLESSSSQPRSGGIGTLQFVEEFTF SVYFNPFSGSPGHYPDEFIPNFDALSESVDGYD » |
| 20 | gène | 26836..32075 /gène = « E3B » |
| 30 | | |

| | | |
|----|-------------|--|
| | séquence | 26836..26842 |
| | régulatrice | /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » |
| | | /gène = « E3 » |
| 5 | intron | 26888..31546 |
| | | /gène = « E3 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la protéine de contrôle E3 14,7 K » |
| | intron | 26888..31098 |
| | | /gène = « E3 » |
| 10 | | /note = « précède la séquence codante de la protéine membranaire E3 RID-bêta » |
| | intron | 26888..330849 |
| | | /gène = « E3 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la protéine membranaire E3 RID-alpha » |
| | intron | 26888..29956 |
| 15 | | /gène = « E3 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la glycoprotéine membranaire E3 CR1-gamma » |
| | intron | 26888..28596 |
| | | /gène = « E3 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la glycoprotéine membranaire E3 CR1-bêta » |
| 20 | | |
| | intron | 26888..28011 |
| | | /gène = « E3 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la glycoprotéine membranaire E3 gp19K » |
| | intron | 26888..27377 |
| 25 | | /gène = « E3 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la glycoprotéine membranaire E3 CR1-alpha » |

30

séquence codante 27155..27475
 /gène = « E3A »
 /produit = « protéine de contrôle E3 12,5 K »
 /traduction =
 « MSHGGAADLARLRHLDHCRRFRCTARDLAEFAYFELPEERFQGPANG
 5 VRIVVEGGGLDSHLLRIFSQRPIIVEREQQTLLTLYCTICNHPGLHESLC
 CLLCTEYNKS »

séquence codante 27429..28055
 /gène = « E3 »
 /produit = « glycoprotéine membranaire E3 CR1-
 alpha »
 10 /traduction =
 « MKVFVCCVLSIIKAEISDYSGLDGVPAINRSLFFTGNETELQLOC
 KPHKKYLTWLFQGSPIAVVNHCNDNGVLLSGPANLTFSTRRSKLQLFQP
 FLPGTYQCVSGPCHHTFHLIPNTTAPLPATNNQTTQHRHRLSESNTT
 THTGGELRGRPTSGIYYGPWEVVGLIALGLVAGCLLALCYLYLPCCSYL
 VVLCCWFKKWGRSF »

15 séquence 27464..27469
 régulatrice /classe des séquences régulatrices = « séquence
 signal polyA »
 /gène = « L4 »

séquence codante 28037..28570
 /gène = « E3 »
 20 /produit = « glycoprotéine membranaire E3 gp19K »
 /traduction =
 « MGKITLVSCGVLVAVVLSIVGLGGAAVVKEEKADPCLBFNPDKCQLS
 FQPDGNRCTVLIKCGWECENVRIEYNNKTRNNTLASVWQPGDPEWYTVS
 VPGADGSPRTVNNTFIFAHMCDTVMWMSKQYDMWPPTKENIVVFSIAYS
 LCTALITAIVCLSIHMLIAIRPRNNAEKEKQP »

25

30

| | | |
|----|------------------|--|
| | séquence codante | 28600..29305 /gène = « E3 » /produit = « glycoprotéine membranaire E3 CR1- bêta » /traduction = « MASVTALTIFLGLVGTSSTFQHINKTVYAGSNSVLPFGHQSHQKVS WYDKSNTFPVTLCKGHQTRINRSGIFEKCNHNNITLLSITKHYS GTYYGTNENIKQDTYYSVTVLDPTTPRTTTTKPTTTKRHTKPK TTKKTTVKTTTTTTTTTEATTSTTLAATHTHTELTLOTTNDL IALLOKGDNSTTSNEEIPRSMIGIIVAVVVCMLIALCMVYYAFCYR KKHRLNØKLEHL » |
| 5 | autres | 29636..29946 |
| 10 | caractéristiques | /note = région en 3' résiduelle non fonctionnelle de la séquence codante de la glycoprotéine membranaire E3 CR1-gamma qui est intacte dans d'autres membres de cette espèce ; à laquelle il manque l'accepteur d'épissage et la région en 5' » |
| 15 | séquence codante | 29961..30857 /gène = « E3 » /produit = « glycoprotéine membranaire E3 CR1- delta » /traduction = « MKAVSALVFCSLIGIVFSAGFLKNLTIEGENATLVGISGQNV SWLK YHLDGWKDIDCWNVTVYTCTNGVNLTTTNATQDQNGR FKGQSFTTRNNGYESHNMFLYDVTVIRNETATTTQMP TTHSSTTTTMTQTQTTFYTSTQHMTTTTAAKPSSA APQFQALALIAAQPSTTTTNEQTDFLSTVESHTTATS SAFSSTANLSSLSTPISPATTPSPAPLPTPLKQTEDSG MQWOITLLI VIGLVILAVLLYYIFCRRIPNAHRKPVYK PIVDGQPEPLQVEGGLRNLLFSFTVW » |
| 20 | | |
| 25 | séquence codante | 30865..31140 /gène = « E3 » /produit = « protéine membranaire E3 R10-alpha » /traduction = « MIPRQFLITILICLLQVCATLALVANASFD CIGPFASYVLFAFVTCCI CCSIVCLLITFFQFIDWIFV RIAYLRHHPOYRDQRVARLLRLL » |
| 30 | | |

séquence codante 31146..31577
 /gène = « E3 »
 /codon de départ = 1
 /produit = « protéine membranaire E3 RID-bêta »
 /traduction =
 5 « MRALLLLALLLLVLPFPVNFPSPTQSPPEVRKCKFQEPWKFLLKCYRQ
 KSDMHPSWIMIIGIVNILACTLISFVIYPCFDFGWNSPEALYLPPEPDT
 PPQQPQAHALPPPQPRPQYMPILDYEAEPQRPMLPAISYENLTGGDD »

séquence codante 31570..31977
 /gène = « E3 »
 /note = « famille de 12,5 K »
 10 /produit = « protéine de contrôle E3 14,7 K »
 /traduction =
 « MTDPLANNNVNDLLLDMDGRASEQRLAQLRIROQQQERAVKELQDGIA
 IHQCKKGTFCLVKQAKISYEVTQTDHRLSYELLOQRQKFTCLVGVNPIV
 ITQQSGDTKGCINHCSDSPDCVHTLIKTLCGLRDLLPMN »

séquence 32001..32006
 15 régulatrice /classe des séquences régulatrices = « séquence
 signal polyA »
 /gène = « E3 »

séquence 32070..32075
 régulatrice /classe des séquences régulatrices = « séquence
 signal polyA »
 20 /gène = « E3 »

25

30

séquence codante 32254..33531
 /gène = « L5 »
 /note = « protéine de la capside IV »
 /produit = « fibre »
 /traduction =

5 « MSEKRRVRVDDDFDPVYPYDADNAPTVPFINPPFVSSDGFQERPLGVL
 SLRLADPVTTKNGEITLKLGEVGLDSSGKLIISNTATKAAAPLSFSNNT
 ISLNMDHFFYTKDGKLSLQVSPPLNILRTSILNTLALGFGSGLGLRGSA
 LAVQLVSPITFDTDGNIKLTLDRGLHVTTGDAIESNISWAKGLKFEDGA
 IATNIGNGLEFGSSSTETGVDDAYPIQVKLGSGLSFDSTGAIMAGNKED
 DKLTLTWTTDPSPNCQILAENDAKLTLCLTKCGSQILATVSVLVVSGN
 10 LNFITGTVSSAQVFLRFDANGVLLTEHSTLKKYWGGRQGDSIDGTPYTN
 AVGFMPNLKAYPKSQSSSTTKNNIVGQVYMNGDVSRPMLLTITLNGTDDS
 NSTYSMSFSYTWNGSYVGATFGANSYTFSYIAQE »

séquence 33599..33604
 régulatrice /classe des séquences régulatrices = « séquence
 signal polyA »

15 /gène = « L5 »
 gène complémentaire (33620..33625)
 /classe des séquences régulatrices = « séquence
 signal polyA »
 /gène = « E4 »

Séquence complémentaire (33620..34630)
 20 régulatrice /gène = « E4 »
 séquence codante complémentaire (jonction (33638..33889,
 34621..34791)
 /gène = « E4 »
 /produit = « protéine de contrôle ORF6/7 de E4 »
 /traduction =

25 « MSESNCIMTRSRARSAASRHHYPYRPAFLPRCEETETRASLVEDHPVL
 PDCDTLSMHNITVIPTTEDNPFQLLSCEVQVRECPEGFISLTDPRLARSE
 TVWNVETKMSITNGVQMFKAVERGERVVYSMSWEGGKITARIL »

30

| | |
|------------------|---|
| séquence codante | complémentaire (33886..34791) |
| | /gène = « E4 » |
| | /note = « ORF6 de E4 : famille de 34 K » |
| | /produit = « protéine de contrôle E4 34 K » |
| | /traduction = |
| 5 | « MSESNCIMTRSARSAASRHHYPYRPAFLPRCEETETRASLVEDHPVL PDCDTLSMHNVS SVRGLPCSAGFAVLQEFVPWDMVLTPEELRVLKRCM SVCLCCANIDLFSSQMINGYERWVLHCHCRDPGSLRCMAGGAVIALWFR RIIRGCMFNQRMWYREVVRHMPKEIMYMGSVFWRGRLIYLRWYDG HVGSIPLPAMSGWSVLNYGLNNLVLCCTYCSOLSEIRMRCCARTRR LMLRAVGIMLRSLDPDPLSSSLTERRRQRLRLGLMRHHRPIPFADYDS HRRSSASSR » |
| 10 | |
| intron | complémentaire (33890..34620) |
| | /gène = « E4 » |
| séquence codante | complémentaire (34697..35062) |
| | /gène = « E4 » |
| | /produit = « protéine de contrôle ORF4 de E4 » |
| | /traduction = |
| 15 | « MVLPLPSPAVTETQNCIIWLGLAHSTVVDVIRAIRHDGIFITPEA LDLLHGLREWLFYNFNTERSKRRDRRRRSVCSARTRFCYSKYENVRKQL HHDTVASTISRVPPSPVSAGPLTTL » |
| | |
| intron | complémentaire (34815..36232) |
| | /gène = « E4 » |
| 20 | /note = « précède la séquence codante de la protéine de contrôle E4 34 K » |
| séquence codante | complémentaire (35072..35425) |
| | /gène = « E4 » |
| | /produit = « protéine de contrôle ORF3 de E4 » |
| | /traduction = |
| 25 | « MRVCLRMPVEGALRELFIMAGLDLPQELVRRIIQGWKNENYLG MVQEC NMMIELENPPAFAIVLFLDVRVEALLEATVEHLENRITFOLAVIFHQH SGGERCHLRDLHFEVLRDRLD » |
| | |
| intron | complémentaire (35136..36232) |
| | /gène = « E4 » |
| | /note = « précède la séquence codante de la protéine de contrôle ORF4 de E4 » |
| 30 | |

| | | |
|----|--------------------------|---|
| | séquence codante | complémentaire (35422..35811) |
| | | /gène = « E4 » |
| | | /produit = « protéine de contrôle ORF2 de E4 » |
| | | /traduction = |
| 5 | | « MLERTACIYSIVVPEALNVHLEDFSFVDFLKNCLGDFLSSYLEDTG SSQHAYSSSLAFGNAHWGGLRFICTVACPNLIPGGPMAKNFGEDMKEYLQ LLLREELRDRGREFDIPLVNLLQVNQEONILEL |
| | intron | complémentaire (35455..36232) |
| | | /gène = « E4 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la protéine de contrôle ORF3 de E4 » |
| 10 | intron | complémentaire (35827..36232) |
| | | /gène = « E4 » |
| | | /note = « précède la séquence codante de la protéine de contrôle ORF2 de E4 » |
| | séquence codante | complémentaire (35851..36225) |
| | | /gène = « E4 » |
| 15 | | /note = « spécifique du genre : famille DURP » |
| | | /produit = « protéine de contrôle ORF1 de E4 » |
| | | /traduction = |
| | | « MDAEALYVYLEGSGALLPVQEGSNYILYAPENFVLHPHGIALLDLRL SIVVPYCFLGRFFSLADANVPGVYSSCRILHAGHRERLSVMVFNHSDNF YEGRAGDPVACLVLERTIYPPVRQASMV » |
| 20 | séquence régulatrice | complémentaire (36314..36319) |
| | | /classe des séquences régulatrices = « boîte TATA » |
| | | /gène = « E4 » |
| | région de répétitions | 36515..36643 |
| | | /nom standard = « ITR » |
| 25 | | /type de répétition = inversée |

L'annotation de la séquence de type sauvage du
ChAd155 (SEQ ID NO : 19) est fournie ci-dessous.

| | | |
|----|------------|--|
| | LOCUS | ChAd155 - ADN linéaire de 37830 pb - 10 juin 2015 |
| 30 | DEFINITION | Adénovirus de chimpanzé 155, génome complet |

| | | |
|----|-----------------------|---|
| | COMMENTAIRE | Annotation selon l'alignement du ChAd155 contre la souche de référence de l'adénovirus 2 humain NC_001405 Deux ORF putatifs dans la région E3 ajoutés manuellement |
| 5 | CARACTERISTIQUES | Emplacement/Qualificateurs |
| | source | 1..37830 /organisme = « Adénovirus de chimpanzé 155 » /type de molécule = « ADN génomique » /acronyme = « ChAd155 » |
| 10 | région de répétitions | 1..101 /nom standard = « ITR » /type de répétition = inversée |
| | gène | 466..1622 /gène = « E1A » |
| | séquence TATA | 466..471 /gène = « E1A » |
| 15 | transcrit primaire | 497..1622 /gène = « E1A » |
| | séquence codante | jonction (577..1117,1231..1532) /gène = « E1A » /produit = « E1A_280R » |
| 20 | séquence codante | jonction (577..979,1231..1532) /gène = « E1A » /produit = « E1A_243R » |
| | signal polyA | 1600..1605 /gène = « E1A » |
| | gène | 1662..4131 /gène = « E1B » |
| 25 | séquence TATA | 1662..1667 /gène = « E1B » |
| | transcrit primaire | 1692..4131 /gène = « E1B » |
| | séquence codante | 1704..2267 /gène = « E1B » /produit = « E1B_19K » |
| 30 | | |

séquence codante 2009..3532
 /gène = « E1B »
 /produit = « E1B_55K »

gène 3571..4131
 /gène = « IX »

5 séquence TATA 3571..3576
 /gène = « IX »

transcrit 3601..4131
 primaire /gène = « IX »

séquence codante 3628..4092
 /gène = « IX »

10 /produit = « IX »

signal polyA 4097..4102
 /note = « E1B, IX »

gène complémentaire (4117..27523)
 /gène = « E2B »

transcrit complémentaire (4117..27494)

15 primaire /gène = « E2B »

gène complémentaire (4117..5896)
 /gène = « IVa2 »

transcrit complémentaire (4117..5896)
 primaire /gène = « IVa2 »

séquence codante complémentaire (jonction (4151..5487,
 20 5766..5778))
 /gène = « IVa2 »
 /produit = « E2B_IVa2 »

signal polyA complémentaire (4150..4155)
 /note = « IVa2, E2B »

séquence codante complémentaire (jonction (5257..8838,
 25 14209..14217))
 /gène = « E2B »
 /produit = « E2B_polymérase »

gène 6078..34605
 /gène = « L5 »

30 gène 6078..28612
 /gène = « L4 »

| | | |
|----|------------------|--|
| | gène | 6078..22658 |
| | | /gène = « L3 » |
| | gène | 6078..18164 |
| | | /gène = « L2 » |
| 5 | gène | 6078..14216 |
| | | /gène = « L1 » |
| | séquence TATA | 6078..6083 |
| | | /note = « L » |
| | transcrit | 6109..34605 |
| | primaire | /gène = « L5 » |
| 10 | transcrit | 6109..28612 |
| | primaire | /gène = « L4 » |
| | transcrit | 6109..22658 |
| | primaire | /gène = « L3 » |
| | transcrit | 6109..18164 |
| | primaire | /gène = « L2 » |
| 15 | transcrit | 6109..14216 |
| | primaire | /gène = « L1 » |
| | séquence codante | jonction (8038..8457, 9722..9742) |
| | | /gène = « L1 » |
| | | /produit = « L1_L3.6K » |
| | séquence codante | complémentaire (jonction (8637..10640, |
| 20 | | 14209..14217) |
| | | /gène = « E2B » |
| | | /produit = « E2B_PTP » |
| | gène | 10671..10832 |
| | | /gène = « VAI » |
| | ARN différent | 10671..10832 |
| 25 | | /gène = « VAI » |
| | | /produit = « VAI » |
| | gène | 10902..11072 |
| | | /gène = « VAIL » |
| | ARN différent | 10902..11072 |
| | | /gène = « VAIL » |
| 30 | | /produit = « VAIL » |

| | | | |
|----|------------------|-------------------------------|--|
| | séquence codante | 11093..12352 | |
| | | /gène = « L1 » | |
| | | /produit = « L1_52K » | |
| | séquence codante | 12376..14157 | |
| | | /gène = « L1 » | |
| 5 | | /produit = « L1_pIIIa » | |
| | signal polyA | 14197..14202 | |
| | | /gène = « L1 » | |
| | séquence codante | 14254..16035 | |
| | | /gène = « L2 » | |
| | | /produit = « L2_penton » | |
| 10 | séquence codante | 16050..16646 | |
| | | /gène = « L2 » | |
| | | /produit = « L2_pVII » | |
| | séquence codante | 16719..17834 | |
| | | /gène = « L2 » | |
| | | /produit = « L2_V » | |
| 15 | séquence codante | 17859..18104 | |
| | | /gène = « L2 » | |
| | | /produit = « L2_pX » | |
| | signal polyA | 18143..18148 | |
| | | /gène = « L2 » | |
| 20 | séquence codante | 18196..18951 | |
| | | /gène = « L3 » | |
| | | /produit = « L3_pVI » | |
| | séquence codante | 19063..21945 | |
| | | /gène = « L3 » | |
| | | /produit = « L3_hexon » | |
| 25 | séquence codante | 21975..22604 | |
| | | /gène = « L3 » | |
| | | /produit = « L3_protéase » | |
| | signal polyA | 22630..22635 | |
| | | /gène = « L3 » | |
| | gène | complémentaire (22632..27523) | |
| | | /gène = « E2A » | |
| 30 | transcrit | complémentaire (22632..27494) | |
| | primaire | /gène = « E2A » | |

| | | |
|----|------------------|---|
| | gène | complémentaire (22632..26357) /gène = « E2A-L » |
| | transcrit | complémentaire (22632..26328) |
| | primaire | /gène = « E2A-L » |
| | signal polyA | complémentaire (22649..22654) |
| 5 | | /note = « E2A, E2A-L » |
| | séquence codante | complémentaire (22715..24367) /gène = « E2A » /note = « DBP, commune au genre ; famille DBP » /codon de départ = 1 /produit = « E2A » |
| 10 | séquence codante | 24405..26915 /gène = « L4 » /produit = « L4_100k » |
| | séquence TATA | complémentaire (26352..26357) /gène = « E2A-L » |
| 15 | séquence codante | jonction (26602..26941,27147..27529) /gène = « L4 » /produit = « L4_33K » |
| | séquence codante | 26602..27207 /gène = « L4 » /produit = « L4_22K » |
| 20 | séquence TATA | complémentaire (27518..27523) /note = « E2A, E2B ; nominal » |
| | séquence codante | 27604..28287 /gène = « L4 » /produit = « L4_pVIII » |
| | gène | 27969..32686 /gène = « E3B » |
| 25 | gène | 27969..31611 /gène = « E3A » |
| | séquence TATA | 27969..27974 /note = « E3A, E3B » |
| | transcrit | 27998..32686 |
| 30 | primaire | /gène = « E3B » |
| | transcrit | 27998..31611 |
| | primaire | /gène = « E3A » |

séquence codante 28288..28605
 /gène = « E3A »
 /produit = « E3 ORF1 »

signal polyA 28594..28599
 /gène = « L4 »

5 séquence codante 29103..29303
 /gène = « E3A »
 /produit = « ORF2 de E3 »

séquence codante 29300..29797
 /gène = « E3A »
 /produit = « ORF3 de E3 »

10 séquence codante 29826..30731
 /gène = « E3A »
 /produit = « ORF4 de E3 »

séquence codante 30728..31579
 /gène = « E3A »
 /produit = « ORF5 de E3 »

15 séquence codante 31283..31579
 /gène = « E3A »
 /produit = « ORF6 de E3 »

signal polyA 31578..31584
 /gène = « E3A »

20 séquence codante 31591..31863
 /gène = « E3B »
 /produit = « ORF7 de E3 »

séquence codante 31866..32264
 /gène = « E3B »
 /produit = « ORF8 de E3 »

25 séquence codante 32257..32643
 /gène = « E3B »
 /produit = « ORF9 de E3 »

signal polyA 32659..32664
 /gène = « E3B »

gène complémentaire (<32678..32838)
 /gène = « U »

30

séquence codante complémentaire (<32678..32838)
 /gène = « U »
 /note = « exon codant pour l'extrémité C-terminale non identifiée ; commun au genre »
 /produit = « protéine U »

5 séquence codante 32849..34585
 /gène = « L5 »
 /produit = « L5_fibre »

signal polyA 34581..34586
 /gène = « L5 »

10 gène complémentaire (34611..37520)
 /gène = « E4 »

transcrit complémentaire (34611..37490)
 primaire /gène = « E4 »
 signal polyA complémentaire (34625..34630)
 /gène = « E4 »

15 séquence codante complémentaire (jonction (34794..35069,
 35781..35954)
 /gène = « E4 »
 /produit = « ORF7 de E4 »

séquence codante complémentaire (35070..35954)
 /gène = « E4 »
 /produit = « ORF6 de E4 »

20 séquence codante complémentaire (35875..36219)
 /gène = « E4 »
 /produit = « ORF4 de E4 »

séquence codante complémentaire (36235..36582)
 /gène = « E4 »
 /produit = « ORF3 de E4 »

25 séquence codante complémentaire (36579..36971)
 /gène = « E4 »
 /produit = « ORF2 de E4 »

séquence codante complémentaire (37029..37415)
 /gène = « E4 »
 /produit = « ORF1 de E4 »

30 séquence TATA complémentaire (37515..37520)
 /gène = « E4 »

région de 37740..37830
répétitions /nom standard = « ITR »
/type de répétition = inversée

Transgènes

5 Les vecteurs adénoviraux peuvent être utilisés pour administrer des séquences d'ARN ou de protéines souhaitées, par exemple des séquences hétérologues, pour une expression *in vivo*. Un vecteur peut comprendre tout élément génétique y compris de l'ADN nu, un phage,
10 un transposon, un cosmide, un épisome, un plasmide, ou un virus. Par « cassette d'expression » (ou « minigène »), il est signifié la combinaison d'un gène hétérologue choisi (transgène) et des autres éléments régulateurs nécessaires pour diriger la traduction, la
15 transcription et/ou l'expression du produit génique dans une cellule hôte.

Généralement, un vecteur adénoviral est conçu de telle façon que la cassette d'expression est localisée dans une molécule d'acide nucléique qui contient
20 d'autres séquences adénovirales dans la région native à un gène adénoviral choisi. La cassette d'expression peut être insérée dans une région de gène existante pour perturber la fonction de cette région, si c'est souhaité. En variante, la cassette d'expression peut
25 être insérée dans le site d'un gène adénoviral partiellement ou totalement délété. Par exemple, la cassette d'expression peut être localisée dans le site d'une mutation, d'une insertion ou d'une délétion qui rend non fonctionnel au moins un gène d'une région
30 génomique choisi dans le groupe constitué de E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4. Le terme « rend non fonctionnel »

signifie qu'une quantité suffisante de la région du gène est éliminée ou sinon perturbée, de telle façon que la région du gène n'est plus capable de produire des produits fonctionnels de l'expression génique. Si
5 c'est souhaité, la région entière du gène peut être éliminée (et de façon appropriée remplacée par la cassette d'expression). De façon appropriée, les gènes E1 d'adénovirus sont délétés et remplacés par une cassette d'expression constituée du promoteur de choix,
10 d'une séquence d'ADNc du gène d'intérêt et d'un signal poly A, produisant un virus recombinant défectueux pour la réplication.

Une séquence de transgène peut également comprendre une séquence rapporteur, qui lors de
15 l'expression produit un signal détectable. De telles séquences rapporteurs comprennent, sans limitation, des séquences d'ADN codant pour la β -lactamase, la β -galactosidase (LacZ), la phosphatase alcaline, la thymidine kinase, la protéine fluorescente verte (GFP),
20 la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), la luciférase, des protéines liées à la membrane y compris, par exemple, CD2, CD4, CD8, la protéine héماغglutinine du virus de la grippe, et d'autres bien connues dans l'art, contre lesquelles des anticorps de haute
25 affinité sont dirigés et existent ou peuvent être produits par des moyens traditionnels, et des protéines de fusion comprenant une protéine liée à la membrane fusionnée de façon appropriée à un domaine de marqueur antigénique parmi, entre autres, l'hémagglutinine ou
30 Myc. Ces séquences codantes, lorsqu'elles sont associées à des éléments régulateurs qui dirigent leur

expression, fournissent des signaux détectables par des moyens traditionnels, y compris des tests enzymatiques, radiographiques, colorimétriques, de fluorescence ou autres spectrographiques, des tests de tri de cellules
5 activées par fluorescence et des tests immunologiques, y compris un test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), un test radioimmunologique (RIA) et l'immunohistochimie.

En plus du transgène, la cassette d'expression
10 comprend également des éléments de contrôle traditionnels qui sont liés de façon fonctionnelle au transgène d'une façon qui permet sa transcription, sa traduction et/ou son expression dans une cellule transfectée avec le vecteur adénoviral. Tel qu'utilisé
15 ici, des séquences « liées de façon fonctionnelle » comprennent à la fois des séquences de contrôle de l'expression qui sont contiguës au gène d'intérêt et des séquences de contrôle de l'expression qui agissent en trans ou à une certaine distance pour contrôler le
20 gène d'intérêt.

Les séquences de contrôle de l'expression comprennent des séquences d'initiation de la transcription, de terminaison, promoteurs et amplificateurs ; des signaux de traitement de l'ARN
25 efficaces tels que des signaux d'épissage et de polyadénylation (poly A) y compris le signal polyA de la bêta-globine de lapin ; des séquences qui stabilisent l'ARNm cytoplasmique ; des séquences qui amplifient l'efficacité de la traduction (par exemple,
30 la séquence consensus de Kozak) ; des séquences qui amplifient la stabilité des protéines ; et lorsque

c'est souhaité, des séquences qui amplifient la sécrétion du produit codé. Parmi d'autres séquences, des introns chimériques peuvent être utilisés.

Un « promoteur » est une séquence nucléotidique qui permet la liaison de l'ARN polymérase et qui dirige la transcription d'un gène. Généralement, un promoteur est localisé dans la région non codante en 5' d'un gène, en position proximale par rapport au site de départ de la transcription du gène. Les éléments de séquence au sein des promoteurs qui fonctionnent dans l'initiation de la transcription sont souvent caractérisés par des séquences nucléotidiques consensus. Des exemples de promoteurs comprennent, mais n'y sont pas limités, des promoteurs provenant de bactéries, de levures, de végétaux, de virus, et de mammifères (y compris des êtres humains). Un grand nombre de séquences de contrôle de l'expression, y compris des promoteurs qui sont internes, natifs, constitutifs, inductibles et/ou spécifiques des tissus, sont connues dans l'art et peuvent être utilisées.

Des exemples de promoteurs constitutifs comprennent, sans limitation, le promoteur TBG, le promoteur LTR du virus rétroviral du sarcome de Rous (éventuellement avec l'amplificateur), le promoteur du cytomégalovirus (CMV) (éventuellement avec l'amplificateur du CMV, voir, par exemple, Boshart et al, Cell, 41: 521-530 (1985)), le promoteur CASI (WO 2012/115980), le promoteur du SV40, le promoteur de la dihydrofolate réductase, le promoteur de la β -actine, le promoteur de la phosphoglycérol kinase (PGK), et le promoteur EF1a (Invitrogen).

Les promoteurs inductibles permettent la régulation de l'expression des gènes et peuvent être régulés par des composés fournis de façon exogène, des facteurs environnementaux tels que la température, ou
5 la présence d'un état physiologique spécifique, par exemple, une phase aiguë, un état de différenciation particulier de la cellule, ou des cellules en réplique uniquement. Des promoteurs inductibles et des systèmes inductibles sont disponibles auprès de
10 diverses sources commerciales, y compris, sans limitation, Invitrogen, Clontech et Ariad. De nombreux autres systèmes ont été décrits et peuvent être facilement choisis par l'homme du métier. Par exemple, les promoteurs inductibles comprennent le promoteur de
15 la métallothionéine (MT) de mouton inductible par le zinc et le promoteur du virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) inductible par la dexaméthasone (Dex). D'autres systèmes inductibles comprennent le système du promoteur de la T7 polymérase (WO 98/10088) ; le
20 promoteur de l'ecdysone des insectes (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351 (1996)), le système réprimable par la tétracycline (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)), le système inductible par la tétracycline (Gossen et al., Science,
25 378: 1766-1769 (1995), voir également Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol, 2: 512-518 (1998)). D'autres systèmes comprennent le dimère de FK506, VP16 ou p65 utilisant le castradiol, la diphenol murislerone, le système inductible par RU486 (Wang et al., Nat.
30 Biotech., 15: 239-243 (1997) et Wang et al., Gene Ther., 4: 432-441 (1997)) et le système inductible par la

rapamycine (Magari et al., J. Clin. Invest., 100: 2865-2872 (1997)). L'efficacité de certains promoteurs inductibles augmente avec le temps. Dans de tels cas, on peut amplifier l'efficacité de ces systèmes par l'insertion de répresseurs multiples en tandem, par exemple, TetR lié à un TetR par un IRES.

Le transgène peut être lié de façon fonctionnelle à un promoteur spécifique du tissu. Par exemple, si l'expression dans le muscle squelettique est souhaitée, un promoteur actif dans le muscle devra être utilisé. Ceux-ci comprennent les promoteurs issus de gènes codant pour la β -actine squelettique, la chaîne légère 2A de la myosine, la dystrophine, la créatine kinase musculaire, ainsi que des promoteurs musculaires de synthèse avec des activités supérieures aux promoteurs existant à l'état naturel (voir Li et al., Nat. Biotech., 17: 241-245 (1999)). Des exemples de promoteurs qui sont spécifiques des tissus sont connus pour le foie (albumine, Miyatake et al., J. Virol, 71: 5124-32 (1997) ; le promoteur de la nucléocapside du virus de l'hépatite B, Sandig et al., Gene Ther., 3: 1002-9 (1996) ; l'alpha-fœtoprotéine (AFP), Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7: 1503-14 (1996)), l'ostéocalcine osseuse (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24: 185-96 (1997)) ; la sialoprotéine osseuse (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11: 654-64 (1996)), les lymphocytes (CD2, Hansal et al., J. Immunol, 161: 1063-8 (1998) ; la chaîne lourde des immunoglobulines ; la chaîne des récepteurs des lymphocytes T), neuronaux comme le promoteur de l'énolase spécifique des neurones (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol, 13: 503-

15 (1993)), le gène de la chaîne légère des neurofilaments (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5611-5 (1991)), et le gène vgf spécifique des neurones (Piccioli et al., Neuron, 15: 373-84 (1995)),
5 parmi d'autres.

Dans d'autres modes de réalisation, l'élément régulateur post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte (WPRE) (Zuffrey et al. (1999) J Virol ; 73(4): 2886-9) peut être lié de façon fonctionnelle au
10 transgène.

Construction des vecteurs adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux sont produits par la modification de l'adénovirus de type sauvage pour exprimer des gènes hétérologues et/ou pour déléter ou
15 inactiver des séquences adénovirales indésirables. Les vecteurs adénoviraux peuvent également présenter une compétence de réplication modifiée. Par exemple, le vecteur peut être défectueux pour la réplication ou présenter une réplication limitée de telle façon qu'il
20 dispose d'une capacité réduite à se répliquer dans des cellules non de complémentation, comparativement au virus de type sauvage. Ceci peut être réalisé par la mutation du virus, par exemple, par une inactivation fonctionnelle ou une délétion d'un gène impliqué dans
25 la réplication, par exemple Ela, Elb, E2, E3 ou E4.

Les vecteurs adénoviraux conformément à la présente invention peuvent comprendre un E1 fonctionnellement inactivé ou délété. Ainsi, les vecteurs adénoviraux selon l'invention peuvent être
30 défectueux pour la réplication à cause de l'absence de la capacité d'exprimer le gène Ela et/ou Elb adénoviral.

Les adénovirus recombinants peuvent également porter des inactivations fonctionnelles dans d'autres gènes (voir le document WO 03/000283) par exemple, des délétions dans les gènes E3 ou E4. Le gène précoce retardé des adénovirus E3 peut être éliminé de la séquence adénovirale qui forme une partie du virus recombinant. La fonction de E3 n'est pas nécessaire à la production de la particule adénovirale recombinante. Ainsi, il n'est pas nécessaire de remplacer la fonction de ce produit de gène pour encapsider un adénovirus recombinant utile dans l'invention. Dans un mode de réalisation particulier, les adénovirus recombinants ont les gènes E1 et E3 fonctionnellement délétés. La construction de tels vecteurs est décrite dans Roy et al., Human Gene Therapy 15: 519-530, 2004.

Les adénovirus recombinants peuvent être également construits en comportant une délétion fonctionnelle du gène E4. Dans un mode de réalisation particulier, les adénovirus recombinants présentent les gènes E1 et E4 fonctionnellement délétés comme il est décrit dans Colloca et al. (2012) Sci. Transl. Med. 4: 1-9 ; Roy et al. (2004) Virol. 324: 361-372. Dans certains modes de réalisation, il peut être souhaitable de conserver la fonction de l'ORF6 de E4. Dans un mode de réalisation, la région native de l'ORF6 de E4 peut être remplacée par un ORF6 de E4 hétérologue, comme de l'Ad5. Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, le vecteur adénoviral peut être fonctionnellement délété dans E1 et comporter la région de l'ORF6 de E4 provenant de l'Ad5.

Les vecteurs adénoviraux selon l'invention peuvent également contenir une délétion fonctionnelle dans le gène précoce retardé E2a. Des délétions peuvent être également réalisées dans l'un quelconque des gènes tardifs L1 à L5 du génome adénoviral. De façon
5 similaire, des délétions dans les gènes intermédiaires IX et IVa peuvent être utiles.

D'autres délétions peuvent être réalisées dans les autres gènes structuraux ou non structuraux des
10 adénovirus. Les délétions ci-dessus peuvent être utilisées individuellement, par exemple, une séquence adénovirale pour une utilisation dans la présente invention peut contenir des délétions de E1 uniquement. En variante, des délétions de gènes entiers ou de
15 parties de ces derniers efficaces pour détruire leur activité biologique peuvent être utilisées dans une combinaison quelconque. Par exemple, dans un exemple de vecteur, les séquences adénovirales peuvent comporter des délétions des gènes E1 et du gène E4, ou des gènes
20 E1, E2a et E3, ou des gènes E1 et E3 (comme des délétions fonctionnelles dans E1a et E1b, et une délétion d'au moins une partie de E3), ou des gènes E1, E2a et E4, avec ou sans délétion de E3 et ainsi de suite. De telles délétions peuvent être des délétions
25 partielles ou totales de ces gènes et peuvent être utilisées en combinaison avec d'autres mutations, comme des mutations sensibles à la température pour obtenir un résultat souhaité.

Ces vecteurs sont produits en utilisant des
30 techniques connues de l'homme du métier. De telles techniques comprennent des techniques traditionnelles

de clonage de l'ADNc telles que celles décrites dans des textes, l'utilisation de séquences oligonucléotidiques chevauchantes des génomes adénoviraux, la réaction en chaîne de la polymérase, et
5 tout procédé approprié qui fournit la séquence nucléotidique souhaitée. Les procédés particulièrement appropriés comprennent des procédés de recombinaison homologue classiques tels que ceux fournis dans Colloca et al. (2012) *Sci. Transl. Med.* 4: 1-9 ; Roy et al.
10 (2004) *Virology* 324: 361-372 ; Roy et al. (2010) *J. of Gene Med.* 13: 17-25 ; et WO 2010/085984 ou des procédés de génie génétique médié par des recombinaisons tels que décrits dans Warming et al. *Nuc. Acids Res.* (2005) 33: e36.

15 De façon appropriée, une séquence adénovirale pour une utilisation dans la présente invention contiendra une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) au moins des gènes E1 et E4, éventuellement avec une inactivation fonctionnelle de E3 (comme une délétion),
20 conjointement avec une substitution du gène Ad5E4orf6.

Dans un mode de réalisation, l'adénovirus comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) des gènes E1 et E4, avec incorporation de E4orf6 provenant de l'Ad5. Dans de tels modes de réalisation,
25 l'adénovirus est dérivé de façon appropriée du ChAd155, ChAd3 ou ChAd63, particulièrement du ChAd3.

Dans un second mode de réalisation, l'adénovirus comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) des gènes E1, E3 et E4, avec incorporation de
30 E4orf6 provenant de l'Ad5. Dans de tels modes de réalisation, l'adénovirus est dérivé de façon

appropriée du ChAd155, ChAd3 ou ChAd63, particulièrement du ChAd63.

Production des vecteurs adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux peuvent être produits en
5 utilisant toute lignée cellulaire appropriée dans laquelle le virus est capable de se répliquer. En particulier, des lignées cellulaires de complémentation qui fournissent les facteurs manquant au vecteur viral, ce qui entraîne une altération de ses caractéristiques
10 de réplication (comme E1), peuvent être utilisées. Sans limitation, de telles lignées cellulaires peuvent être des cellules HeLa (No. d'accèsion ATCC CCL 2), A549 (No. d'accèsion ATCC CCL 185), HEK 293, KB (CCL 17), Detroit (par exemple, Detroit 510, CCL 72) et WI-38
15 (CCL 75), parmi d'autres. Ces lignées cellulaires sont toutes disponibles auprès de l'American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. D'autres lignées cellulaires parentes appropriées peuvent être obtenues auprès
20 d'autres sources, comme des cellules PER.C6TM, telles que représentées par les cellules déposées sous le no. ECACC 96022940 à l'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) au Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR, Royaume-Uni) ou des cellules Her 96
25 (Crucell).

Une lignée cellulaire de complémentation particulièrement appropriée est la lignée cellulaire Procell92. La lignée cellulaire Procell92 est basée sur des cellules HEK 293 qui expriment les gènes
30 adénoviraux E1, transfectées avec le répresseur Tet sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate

kinase-1 (PGK) humaine, et du gène de résistance au G418 (Vitelli et al. PLOS One (2013) 8(e55435): 1-9). Procell92.S est adaptée pour la croissance dans des conditions de suspension et est également utile pour la production de vecteurs adénoviraux exprimant des protéines toxiques (www.okairos.com/e/inner.php?m=00084, dernière consultation le 13 avril 2015).

Procédés d'administration d'adénovirus et dosage

Les vecteurs adénoviraux peuvent être administrés dans des compositions immunogènes. Une composition immunogène telle que décrite ici est une composition comprenant un ou plusieurs vecteurs recombinants capables d'induire une réponse immunitaire, par exemple une réponse humorale (par exemple, des anticorps) et/ou à médiation cellulaire (par exemple, un lymphocyte T cytotoxique), contre le produit du transgène administré par le vecteur à la suite d'une administration à un mammifère, de façon appropriée un être humain. Un adénovirus recombinant peut comprendre (de façon appropriée, dans l'une quelconque de ses délétions de gènes) un gène codant pour l'immunogène souhaité et, par conséquent, il peut être utilisé dans un vaccin.

De telles compositions vaccinales ou autres immunogènes peuvent être formulées dans un véhicule d'administration approprié. Généralement, les doses pour les compositions immunogènes se situent dans la plage définie ci-dessous sous « Procédés d'administration et dosage ».

Eventuellement, une composition vaccinale ou immunogène de l'invention peut être formulée pour contenir d'autres composants, y compris, par exemple,

des adjuvants, des stabilisants, des agents d'ajustement du pH, des conservateurs et analogues. Un adjuvant peut être administré avec un vaccin de sensibilisation à base d'ADN codant pour un antigène
5 afin d'amplifier la réponse immunitaire spécifique de l'antigène comparativement à la réponse immunitaire produite lors de la sensibilisation avec un vaccin à base d'ADN codant pour l'antigène uniquement.

Le vecteur adénoviral peut être préparé pour une
10 administration par une mise en suspension ou une dissolution dans un support pharmaceutiquement ou physiologiquement acceptable tel que le sérum physiologique isotonique ; une solution de sels isotoniques ou d'autres formulations qui seront
15 évidentes pour l'homme du métier. Le support approprié sera évident pour l'homme du métier et dépendra en grande partie de la voie d'administration. Les compositions décrites ici peuvent être administrées à un mammifère dans une formulation à libération
20 prolongée en utilisant un polymère biocompatible biodégradable, ou par une administration au site en utilisant des micelles, des gels et des liposomes.

Dans certains modes de réalisation, l'adénovirus recombinant de l'invention est administré à un sujet
25 par une injection intramusculaire, une injection intravaginale, une injection intraveineuse, une injection intrapéritonéale, une injection sous-cutanée, une administration épicutanée, une administration intradermique, une administration nasale ou une
30 administration orale. Une administration au poumon peut être également souhaitable. L'administration

intramusculaire peut être une voie typique, pour des raisons de simplicité et de praticité.

Si le régime thérapeutique implique la coadministration d'un ou de plusieurs vecteurs adénoviraux et d'un autre composant, chacun formulé dans des compositions différentes, ils sont administrés de façon favorable co-localement au niveau ou près du même site. Par exemple, les composants peuvent être administrés (par exemple, par l'intermédiaire d'une voie d'administration choisie parmi intramusculaire, transdermique, intradermique, sous-cutanée) du même côté ou à la même extrémité (administration « colatérale ») ou à des côtés ou des extrémités opposés (administration « controlatérale »).

Les dosages du vecteur viral dépendront principalement de facteurs tels que l'affection traitée, l'âge, le poids et l'état de santé du patient, et peuvent ainsi varier parmi les patients. Par exemple, un dosage humain adulte ou vétérinaire thérapeutiquement efficace du vecteur viral contient généralement 1×10^5 à 1×10^{15} particules virales, comme de 1×10^8 à 1×10^{12} (par exemple, 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , $2,5 \times 10^{10}$, 5×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} particules). En variante, un vecteur viral peut être administré à une dose qui est généralement de 1×10^5 à 1×10^{10} unités formant une plaque (PFU), comme 1×10^5 PFU, 5×10^5 PFU, 1×10^6 PFU, 5×10^6 PFU, 1×10^7 PFU, 5×10^7 PFU, 1×10^8 PFU, 5×10^8 PFU, 1×10^9 PFU, 5×10^9 PFU, ou 1×10^{10} PFU. Les dosages varieront selon la taille de l'animal et la voie d'administration. Par exemple, un

dosage pour l'être humain ou vétérinaire approprié (pour un animal d'environ 80 kg) pour une injection intramusculaire se situe dans la plage d'environ 1×10^9 à environ 5×10^{12} particules par ml, pour un
5 seul site. Eventuellement, des sites multiples d'administration peuvent être utilisés. Dans un autre exemple, un dosage pour l'être humain ou vétérinaire approprié peut se situer dans la plage d'environ 1×10^{11} à environ 1×10^{15} particules pour une
10 formulation orale.

Le vecteur adénoviral peut être quantifié par une analyse de PCR quantitative (Q-PCR), par exemple avec des amorces et une sonde conçues sur une région du promoteur du CMV en utilisant comme courbe d'étalonnage
15 une dilution en série de l'ADN plasmidique contenant le génome du vecteur avec une cassette d'expression comprenant le promoteur du HCMV. Le nombre de copies dans l'échantillon à tester est déterminé par le procédé d'analyse des lignes parallèles. Des procédés
20 alternatifs pour la quantification des particules de vecteur peuvent être la CLHP analytique ou un procédé spectrophotométrique basé sur l' $A_{260 \text{ nm}}$.

Généralement, une dose humaine sera dans un volume situé entre 0,5 ml et 2 ml. Ainsi, la composition
25 décrite ici peut être formulée dans un volume, par exemple, de 0,5, 1,0, 1,5 ou 2,0 ml de dose humaine par individu ou de composants immunogènes combinés. Un volume de 400 à 600 μl , comme autour de 500 μl est généralement utilisé, en particulier pour une
30 administration par la voie intramusculaire.

L'homme du métier peut ajuster ces doses, selon la voie d'administration et l'application thérapeutique ou vaccinale pour laquelle le vecteur recombinant est employé. Les taux d'expression du transgène, ou pour un
5 adjuvant, le taux d'anticorps circulants, peuvent être contrôlés pour déterminer la fréquence d'administration du dosage.

Les taux thérapeutiques, ou le taux de réponse immunitaire contre, la protéine codée par le transgène
10 choisi peuvent être contrôlés pour déterminer le besoin, le cas échéant, de rappels. A la suite d'une estimation de la réponse des lymphocytes T CD8+, ou éventuellement, des titres en anticorps, dans le sérum, des immunisations de rappel éventuelles peuvent être
15 souhaitées. Eventuellement, le vecteur adénoviral peut être administré en une seule administration ou dans divers régimes combinés, par exemple, en combinaison avec un régime ou un cours de traitement impliquant d'autres principes actifs ou dans un régime de
20 sensibilisation-rappel.

Transgène M72

Un autre aspect de la présente invention concerne un nouveau polynucléotide codant pour un antigène M72 qui a été optimisé pour une utilisation dans la
25 présente invention mais qui aura également une utilité dans d'autres contextes. Par conséquent, l'invention fournit également un polynucléotide comprenant SEQ ID NO : 8 ou l'un de ses variants dégénérés présentant au moins 95 % d'identité avec SEQ ID NO : 8
30 (comme au moins 98 % d'identité, de façon appropriée au moins 99 % d'identité, en particulier au moins 99,5 %

d'identité et spécialement 100 % d'identité). Il est également fourni, un polynucléotide constitué de SEQ ID NO : 8 ou de l'un de ses variants dégénérés présentant au moins 95 % d'identité avec SEQ ID NO : 8
5 (comme au moins 98 % d'identité, de façon appropriée au moins 99 % d'identité, en particulier au moins 99,5 % d'identité et spécialement 100 % d'identité). Par le terme variant dégénéré, il est signifié un variant du polynucléotide qui code pour le même polypeptide.

10 Le polynucléotide optimisé aide à garantir que les bénéfices de la présente invention sont pleinement obtenus par l'intermédiaire d'une expression efficace des transgènes dans des cellules humaines.

Constructions adénovirales

15 Un autre aspect de la présente invention concerne de nouvelles constructions adénovirales d'utilisation dans la présente invention mais ayant également une utilité dans d'autres contextes. Par conséquent, l'invention fournit également un adénovirus simien non
20 humain comprenant un transgène codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ou Rv0125. De façon appropriée, l'adénovirus simien non humain comprend un penton de SEQ ID NO : 10, un hexon de SEQ ID NO : 11 ou une fibre de SEQ ID NO : 12, en particulier un penton de
25 SEQ ID NO : 10, un hexon de SEQ ID NO : 11 et une fibre de SEQ ID NO : 12. En variante, l'adénovirus simien non humain comprend un penton de SEQ ID NO : 15, un hexon de SEQ ID NO : 16 ou une fibre de SEQ ID NO : 17, en particulier un penton de SEQ ID NO : 15, un hexon de
30 SEQ ID NO : 16 et une fibre de SEQ ID NO : 17. En outre, l'adénovirus simien non humain peut comprendre un

penton de SEQ ID NO : 20, un hexon de SEQ ID NO : 21 ou une fibre de SEQ ID NO : 22, en particulier un penton de SEQ ID NO : 21, un hexon de SEQ ID NO : 22 et une fibre de SEQ ID NO : 23.

5 Le transgène codant pour un antigène apparenté à Rv1196 peut être une séquence codant pour un polypeptide comprenant, comme constitué de, une séquence présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 1, spécialement au moins 95 %, par exemple
10 au moins 98 %, comme au moins 99 % avec SEQ ID NO : 1, comme SEQ ID NO : 1.

Le transgène codant pour un antigène apparenté à Rv0125 peut être une séquence codant pour un polypeptide comprenant, comme constitué de, une
15 séquence présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 3, spécialement au moins 95 %, par exemple au moins 98 %, comme au moins 99 % avec SEQ ID NO : 3, comme SEQ ID NO : 3.

De façon appropriée, le transgène codera pour un
20 antigène comprenant (comme constitué de) une séquence présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 6. En variante, le transgène codera pour un antigène comprenant (comme constitué de) un fragment de SEQ ID NO : 6 qui a une longueur d'au moins 450 acides
25 aminés. Dans certains modes de réalisation, le transgène codera pour un antigène comprenant (comme constitué de) les acides aminés 2 à 723 de SEQ ID NO : 6. De façon appropriée, le transgène comprend SEQ ID NO : 8 ou l'un de ses variants
30 dégénérés présentant au moins 95 % d'identité avec

SEQ ID NO : 8. Dans certains modes de réalisation, le transgène comprend SEQ ID NO : 8.

De façon appropriée, l'adénovirus est déficient pour la réplication. Par exemple, l'adénovirus comprend
5 une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E1. L'adénovirus peut comprendre une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E4. L'adénovirus peut également comprendre une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E3.
10 L'adénovirus peut également comprendre une substitution du gène Ad5E4orf6.

Des exemples de constructions d'adénovirus selon l'invention sont ceux ayant la séquence nucléotidique de SEQ ID NO : 13 ou 18.

15 Un aspect supplémentaire de l'invention est une séquence polynucléotidique comprenant SEQ ID NO : 13 ou 18, comme une séquence polynucléotidique constituée de SEQ ID NO : 13 ou 18.

Régimes d'immunisation, populations cibles et modes
20 d'administration

Dans un mode de réalisation, le sujet reçoit une seule dose de l'antigène polypeptidique et une seule dose de l'adénovirus associé. Dans d'autres modes de réalisation, le sujet reçoit deux doses de l'antigène polypeptidique et une seule dose de l'adénovirus associé (la dose supplémentaire de l'antigène polypeptidique peut être donnée avant l'initiation des
25 procédés classiques protéine/adénovirus ou adénovirus/protéine ou à la suite de la complétion des procédés classiques). Dans d'autres modes de réalisation, le sujet reçoit une dose de l'antigène
30

polypeptidique et deux doses de l'adénovirus associé (la dose supplémentaire de l'adénovirus associé peut être donnée avant l'initiation des procédés classiques protéine/adénovirus ou adénovirus/protéine ou à la suite de la complétion des procédés classiques).
5 Lorsque deux doses d'adénovirus codant pour l'antigène sont fournies, elles peuvent utiliser ou pas la même souche d'adénovirus et le même insert.

Lorsque le sujet reçoit deux doses d'antigène polypeptidique, de façon appropriée, la dose
10 supplémentaire est d'une semaine à trois mois, en particulier de deux semaines à deux mois, généralement de trois semaines à six semaines, comme de trois semaines à cinq semaines, par exemple autour de
15 quatre semaines avant l'initiation ou à la suite de la complétion du procédé classique.

Lorsque le sujet reçoit deux doses d'adénovirus associé, de façon appropriée, la dose supplémentaire est d'une semaine à trois mois, en particulier de
20 deux semaines à deux mois, généralement de trois semaines à six semaines, comme de trois semaines à cinq semaines, par exemple autour de quatre semaines avant l'initiation ou à la suite de la complétion du procédé classique.

25 Le sujet à traiter en utilisant le procédé de l'invention peut être d'un âge quelconque. Dans un aspect de l'invention, le sujet est un être humain.

Dans un mode de réalisation, le sujet est un être humain adulte (généralement âgé de 18 à 60 ans).

30 Les compositions du polypeptide et de l'adénovirus peuvent être administrées par diverses voies

appropriées, y compris une administration parentérale, comme intramusculaire ou sous-cutanée.

Dans un mode de réalisation particulier, les une ou plusieurs compositions sont administrées par voie
5 intradermique. Le terme intradermique tel qu'utilisé ici est prévu se rapporter à l'application d'antigènes dans le derme et/ou l'épiderme de la peau humaine. L'application intradermique d'une composition immunogène peut être effectuée en utilisant un procédé
10 cutané quelconque connu de l'homme du métier y compris, mais n'y étant pas limité, une administration en utilisant un dispositif à aiguille courte (un dispositif comprenant une micro-aiguille dont la longueur se situe entre environ 0,2 et environ 0,6 mm)
15 ou une utilisation en utilisant un patch cutané. Des dispositifs appropriés pour une utilisation avec les vaccins cutanés décrits ici comprennent des dispositifs à aiguille courte tels que ceux décrits dans les documents US 4 886 499, US 5 190 521, US 5 328 483,
20 US 5 527 288, US 4 270 537, US 5 015 235, US 5 141 496, US 5 417 662 et EP 1092444. Les vaccins cutanés peuvent être également administrés par des dispositifs qui limitent la longueur de pénétration efficace d'une aiguille dans la peau, tels que ceux décrits dans le
25 document WO 99/34850. Sont également appropriés, des dispositifs d'injection à jet qui administrent des vaccins liquides dans le derme à l'aide d'un injecteur de jet liquide ou à l'aide d'une aiguille. Sont également appropriés, des dispositifs balistiques
30 d'administration de poudre/particules qui utilisent du gaz comprimé pour accélérer le vaccin sous forme de

poudre à travers les couches externes de la peau jusqu'au derme. Les patches cutanés comprendront généralement une plaque d'appui qui comprend un substrat solide. Les patches administrent l'antigène et l'adjuvant utilisés dans l'invention au derme ou à l'épiderme. Dans un mode de réalisation particulier, les patches utiles dans la présente invention comprennent une pluralité de microprojections. Les microprojections peuvent être de toute forme appropriée pour percer la couche cornée, l'épiderme et/ou le derme et administrer l'antigène et l'adjuvant à l'épiderme ou au derme. Dans un mode de réalisation particulier, les microprojections sont biodégradables et comprennent un polymère biodégradable.

Dans une variante d'approche, le polypeptide peut être administré par voie intramusculaire et l'adénovirus administré par voie intranasale ou par aérosol aux poumons.

De façon appropriée, les deux compositions sont administrées par voie intramusculaire.

Les compositions immunogènes utilisées dans l'invention peuvent être fabriquées en mélangeant le ou les antigènes et l'adjuvant. Le ou les antigènes peuvent être fournis sous une forme lyophilisée ou dans une formulation liquide. Il peut être fourni un kit comprenant un premier récipient comprenant l'antigène et un second récipient comprenant l'adjuvant.

De façon appropriée, les compositions selon la présente invention ont un volume de dose humaine situé entre 0,05 ml et 1 ml, comme entre 0,1 et 0,5 ml, en particulier un volume de dose d'environ 0,5 ml, ou

0,7 ml. Le volume de la seconde composition immunogène peut être réduit, et se situer, par exemple, entre 0,05 ml et 0,5 ml, comme entre 0,1 et 0,2 ml. Les volumes des compositions utilisés peuvent dépendre de la voie d'administration avec des doses plus petites étant données par la voie intradermique.

Les autres modes de réalisation de l'invention comprennent :

(a) Un adénovirus simien non humain comprenant un transgène codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ou Rv0125, ledit adénovirus comportant au moins le penton de SEQ ID NO : 20, l'hexon de SEQ ID NO : 21 ou la fibre de SEQ ID NO : 22.

(b) L'adénovirus simien non humain selon (a), comprenant les protéines penton (SEQ ID NO : 20), hexon (SEQ ID NO : 21) et fibre (SEQ ID NO : 22) de ChAd155.

(c) L'adénovirus simien non humain selon soit (a) soit (b) où l'antigène codé comprend une séquence présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 6.

(d) L'adénovirus simien non humain selon l'un quelconque de (a), (b) ou (c) où l'antigène codé comprend un fragment de SEQ ID NO : 6 qui a une longueur d'au moins 450 acides aminés, comme les acides aminés 2 à 723 de SEQ ID NO : 6.

(e) L'adénovirus simien non humain selon l'un quelconque de (a) à (d), qui est un adénovirus déficient pour la réplication.

(f) L'adénovirus simien non humain selon l'un quelconque de (a) à (e), où l'adénovirus comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E1.

(g) L'adénovirus simien non humain selon l'un quelconque de (a) à (f), où l'adénovirus comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E4.

5 (h) L'adénovirus simien non humain selon l'un quelconque de (a) à (g), où l'adénovirus comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E3.

10 (i) L'adénovirus simien non humain selon l'un quelconque de (a) à (e), où l'adénovirus comprend une substitution du gène Ad5E4orf6.

Les enseignements de toutes les références dans la présente demande, y compris les demandes de brevet et les brevets délivrés, sont incorporés ici en référence
15 dans leur intégralité. Une composition ou une méthode ou un procédé défini comme « comprenant » certains éléments doit être compris comme englobant une composition, une méthode ou un procédé (respectivement) constitué de ces éléments. L'invention va être en outre
20 décrite en référence aux exemples non limitatifs suivants.

Exemples

25 Exemple 1 - Production des vecteurs ChAd3 et ChAd63 codant pour la protéine M72

Fabrication des constructions

Une séquence d'ADN de M72 a été optimisée par GeneArt® (Life Technologies Corporation) pour
30 l'expression humaine (SEQ ID NO : 8). Selon des procédés classiques, la séquence d'ADN optimisée a été

synthétisée et clonée par GeneWiz® sous le contrôle du système promoteur du HCMV - TetO et de séquences polyA de la BGH dans le plasmide navette PVJ en utilisant les sites de restriction EcoRV-NotI. Ce plasmide a été
5 clivé par les enzymes de restriction SpeI et SgfI et recombiné dans le vecteur soit ChAd3 (avec délétions de E1 et E4) soit ChAd63 (avec délétions de E1, E3 et E4) par recombinaison homologue dans E. coli BJ5183.

En bref, la construction des vecteurs ChAd3 s'est
10 déroulée par l'intermédiaire des étapes fournies ci-dessous.

Le vecteur pChAd3 est dérivé du génome de l'adénovirus de chimpanzé de type 3 de type sauvage. L'adénovirus de chimpanzé de type 3 de type sauvage a
15 été isolé d'un jeune chimpanzé en bonne santé hébergé dans l'établissement du New Iberia Research Center (New Iberia Research Center; The University of Louisiana à Lafayette) en utilisant des procédures classiques. Le génome viral a été ensuite cloné dans un vecteur
20 plasmidique et ensuite modifié pour porter les modifications suivantes dans différentes régions du génome viral du ChAd3 :

- 1) la délétion de la région E1 (de la pb 460 à la pb 3543) du génome viral ;
- 25 2) la délétion de la région codante E4 entière de ChAd3 (couvrant les nucléotides 34634 à 37349 de la séquence de type sauvage du ChAd3) et la substitution par le gène Ad5E4orf6. La région délétée contenait la totalité de la région E4 à l'exception du promoteur
30 natif de E4 et du signal de polyadénylation.

La construction des vecteurs ChAd63 s'est déroulée par l'intermédiaire des étapes fournies ci-dessous.

L'adénovirus de chimpanzé de type 63 de type sauvage a été isolé d'un groupe de chimpanzés en bonne
5 santé hébergés dans l'établissement de New Iberia en utilisant des procédures classiques. Le génome viral a été ensuite cloné dans un vecteur plasmidique et ensuite modifié pour porter les modifications suivantes dans différentes régions du génome viral du ChAd63 :

10 1) la délétion de la région E1 (de la pb 456 à la pb 3421) du génome viral ;

2) la délétion de la région E3 (de la pb 27208 à la pb 31786) du génome viral ;

3) la délétion de la région codante E4 entière du
15 ChAd63 (couvrant les nucléotides 33825 à 36216 de la séquence de type sauvage du ChAd63) et la substitution par le gène Ad5E4orf6. La région délétée contenait la totalité de la région E4 à l'exception du promoteur natif de E4 et du signal de polyadénylation.

20 Test de confirmation

Des virus récupérés et des virus d'amplification (du passage 1 au passage 4) ont été produits dans la lignée cellulaire procell-92.S selon des procédures classiques et la structure génétique des ADN viraux a
25 été vérifiée au passage 3 (M72-ChAd63) ou au passage 4 (M72-ChAd3) par deux schémas de restriction différents. Chaque virus recombinant a été purifié à partir d'une culture à l'échelle de 1 litre par l'intermédiaire d'un procédé à gradient de CsCl. Les virus purifiés ont été
30 titrés par PCR quantitative et l'infectivité a été mesurée par un procédé d'immunocoloration de l'hexon.

La bonne expression de M72 a été confirmée par Western blot, après infection d'une lignée cellulaire HeLa avec des virus purifiés. La stabilité génomique a été évaluée jusqu'au passage 10 et la séquence d'ADN de la cassette d'expression complète a été confirmée par séquençage.

Exemple 2 - Etude de la dose d'adénovirus chez des souris

10 Groupes testés

L'objectif de cette étude a été d'estimer et de comparer l'immunogénicité de 2 adénovirus de chimpanzé codant pour l'antigène M72 de la tuberculose : M72-ChAd3 et M72-ChAd63. Les adénovirus ont été produits selon l'exemple 1.

A des souris CB6F1/OlaHsd femelles âgées de 6 semaines, 12 souris par groupe, il a été injecté par la voie intramusculaire 50 µl au jour 0 (solution de ChAd3 : pH 7,4, 10 mM de TRIS, 10 mM d'histidine, 5 % de saccharose, 75 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,02 % de polysorbate 80, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % (v/v) d'éthanol ; solution de ChAd63 : pH 6,6, 10 mM d'histidine, 7,5 % de saccharose, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,1 % de polysorbate 80, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % (v/v) d'éthanol) :

25

| Groupe | Adénovirus | Nombre de particules virales |
|--------|------------|------------------------------|
| 1 | M72-ChAd3 | 10 ¹⁰ |
| 2 | M72-ChAd3 | 10 ⁹ |
| 3 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ |

30

| | | | |
|---|---|------------|-----------|
| 5 | 4 | M72-ChAd3 | 10^7 |
| | 5 | M72-ChAd63 | 10^{10} |
| | 6 | M72-ChAd63 | 10^9 |
| | 7 | M72-ChAd63 | 10^8 |
| | 8 | M72-ChAd63 | 10^7 |

Afin de disposer d'un volume suffisant, le sang total de 4 groupes de 3 souris pour les groupes a été prélevé aux jours 7, 14, et 21.

10 Mesure de la réponse immunitaire cellulaire - Coloration des cytokines intracellulaires (ICS)

Isolement des leucocytes à partir du sang total

15 A chaque point de temps, du sang a été prélevé à partir de chaque souris et ensuite groupé (4 groupes de 3 souris). Le sang a été prélevé dans des tubes contenant du RPMI/additifs (RPMI 1640, complémenté avec de la glutamine, de la pénicilline/streptomycine, du pyruvate de sodium, des acides aminés non essentiels et
20 du 2-mercaptoéthanol) contenant 5000 unités/ml d'héparine (héparine Leo). Dix volumes de tampon de lyse ont été ajoutés au sang total et les tubes ont été incubés à température ambiante (TA) pendant 10 min. Après centrifugation (335 g, 10 min à TA), le culot a
25 été récolté dans du RPMI/additifs et filtré (tamis cellulaire de 100 μ m). Les cellules ont été à nouveau centrifugées (335 g, 10 min à TA) et remises en suspension dans du milieu complet (RPMI 1640, complémenté avec de la glutamine, de la
30 pénicilline/streptomycine, du pyruvate de sodium, des

acides aminés non essentiels et du 2-mercaptoéthanol, et 5 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur).

Stimulation in vitro des leucocytes frais

Des leucocytes ont été déposés sur des plaques de 5 96 puits à fond arrondi à approximativement 1 million de cellules par puits. Les leucocytes ont été ensuite stimulés pendant 6 heures (37 °C, 5 % de CO₂) avec des anticorps anti-CD28 (clone 37.51) et anti-CD49d (clone 9C10) à 1 µg/ml, avec ou sans 1 µg/ml de peptides 10 couvrant la séquence de M72 (mélange de peptides 15-mer se chevauchant sur 11 résidus d'acides aminés). Après une période de stimulation de 2 heures, du réactif BD GolgiPlug™ contenant de la bréfeldine A dilué dans du milieu complet (dilution finale au 1/1000) a été ajouté 15 pendant 4 heures supplémentaires. Les plaques ont été ensuite transférées à 4 °C, pendant une nuit.

ICS de l'IFN γ , de l'IL-2, du TNF- α

Les cellules ont été colorées et analysées en utilisant un test ICS à 5 couleurs.

20 Les cellules ont été transférées dans des plaques de 96 puits à fond en forme de V, centrifugées à 189 g pendant 5 min à 4 °C après lavage avec 200 µl de tampon circulant (PBS 1X, 1 % de FCS), remises en suspension dans 50 µl de tampon circulant contenant des anticorps 25 anti-CD16/32 (clone 2.4G2) dilués au 1/50, pendant 10 min à 4 °C. Puis, 50 µl de tampon circulant contenant des anticorps anti-CD4-V450 (clone RM4-5, dilués au 1/50) et anti-CD8-PerCp-Cy5.5 (clone 53-6.7, dilués au 1/50) et du LIVE/DEAD® Pacific Orange (Life 30 Technologies, dilué au 1/500) ont été ajoutés pendant 30 min à 4 °C. Les cellules ont été centrifugées (189 g

pendant 5 min à 4 °C) et lavées avec 200 µl de tampon circulant.

Les leucocytes ont été fixés et perméabilisés par l'addition de 200 µl de solution Cytofix/Cytoperm (tampon commercial de Becton Dickinson) pendant 20 min à 4 °C. Les cellules ont été centrifugées (189 g pendant 5 min à 4 °C) et lavées avec 200 µl de tampon Perm/Wash (tampon commercial de Becton Dickinson dilué au 1/10 dans de l'eau distillée). Après une autre étape de centrifugation, les cellules ont été colorées dans 50 µl de tampon Perm/Wash avec des anticorps anti-IL2-FITC (clone JES6-5H4, dilués au 1/400), anti-IFNγ-APC (clone XMGl.2, dilués au 1/200) et anti-TNFα-PE (clone MP6-XT22, dilués au 1/700), pendant 1 heure à 4 °C. Les cellules ont été lavées deux fois avec le tampon Perm/Wash et remises en suspension dans 220 µl de PBS. Les cellules colorées ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant un LSRII et le logiciel FlowJo.

Résultats

Comme on peut le voir sur les figures 1 et 2 (réponse des lymphocytes T CD4 pour les constructions M72-ChAd3 et M72-ChAd63 respectivement) et sur les figures 3 et 4 (réponse des lymphocytes T CD8 pour les constructions M72-ChAd3 et M72-ChAd63 respectivement), une dose de 1×10^8 particules virales par souris a induit le taux le plus élevé de réponse spécifique de M72 au point de temps 14 PI pour les deux constructions M72-ChAd3 et M72-ChAd63.

Exemple 3 - Etude de l'impact de la coformulation de l'adénovirus et de l'adjuvant sur l'infectivité

L'impact de la coformulation a été évalué avec l'eGFP-ChAd3 ou l'eGFP-ChAd63 recombinant. Ces ChAd3 et ChAd63 sont des témoins construits pour exprimer la protéine fluorescente verte à la place du transgène M72 dans les squelettes respectifs d'adénovirus de chimpanzé (ChAd3 délété de E1-E4 et ChAd63 délété de E1-E3-E4). La coformulation avec l'AS01E (une formulation liposomique de l'agoniste du TLR4, le 3D-MPL, et de la saponine QS21) a été évaluée à l'aide d'un test d'infectivité basé sur des cellules HeLa.

Matériaux et procédés

Test d'infectivité

Des cellules HeLa ont été développées en croissance exponentielle et ensemencées pendant 24 h avant l'infection. Des cellules HeLa ont été utilisées entre les passages P45 et P65 (Molbiol ; GSK Rix).

Jour 0 : récolte des cellules

Le milieu a été prélevé du flacon et les cellules ont été rincées soigneusement avec du DPBS pour éliminer le milieu cellulaire résiduel. 5 ml de trypsine-EDTA ont été ajoutés sur les cellules, ceci suivi de l'observation des cellules sous microscope inversé jusqu'au détachement et la dispersion de la couche cellulaire (2 à 4 minutes). La suspension cellulaire a été doucement pipetée vers le haut et vers le bas et transférée dans le tube Falcon et centrifugée à 1200 tr/min pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans un volume approprié et compté. Les cellules ont été ensemencées dans une plaque de 96 puits à $1,5 \times 10^4$ cellules/puits (on s'attend à ce que les

cellules HeLa soient à 3×10^4 cellules/puits le jour de l'infection).

Jour 1 : jour de l'infection

Les cellules HeLa ont été observées et elles
5 étaient confluentes de 50 % à 80 %. Le milieu entier a
été prélevé des cellules. Les stocks d'eGFP-ChAd3 et
d'eGFP-ChAd63 recombinants ont été dilués jusqu'à un
titre final de 5×10^7 pv/ml dans 80 µl de milieu de
Eagle modifié par Dulbecco complet (DMEM). Ce volume
10 est pour 1 puits. 80 µl de chaque échantillon ont été
ajoutés dans chaque puits pour infecter (ceci est
réalisé en double). Un témoin négatif de cellules HeLa
non infectées avec une formulation avec des tampons
seuls dans du DMEM complet a été utilisé pour mesurer
15 tout impact négatif sur l'adéno-infectivité dû au
tampon de l'adjuvant. Un témoin positif de l'infection
de cellules HeLa infectées avec l'eGFP-ChAd3 (mêmes
conditions d'infection) a été traité dans des
conditions identiques. Après 3 heures à 37 °C, 5 % de
20 CO₂, 120 µl de DMEM complet ont été ajoutés et ensuite
les cellules ont été cultivées à 37 °C, 5 % de CO₂
pendant approximativement 24 heures.

Jour 2 : récolte et lecture de FACS

Les surnageants cellulaires ont été récoltés dans
25 une plaque de 96 puits. Les cellules HeLa ont été
rincées avec 40 µl de trypsine/EDTA et ensuite incubées
avec encore 40 µl du mélange trypsine/EDTA. Une fois
que les cellules se sont détachées de la plaque, chaque
puits a été alors doucement purgé pour récupérer toutes
30 les cellules. La plaque de 96 puits a été ensuite
centrifugée à 1200 tr/min pendant 10 minutes. Les

surnageants ont été jetés. Les cellules ont été mises en suspension dans 200 µl de DPBS et maintenues à 4 °C jusqu'à la réalisation de l'acquisition FACS sur celles-ci (LSRII Beckman Dickinson).

5 Résultats

| Groupe testé | Description | % de GFP | | | % de viabilité (moyenne) |
|--------------|---------------------------|----------|-------|---------|--------------------------|
| | | A | B | Moyenne | |
| 10 | 1 témoin DMEM | 0 | 0 | 0 | 89,14 |
| | 2 AS01E | 0 | 0 | 0 | 91,20 |
| | 3 AS01E + eGFP-ChAd3 | 81,9 | 84,79 | 83,35 | 89,01 |
| | 4 AS01E + eGFP-ChAd63 | 70,43 | 73,28 | 71,86 | 88,95 |
| | 5 tampon AS + eGFP-ChAd3 | 86,4 | 86,93 | 86,67 | 88,57 |
| 15 | 6 tampon AS + eGFP-ChAd63 | 69,59 | 71,38 | 70,49 | 87,49 |
| | 7 eGFP-ChAd3 | 78,78 | 81,29 | 80,04 | 90,96 |
| | 8 eGFP-ChAd63 | 51,43 | 53,46 | 52,45 | 90,41 |

tampon AS pH 8,0, 10 mM de PO₄, 5 mM de NaCl, 4,7 % de sorbitol

tampon ChAd3 : pH 7,4, 10 mM de TRIS, 10 mM d'histidine, 5 % de saccharose, 75 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,02 % de polysorbate 80, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % (v/v) d'éthanol

tampon ChAd63 : pH 6,6, 10 mM d'histidine, 7,5 % de saccharose, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,1 % de polysorbate 80, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % (v/v) d'éthanol

Les données sont exprimées en pourcentage de cellules exprimant la GFP en corrélation avec le nombre de cellules infectées par le virus ChAd-GFP. Pour toutes les conditions, la viabilité cellulaire a été enregistrée. Ceci a été réalisé pour estimer toute toxicité cellulaire possible qui pourrait fausser la conclusion. Heureusement, ceci n'a pas été le cas car

la viabilité cellulaire dans toutes les conditions a été acceptable et comparable.

Selon les données, aucun impact négatif de l'AS sur soit ChAd3- soit ChAd63-GFP n'est observé. Le vecteur ChAd3-GFP coformulé avec l'AS01E a gardé son potentiel d'infectivité, qui était comparable au ChAd3-GFP seul.

La même observation a été faite pour le ChAd63-GFP. Dans ce dernier cas, une augmentation de l'infectivité a même été observée, laquelle peut être due aux tampons utilisés dans lesquels l'adénovirus a été dilué.

Exemple 4 - Etude de l'impact de la coformulation de l'adénovirus et de l'adjuvant sur la neutralisation du QS21

L'objectif de l'étude a été de vérifier la détoxification du QS21.

Caractérisations

| Groupe | Description | Aspect visuel | H (bâtonnets) | Osmolalité (mOsm/kg) |
|--------|---|-----------------------|---------------|----------------------|
| 1 | AS01E | Opalescent | 5,5-6 | 291 |
| 2 | eGFP-ChAd3 à $2,10 \times 10^3$ dans AS01E | Légèrement opalescent | 5-5,5 | 289 |
| 3 | eGFP-ChAd63 à $2,10 \times 10^3$ dans AS01E | Légèrement opalescent | 5-5,5 | 297 |
| 4 | eGFP-ChAd3 à $2,10 \times 10^3$ dans le tampon AS01E | Limpide | 5-5,5 | 292 |
| 5 | eGFP-ChAd63 à $2,10 \times 10^3$ dans le tampon AS01E | Limpide | 5-5,5 | 304 |

| Groupe | Description | Aspect visuel | H (bâtonnets) | Osmolalité (mOsm/kg) |
|--------|----------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| 6 | eGFP-ChAd3 à $2,10 \times 10^9$ | Limpide | 7 | 425 |
| 7 | eGFP-ChAd63 à $2,10 \times 10^9$ | Limpide | 6-6,5 | 408 |

Les échantillons formulés contenant l'adjuvant ou le tampon de l'adjuvant ont une osmolalité ≥ 285 mOsm/kg. Le pH a été pris sur un bâtonnet indicateur.

Lavage des érythrocytes

Les érythrocytes (10 ml) ont été centrifugés pendant 10 min à 1600 tr/min (550 g) à 4 °C et le surnageant a été prélevé. Les érythrocytes ont été doucement remis en suspension avec un volume de tampon DPBS jusqu'au volume d'origine (± 10 ml). L'opération a été répétée (minimum de 2 à 3 fois) jusqu'à ce que le surnageant soit limpide (disparition de la coloration rougeâtre, mais le surnageant ne devient jamais complètement translucide) et on a ensuite éliminé le dernier surnageant après lavage. Le culot a été stocké à 4 °C pendant un maximum de 3 à 4 jours s'il n'est pas utilisé directement (et lavé à nouveau le jour où il est utilisé) et il a été dilué environ au 1/10 dans le tampon s'il est utilisé le même jour.

Prédilutions des érythrocytes

Il a été effectué différentes prédilutions des érythrocytes. La prédilution pour laquelle il est atteint 100 % de lyse avec une valeur de DO (540 nm) située entre 1,5 et 2 a été choisie.

Les dilutions suivantes ont été préparées dans des tubes d'hémolyse.

5

| Dilution | Erythrocytes | dPBS |
|----------|--------------|---------|
| 1/10 | 100 µl | 900 µl |
| 1/12,5 | 100 µl | 1150 µl |
| 1/15 | 100 µl | 1400 µl |

10

Les érythrocytes ont été centrifugés (10 ml) pendant 10 minutes à 1600 tr/min (550 g) à 4 °C. 100 µl de la prédilution ont été prélevés, mélangés avec 900 µl d'eau pour injectable et centrifugés pendant 15 5 minutes à 2000 tr/min (900 g). Le surnageant a été transféré dans une cuvette pour spectroscopie et la DO a été mesurée à 540 nm. La dilution choisie a donné une DO située entre 1,5 et 2.

Préparation de la courbe d'étalonnage du QS21

20

La courbe d'étalonnage du QS21 a été fabriquée à partir d'une solution de travail de QS21 (à 2 mg/ml) diluée extemporanément à 20 µg/ml dans du tampon PO₄/sorbitol.

25

La détermination de l'activité lytique a été réalisée par un test des limites.

1. La limite de détection (LOD) a été définie comme la concentration la plus basse de QS21 menant à une DO :

30

- supérieure au taux de base (DO > 0,1)
- autour de trois fois supérieure à la DO du tampon (le « 0 µg » du QS21)

- dans la partie ascendante de la courbe
- déterminée pour chaque test.

2. L'activité lytique du QS21 a été retenue comme étant positive dans les échantillons d'adjuvant si la DO pour l'échantillon d'adjuvant était supérieure à la DO_{LOD} .

Exemple de courbe du QS21

| Echantillons | QS21 (µg) | DO de l'échantillon | DO du tampon | Delta (DO de l'échantillon - DO du tampon) | *Accepté/ rejeté |
|----------------------|--------------|------------------------|-----------------|--|---------------------|
| AS01E | 45 | 0,151 | 0,122 | 0,029 | Accepté |
| ChAd3 dans AS01E | 45 | 0,148 | 0,122 | 0,026 | Accepté |
| ChAd63 dans AS01E | 45 | 0,143 | 0,122 | 0,021 | Accepté |

*Accepté : si le delta (DO de l'échantillon - DO du tampon) < LOD
(DO) du test du jour

*Rejeté : si le delta (DO de l'échantillon - DO du tampon) > LOD
(DO) du test du jour

Conclusion

Lors d'une formulation de l'eGFP-ChAd3 et de l'eGFP-ChAd63 séparément avec de l'AS01E, la taille de l'adjuvant demeure inchangée après la formulation. En outre, il n'y a pas de QS21 libre après la formulation, comme il est observé par le test de lyse des érythrocytes.

Exemple 5 - Régimes de dosage de M72

Evaluation de l'application de vecteurs adénoviraux de chimpanzé ne se répliquant pas exprimant

M72 dans le contexte d'un vaccin contre la tuberculose, par estimation des deux stratégies de vaccination par sensibilisation-rappel homologue (ChAd/ChAd) et hétérologue (Prot/ChAd ou ChAd/Prot) ainsi qu'en combinaison avec le M72/AS01E donné en mélange ou en coadministration.

Matériaux et procédés

Modèle animal

A des souris CB6F1/OlaHsd femelles - âgées de 6 semaines - 12 souris par groupe - il a été injecté par voie intramusculaire 50 µl aux jours 0 et 28 comme il est indiqué dans le tableau ci-dessous.

| Gr. | Administration J0 | | | Administration J28 | | |
|--|------------------------|-------------------------|---------------|------------------------|----------------------------|---------------|
| | Antigène | Dose | Solution | Antigène | Dose | Solution |
| Références | | | | | | |
| 1 | M72/AS01E | 1 µg | tampon AS | M72/AS01E | 1 µg | tampon AS |
| Sensibilisation : adénovirus/Rappel : protéine | | | | | | |
| 2 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 | M72/AS01E | 1 µg | tampon AS |
| 3 | M72-ChAd63 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd63 | | | |
| 4 | eGFP-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 | | | |
| Sensibilisation : protéine/Rappel : adénovirus | | | | | | |
| 5 | M72/AS01E | 1 µg | tampon AS | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 |
| 6 | | 1 µg | tampon AS | M72-ChAd63 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd63 |
| Sensibilisation : adénovirus + AS/Rappel : adénovirus + AS | | | | | | |
| 7 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon AS | M72-ChAd3/ AS01E | 10 ⁸ pv | tampon AS |
| Sensibilisation : adénovirus/Rappel : adénovirus | | | | | | |
| 8 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 |
| 9 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 | M72-ChAd63 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd63 |
| 10 | M72-ChAd63 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd63 | M72-ChAd3 | 10 ⁸ pv | tampon ChAd3 |
| Sensibilisation et rappel combinés : adénovirus + protéine | | | | | | |
| 11 | M72/AS01E M72-ChAd3 | 1 µg 10 ⁸ | tampon AS | M72/AS01E M72-ChAd3 | 1 µg 10 ⁸ pv | tampon AS |

| | | | | | | |
|---------|---|--------------------------------|---|---|-----------------------------|---|
| | combinés | pv | | combinés | | |
| 12 | M72/AS01E M72-ChAd3 coadministrés | 1 µg 10 ⁻⁸ pv | tampon AS (protéine adjuvée) et tampon ChAd3 (adénovirus) | M72/AS01E M72-ChAd3 coadministrés | 1 µg 10 ⁻⁸ pv | tampon AS (protéine adjuvée) et tampon ChAd3 (adénovirus) |
| 5 13 | M72/AS01E eGFP/ChAd3 combinés | 1 µg 10 ⁻⁸ pv | tampon AS | M72/AS01E eGFP/ChAd3 combinés | 1 µg 10 ⁻⁸ pv | tampon AS |

tampon AS : approximativement pH 8,0, 10 mM de PO₄, 5 mM de NaCl, 4,7 % de sorbitol

tampon ChAd3 : pH 7,4, 10 mM de TRIS, 10 mM d'histidine, 5 % de saccharose, 75 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,02 % de polysorbate 80, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % (v/v) d'éthanol

tampon ChAd63 : pH 6,6, 10 mM d'histidine, 7,5 % de saccharose, 35 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂, 0,1 % de polysorbate 80, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % (v/v) d'éthanol

10

| | | | | |
|----|-----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| | Liquide | Test | Point de temps du prélèvement | Commentaire |
| 15 | Sang total | ICS | J14 (14 PI) | Evaluation des réponses du sang total périphérique des lymphocytes CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène de la TB, déterminées par la mesure simultanée de l'IFNγ, de l'IL-2, du TNF-α, après restimulation avec des groupes de peptides 15-mer se chevauchant |
| 20 | Sang total/ Poumon | ICS | J42 (14 PII)* | Evaluation des réponses du sang total périphérique des lymphocytes CD4 et CD8 spécifiques de l'antigène de la TB, déterminées par la mesure simultanée de l'IFNγ, de l'IL-2, du TNF-α, de l'IL-17 après restimulation avec des groupes de peptides 15-mer se chevauchant |
| 25 | Sérum | Sérologie Ig totales anti-M72 | J41 (13 PII)** | |

*Limitations de +/- 36 prélèvements pulmonaires par jour, par conséquent

l'étude a été effectuée en plusieurs réplicats

30

**Pour des raisons pratiques, les échantillons de sérum ont été prélevés 1 jour
avant le sang total

Afin de disposer d'un volume suffisant, le sang total de 4 groupes de 3 souris pour les groupes a été prélevé aux jours 14, et 42. Au jour 42, le même procédé a été appliqué pour les poumons.

5 A cause des limitations de prélèvement par jour, un groupe de chaque groupe a été traité par jour - durant 4 jours afin de disposer de 4 groupes par groupe. Des sérums individuels ont été prélevés au jour 41.

10 Les souris ont été identifiées afin de faire le lien entre PI et PII pour les deux lectures d'ICS et de sérologie.

Réponse immunitaire cellulaire - Coloration des cytokines intracellulaires (ICS)

Isolement des leucocytes à partir du sang total

15 A chaque point de temps, du sang a été prélevé à partir de chaque souris et ensuite groupé (4 groupes de 3 souris). Le sang a été prélevé dans des tubes contenant du RPMI/additifs (RPMI 1640, complémenté avec de la glutamine, de la pénicilline/streptomycine, du pyruvate de sodium, des acides aminés non essentiels et
20 du 2-mercaptoéthanol) contenant de l'héparine (1/10). Dix volumes de tampon de lyse ont été ajoutés au sang total et les tubes ont été incubés à température ambiante (TA) pendant 10 min. Après centrifugation
25 (335 g, 10 min à TA), le culot a été récolté dans du RPMI/additifs et filtré (tamis cellulaire de 100 µm). Les cellules ont été à nouveau centrifugées (335 g, 10 min à TA) et remises en suspension dans du milieu complet (RPMI 1640, complémenté avec de la glutamine,
30 de la pénicilline/streptomycine, du pyruvate de sodium, des acides aminés non essentiels et du 2-mercapto-

éthanol, et 5 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur).

Isolement des leucocytes à partir du poumon

Le poumon a été prélevé dans des tubes contenant
5 du RPMI/additifs (RPMI 1640, complémenté avec de la glutamine, de la pénicilline/streptomycine, du pyruvate de sodium, des acides aminés non essentiels et du 2-mercaptoéthanol). L'échantillon a été transféré dans une boîte de Petri et le prélèvement a été découpé en
10 petits morceaux (approximativement 5 x 5 mm). Les prélèvements ont été remis en suspension dans un tube GentleMACS C (violet) contenant 10 ml de milieu complet préchauffé contenant de la Libérase (0,0625 UI/ml = 50 µl) + DNase (25 µg = 25 µl). Le tube C a été fixé la
15 tête en bas dans le manchon du dissociateur GentleMACS le programme poumon de souris 02 (40 s) a été exécuté. A la fin du programme, le tube C tube a été détaché et incubé pendant 30 min à 37 °C dans un incubateur sous agitation. Après l'incubation, l'échantillon a été
20 transféré sur un tamis cellulaire (100 µm) placé sur un tube Falcon de 50 ml. Le tamis cellulaire a été rincé deux fois avec 5 ml de milieu complet (RPMI 1640, complémenté avec de la glutamine, de la pénicilline/streptomycine, du pyruvate de sodium, des
25 acides aminés non essentiels et du 2-mercaptoéthanol, et 5 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur). Du milieu complet a été ajouté jusqu'à 45 ml. Les cellules ont été centrifugées (400 g pendant 10 min - 4 °C), le surnageant a été aspiré et ensuite les
30 cellules ont été remises en suspension dans 10 ml de milieu complet. Cette étape de lavage a été répétée.

Après le second lavage, les cellules ont été remises en suspension dans 3 ml de Percoll P30. La couche de Percoll P30 contenant les cellules a été placée au-dessus du gradient des couches Percoll P40/P75. Les
5 cellules ont été centrifugées pendant 20 min à 754 g à TA. Les cellules considérées se situaient à l'interphase entre P40 et P75 à la fin de la centrifugation (interphase inférieure). La couche P30 a été aspirée et les cellules ont été recueillies à
10 l'interphase P40-P75. Les cellules ont été recueillies dans un tube de 15 ml et du milieu complet a été ajouté jusqu'à un volume final de 15 ml. Les cellules ont été centrifugées (900 g pendant 10 min - 4 °C). Le surnageant a été aspiré et les cellules ont été lavées
15 deux fois avec 15 ml de milieu complet. Le culot a été remis en suspension avec du milieu complet jusqu'à un volume final de 250 µl. Les cellules ont été comptées par le procédé Macsquant incluant la viabilité avec du PI.

20 Stimulation *in vitro* des leucocytes frais

Des leucocytes ont été déposés sur des plaques de 96 puits à fond arrondi à approximativement 1 million de cellules par puits. Les leucocytes ont été ensuite stimulés pendant 6 heures (37 °C, 5 % de CO₂) avec des
25 anticorps anti-CD28 (clone 37.51) et anti-CD49d (clone 9C10) à 1 µg/ml, avec ou sans 1 µg/ml de peptides couvrant la séquence de M72. Après une stimulation de 2 heures, du réactif BD GolgiPlug[™] contenant de la bréfeldine A dilué dans du milieu complet (dilution
30 finale au 1/1000) a été ajouté pendant encore 4 heures.

Les plaques ont été ensuite transférées à 4 °C, pendant une nuit.

ICS de l'IFN γ , de l'IL-2, du TNF- α - à 14 PI - Sang total (WBLO)

- 5 Les cellules ont été colorées et analysées en utilisant un test ICS à 5 couleurs.

Les cellules ont été transférées dans des plaques de 96 puits à fond en forme de V, centrifugées à 189 g pendant 5 min à 4 °C après lavage avec 200 μ l de tampon circulant (PBS 1X, 1 % de FCS), les cellules ont été
10 remises en suspension dans 50 μ l de tampon circulant contenant des anticorps anti-CD16/32 (clone 2.4G2) dilués au 1/50, pendant 10 min à 4 °C. Ensuite, 50 μ l de tampon circulant contenant des anticorps anti-CD4-
15 V450 (clone RM4-5, dilués au 1/50) et anti-CD8-PerCp-Cy5.5 (clone 53-6.7, dilués au 1/50) et du réactif Live&Dead PO (dilué au 1/500) ont été ajoutés pendant 30 min à 4 °C. Les cellules ont été centrifugées (189 g pendant 5 min à 4 °C) et lavées avec 200 μ l de tampon
20 circulant.

Les leucocytes ont été fixés et perméabilisés par l'addition de 200 μ l de solution Cytofix/Cytoperm (tampon commercial de Becton Dickinson) pendant 20 min à 4 °C. Les cellules ont été centrifugées (189 g
25 pendant 5 min à 4 °C) et lavées avec 200 μ l de tampon Perm/Wash (tampon commercial de Becton Dickinson dilué au 1/10 dans de l'eau distillée). Après une autre étape de centrifugation, les cellules ont été colorées dans 50 μ l de tampon Perm/Wash avec des anticorps anti-IL2-
30 FITC (clone JES6-5H4, dilués au 1/400), anti-IFN γ -APC (clone XMG1.2, dilués au 1/200) et anti-TNF α -PE (clone

MP6-XT22, dilués au 1/700), pendant 1 heure à 4 °C. Les cellules ont été lavées deux fois avec le tampon Perm/Wash et remises en suspension dans 220 µl de PBS. Les cellules colorées ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant un LSRII et le logiciel FlowJo.

ICS de l'IFNg, de l'IL-2, du TNF-a et de l'IL-17 à 14 PII - Sang total (WBLO) et poumon

Le même protocole a été utilisé à l'exception de l'étape des cytokines ; les cellules ont été colorées dans 50 µl de tampon Perm/Wash avec des anticorps anti-IL2-FITC (clone JES6-5H4, dilués au 1/400), anti-IFNg-APC (clone XMGI.2, dilués au 1/200) et anti-TNFa-PE (clone MP6-XT22, dilués au 1/700), anti-IL17 BV786 (clone TC11-18H10, dilués 1/50), pendant 1 heure à 4 °C.

Réponse humorale - Sérologie des Ig totales anti-M72 par un test ELISA

Des plaques ELISA de 96 puits ont été revêtues de l'antigène M72 recombinant à 0,25 µg/ml dans du PBS et incubées pendant une nuit à 4 °C. Les sérums provenant des souris vaccinées à Post II ont été dilués au 1/5000 ou au 1/40 000 pour la répétition, dans du PBS (0,2 %) - BSA et ensuite une dilution en série au 1/2 est effectuée du puits 1 à 12 et incubée. Les dilutions en série du matériau étalon et témoin ont été utilisées pour calculer les titres des étalons des anticorps anti-M72 des sérums testés et pour garantir la validité du test. Les plaques ont été lavées avec du tampon PBS 0,1 % Tween 20 après chaque étape d'incubation. Un anticorps de chèvre biotinylé spécifique des Ig de souris est ensuite ajouté et le complexe antigène-anticorps est révélé par incubation avec un complexe

streptavidine-peroxydase et un substrat de la peroxydase, le dichlorhydrate d'orthophénylènediamine/H₂O₂. Les densités optiques (DO) ont été enregistrées à 490-620 nm. Le titre en anticorps anti-M72 de chaque sérum de souris individuel est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du test ELISA en utilisant un modèle de régression et exprimé en unités ELISA (UE)/ml. Les titres moyens géométriques (TMG) sont ensuite calculés pour chaque groupe de souris.

Résultats

Réponses des lymphocytes T

A. Réponse des lymphocytes T CD4 et T CD8 spécifiques de M72

Pour évaluer l'application de vecteurs adénoviraux de chimpanzé ne se répliquant pas exprimant M72 dans le contexte d'un vaccin contre la tuberculose, les deux stratégies de vaccination par sensibilisation-rappel homologue (ChAd/ChAd) et hétérologue (Prot/ChAd ou ChAd/Prot) ont été estimées ainsi qu'en combinaison avec M72/AS01E4 donné en mélange ou en coadministration. Les stratégies de sensibilisation/rappel et de combinaison ont été évaluées dans un calendrier de J0-J28. Le sang total a été prélevé à 14 PI et 14 PII pour estimer l'induction systémique des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de M72.

Parmi tous les groupes, il a été observé une réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques dans le sang total avec le pic de réponse se situant au-dessous de 3 % (figures 5 et 6). Les taux les plus élevés de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le sang total

ont été observés avec les stratégies de vaccination hétérologue (Prot/ChAd ou ChAd/Prot) (figure 5). La sensibilisation des souris avec les vecteurs M72-ChAd et le rappel avec M72/AS01E ont induit un taux supérieur de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 par rapport à l'opposé et dans les deux cas le M72-ChAd3 a été plus puissant que le M72-ChAd63 (figure 5). La vaccination par sensibilisation-rappel avec les vecteurs M72-ChAd, soit homologue (M72-ChAd3/M72-ChAd3) +/- AS01E, soit hétérologue (M72-ChAd3/M72-ChAd63 ou M72-ChAd63/M72-ChAd3), n'a pas fourni de valeur ajoutée en termes d'ampleur de la réponse des lymphocytes T CD4 comparativement à la référence de M72/AS01E (figure 6). La combinaison à la fois de M72-ChAd3 et de M72/AS01E a légèrement induit un taux supérieur de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 comparativement à la référence de M72/AS01E, mais inférieur à la vaccination par sensibilisation-rappel hétérologue (Prot/ChAd ou ChAd/Prot). La coadministration a induit des taux similaires de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 par rapport aux combinaisons suggérant que la proximité physique n'est pas requise (figure 6).

Le taux de lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 a été trouvé fortement augmenté chez les souris recevant un vecteur M72-ChAd soit en sensibilisation, soit en rappel soit les deux. Lorsque le vecteur M72-ChAd a été inclus durant la sensibilisation, le taux de lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 n'a pas encore augmenté après le rappel sauf lorsque les souris ont été sensibilisées avec M72-ChAd63 et ont reçu un rappel avec M72-ChAd3 (figures 7 et 8). Ceci suggère également

que le M72-ChAd3 est plus puissant que le M72-ChAd63. Le rappel avec M72/AS01E de la sensibilisation avec M72-ChAd3 a induit des taux supérieurs de lymphocytes T CD8 (médiane = 30 %) par rapport à M72-ChAd63 (médiane = 17 %). L'addition de M72-ChAd3 à la protéine M72 adjuvée dans une combinaison a également fortement augmenté le taux de lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 (médiane = 13 %) comparativement à la référence actuelle (médiane = 0,2 %).

10 Le même profil général de réponse a été observé dans le poumon (figure 9) comparativement au sang total (figures 5 et 6) à l'exception de la stratégie de vaccination par la combinaison mélangée. Dans les poumons, la stratégie de combinaison a induit un taux
15 inférieur de réponse par rapport au sang total, ce qui fait que l'on a pu observer un taux comparable de lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 avec le vaccin de combinaison et avec la vaccination par sensibilisation-rappel hétérologue (Prot/ChAd ou ChAd/Prot), tous
20 présentant une augmentation du taux des lymphocytes T CD4 comparativement à la référence actuelle.

Le profil général de la réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 dans les poumons (figure 10) a également reflété ce qui a été observé dans le sang
25 total (figures 7 et 8). Des taux très bas de réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques ont été observés lorsque les souris ont reçu la référence M72/AS01E (figure 10) et l'addition du vecteur M72-ChAd a fortement amélioré le taux des lymphocytes T CD8. Le
30 taux le plus élevé de lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 a été observé lorsque les souris ont été

sensibilisées avec le M72/AS01E et ont reçu un rappel avec le M72-ChAd3 (médiane = 36 % - Figure 10).

B. Profil des cytokines des réponses des lymphocytes T CD4 et CD8 spécifiques de M72

- 5 Dans les groupes qui ont été sensibilisés avec le M72/AS01E, la réponse des lymphocytes T CD4+ spécifiques de M72 comprenait surtout des cellules à sécrétion double (IL-2/TNF α) dans le sang total à 14 PI (figures 11 et 12). Au contraire, la sensibilisation
- 10 avec un vecteur M72-ChAd a induit une réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 polyfonctionnels avec une majorité de lymphocytes T CD4 triplement positifs (IL-2/IFN γ /TNF α), et dans une moindre mesure, à production double (IFN γ /TNF α) et simple (IFN γ
- 15 uniquement) (figures 11 et 12). La combinaison à la fois de la protéine et du vecteur ChAd a induit des taux bas de lymphocytes T CD4 à production triple (IL2/IFN γ /TNF α), et double (IFN γ /TNF α) (figures 11 et 12).
- 20 Un profil similaire d'expression des cytokines par les lymphocytes T CD4+ a été observé à 14 PII dans le sang total (figures 13 et 14) et dans les poumons (figures 15 et 16) dans tous les groupes où la stratégie de vaccination comprenait un vecteur M72-ChAd.
- 25 La réponse des lymphocytes T CD4+ spécifiques de M72 comprenait de façon prédominante des cellules triples (IL2/IFN γ /TNF α) et doubles (IFN γ /TNF α) positives. Comparativement à la référence, il a été observé un taux réduit de cellules sécrétrices d'IL-2/TNF α et un
- 30 taux accru de cellules sécrétrices d'IFN γ /TNF α en présence d'un vecteur M72-ChAd. La sécrétion d'IL-17 a

été également estimée à 14j PII à la fois dans le sang total et dans les poumons. Toutefois, les taux détectés étaient extrêmement bas dans toutes les conditions.

Des profils similaires des cytokines des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 ont été observés parmi tous les groupes positifs dans le sang total à 14 PI (figures 17 et 18), à 14 PII (figures 19 et 20) ainsi que dans les poumons à 14 PII (figures 21 et 22). Les réponses des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 ont été principalement composées de lymphocytes T CD8 à production double (IFN γ /TNF α) et simple (IFN γ uniquement). Des lymphocytes T CD8+ produisant des taux bas d'IL-2/IFN γ /TNF α et des taux très bas de TNF α ont été également détectés.

Globalement, la stratégie de la vaccination n'a pas eu d'impact considérable sur le profil des cytokines des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72.

Réponses des anticorps

A. Sérologie des Ig totales anti-M72

Comme il est représenté sur la figure 23, la sérologie des Ig totales anti-M72 a été hautement variable parmi tous les groupes et des non-répondeurs ont été observés avec toutes les stratégies de vaccination sauf dans l'approche combinée donnée en coadministration. En ce qui concerne la réponse des lymphocytes T, le M72-ChAd3 semble plus puissant que le M72-ChAd63 dans l'induction d'une réponse immunitaire car le nombre d'animaux non-répondeurs est augmenté lorsque le M72-ChAd63 est utilisé.

Dans tout le mémoire et dans toutes les revendications qui suivent, à moins que le contexte s'y

oppose, le terme « comprendre », et des variations telles que « comprend » et « comprenant » devra être compris comme impliquant l'inclusion d'un nombre entier, d'une étape, d'un groupe de nombres entiers ou d'un
5 groupe d'étapes indiqué mais pas l'exclusion de tout autre nombre entier, étape, groupe de nombres entiers ou groupe d'étapes.

Tous les documents auxquels il est fait référence ici, y compris les brevets et les demandes de brevet,
10 sont incorporés en référence dans leur intégralité.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation ci-dessus décrits et représentés, à partir desquels on pourra prévoir d'autres modes et d'autres formes de réalisation, sans
15 pour autant sortir du cadre de l'invention.

20

25

30

REVENDICATIONS

1. Procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant :

(i) l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet, suivie de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ; ou

(ii) l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet, suivie de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

2. Procédé pour induire une réponse immunitaire chez un sujet comprenant :

(i) l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet ; ou

(ii) l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 comprenant :

(i) l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet, suivie de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ; ou

(ii) l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196,

suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 au sujet.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2 comprenant :

5 (i) l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet, suivie de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 ; ou

(ii) l'administration d'un adénovirus simien non
10 humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, suivie de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 au sujet.

5. Antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse
15 immunitaire chez un sujet où :

(i) l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ; ou

20 (ii) un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

6. Adénovirus simien non humain codant pour un
25 antigène apparenté à Rv1196, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où :

(i) un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène
30 apparenté à Rv1196 ; ou

(ii) l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

5 7. Utilisation d'un antigène peptidique apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un
10 adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

 8. Utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une
15 réponse immunitaire chez un sujet où un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196.

 9. Utilisation d'un antigène polypeptidique
20 apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'antigène polypeptidique
25 apparenté à Rv1196.

 10. Utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une
réponse immunitaire chez un sujet où l'adénovirus
30 simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est administré au sujet, suivi de

l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196.

11. Antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où :

(i) l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 ; ou

10 (ii) un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

12. Adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, pour une utilisation dans l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où :

(i) un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 ; ou

(ii) l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

13. Utilisation d'un antigène peptidique apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

14. Utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125.

15. Utilisation d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration de l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

16. Utilisation d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, dans la fabrication d'un médicament destiné à l'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est administré au sujet, suivi de l'administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125.

17. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 5 à 10 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 comprend une séquence présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 1.

18. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 5 à 10 où l'antigène polypeptidique apparenté à

Rv1196 comprend un fragment de SEQ ID NO : 1 qui a une longueur d'au moins 200 acides aminés.

19. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
5 à 3 ou 5 à 10, 17 ou 18 où l'antigène polypeptidique
apparenté à Rv1196 comprend une séquence présentant au
moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 1.

20. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
10 à 3 ou 5 à 10, 17 ou 18 où l'antigène polypeptidique
apparenté à Rv1196 comprend un fragment de
SEQ ID NO : 1 qui a une longueur d'au moins 200 acides
aminés.

21. Procédé, utilisation, polypeptide ou
15 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1,
2, 4 ou 11 à 16 où l'antigène polypeptidique apparenté
à Rv0125 comprend une séquence présentant au moins 90 %
d'identité avec SEQ ID NO : 3.

22. Procédé, utilisation, polypeptide ou
20 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1,
2, 4 ou 11 à 16 où l'antigène polypeptidique apparenté
à Rv0125 comprend un fragment de SEQ ID NO : 3 qui a
une longueur d'au moins 150 acides aminés.

23. Procédé, utilisation, polypeptide ou
25 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1,
2, 4 ou 11 à 16, 21 ou 22 où l'antigène polypeptidique
apparenté à Rv0125 comprend une séquence présentant au
moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 3.

24. Procédé, utilisation, polypeptide ou
30 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 3 ou 5 à 10, 21 ou 22 où l'antigène polypeptidique

apparenté à Rv0125 comprend un fragment de
SEQ ID NO : 3 qui a une longueur d'au moins 150 acides
aminés.

25. Procédé, utilisation, polypeptide ou
5 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 24 où l'antigène polypeptidique contient 1500 résidus
d'acides aminés ou moins.

26. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
10 à 25 où l'antigène codé contient 1500 résidus d'acides
aminés ou moins.

27. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 26 où un antigène polypeptidique comprenant un
15 antigène apparenté à Rv1196 et un antigène
polypeptidique comprenant un antigène apparenté à
Rv0125 sont fournis.

28. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
20 à 27 où un adénovirus codant pour un antigène apparenté
à Rv1196 et un adénovirus codant pour un antigène
apparenté à Rv0125 sont fournis.

29. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
25 à 27 où l'adénovirus code pour un antigène apparenté à
Rv1196 et un antigène apparenté à Rv0125.

30. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 29 où l'antigène polypeptidique comprend une séquence
30 présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 6.

31. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 29 où l'antigène polypeptidique comprend un fragment
de SEQ ID NO : 6 qui a une longueur d'au moins
5 450 acides aminés, comme les acides aminés 2 à 723 de
SEQ ID NO : 6.

32. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 30 où l'antigène codé comprend une séquence
10 présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 6.

33. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 30 où l'antigène codé comprend un fragment de
SEQ ID NO : 6 qui a une longueur d'au moins 450 acides
15 aminés, comme les acides aminés 2 à 723 de
SEQ ID NO : 6.

34. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 33, où le sujet est un être humain.

20 35. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 34, où le polypeptide et l'adénovirus sont
administrés par voie intramusculaire.

36. Procédé, utilisation, polypeptide ou
25 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 35, où le polypeptide et l'adénovirus sont
administrés dans une plage de doses de 400 à 600 µl
compris.

37. Procédé, utilisation, polypeptide ou
30 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1

à 36, où la plage de doses du polypeptide est de 1 à 100 µg compris.

38. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 37, où la plage de doses de l'adénovirus est de 1×10^5 à 1×10^{15} particules virales compris.

39. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 38 où l'antigène polypeptidique est fourni dans une composition qui comprend également un adjuvant.

40. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 39, où l'adjuvant comprend un agoniste des TLR et/ou une saponine immunologiquement active.

41. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 40, où l'adjuvant comprend du 3D-MPL.

42. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon la revendication soit 40 soit 41, où l'adjuvant comprend du QS21.

43. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon la revendication 42, où l'adjuvant comprend du 3D-MPL et du QS31 dans une formulation liposomique.

44. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon la revendication soit 42 soit 43, où l'antigène polypeptidique est fourni dans une composition qui comprend entre 12,5 et 75 microgrammes de 3D-MPL compris et entre 12,5 et 75 microgrammes de QS21 compris.

45. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 44 où l'intervalle de temps entre les administrations se situe dans la plage d'une semaine à trois mois
5 compris.

46. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 45, pour la prophylaxie, le traitement ou l'amélioration d'une infection par des mycobactéries,
10 comme *Mycobacterium tuberculosis*.

47. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon la revendication 46, pour la prophylaxie d'une infection par des mycobactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis*.

15 48. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon la revendication 46, pour le traitement d'une infection par des mycobactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis*.

49. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 47, où le sujet n'est pas infecté.
20

50. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 46 ou 48, où le sujet souffre d'une infection latente.

25 51. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 46 ou 48, où le sujet souffre d'une infection active.

52. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 49, où le sujet a été vacciné auparavant par le BCG.
30

53. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 49, où la réponse immunitaire comprend des
lymphocytes T CD4 exprimant de l'IFN-gamma, du TNF-
5 alpha et de l'IL-2.

54. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 53, où l'adénovirus est un adénovirus de chimpanzé.

55. Procédé, utilisation, polypeptide ou
10 adénovirus selon la revendication 54, où l'adénovirus
est défectueux pour la réplication.

56. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon la revendication soit 54 soit 55, où
l'adénovirus est un ChAd3.

15 57. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon la revendication soit 54 soit 55, où
l'adénovirus est un ChAd63.

58. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 54
20 à 57, où l'adénovirus comprend une inactivation
fonctionnelle (comme une délétion) au moins des gènes
E1 et E4, éventuellement avec une inactivation
fonctionnelle (comme une délétion) de E3, conjointement
avec une substitution du gène Ad5E4orf6.

25 59. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 58 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196
est fourni dans une composition qui est sensiblement
dépourvue d'un adénovirus simien non humain codant pour
30 un antigène apparenté à Rv1196, comme sensiblement
dépourvue d'un adénovirus simien non humain codant pour

un antigène mycobactérien, en particulier sensiblement
dépourvue de tout adénovirus simien non humain,
spécialement sensiblement dépourvue de tout adénovirus
codant pour un antigène mycobactérien (comme
5 sensiblement dépourvue de tout adénovirus).

60. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
à 58 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125
est fourni dans une composition qui est sensiblement
10 dépourvue d'un adénovirus simien non humain codant pour
un antigène apparenté à Rv0125, comme sensiblement
dépourvue d'un adénovirus simien non humain codant pour
un antigène mycobactérien, en particulier sensiblement
dépourvue de tout adénovirus simien non humain,
15 spécialement sensiblement dépourvue de tout adénovirus
codant pour un antigène mycobactérien (comme
sensiblement dépourvue de tout adénovirus).

61. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
20 à 58 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196
est fourni dans une composition qui ne comprend pas un
adénovirus simien non humain codant pour un antigène
apparenté à Rv1196, de telle façon qu'elle ne comprend
pas un adénovirus simien non humain codant pour un
25 antigène mycobactérien, en particulier elle ne comprend
aucun adénovirus simien non humain, spécialement elle
ne comprend aucun adénovirus codant pour un antigène
mycobactérien (de telle façon qu'elle ne comprend aucun
adénovirus).

30 62. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1

à 58 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, de telle façon qu'elle ne comprend pas un adénovirus simien non humain codant pour un antigène mycobactérien, en particulier elle ne comprend aucun adénovirus simien non humain, spécialement elle ne comprend aucun adénovirus codant pour un antigène mycobactérien (de telle façon qu'elle ne comprend aucun adénovirus).

63. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 62 où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, comme sensiblement dépourvue d'un antigène mycobactérien polypeptidique, en particulier sensiblement dépourvue de tout autre antigène.

64. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 62 où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui est sensiblement dépourvue d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, comme sensiblement dépourvue d'un antigène mycobactérien polypeptidique, en particulier sensiblement dépourvue de tout autre antigène.

65. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 62 où l'adénovirus simien non humain codant pour un

antigène apparenté à Rv1196 est fourni dans une composition qui ne comprend pas un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196, de telle façon qu'elle ne comprend pas un antigène mycobactérien
5 polypeptidique, en particulier elle ne comprend aucun autre antigène.

66. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 62 où l'adénovirus simien non humain codant pour un
10 antigène apparenté à Rv0125 est fourni dans une composition qui ne comprend pas un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, de telle façon qu'elle ne comprend pas un antigène mycobactérien polypeptidique, en particulier elle ne comprend aucun
15 autre antigène.

67. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 66 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour
20 (comme deux, trois ou six jours) d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, comme un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196, par exemple, un adénovirus simien non humain codant pour un antigène mycobactérien
25 (comme tout adénovirus simien non humain), en particulier tout adénovirus codant pour un antigène mycobactérien (comme tout adénovirus).

68. Procédé, utilisation, polypeptide ou adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1
30 à 66 où l'antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour

(comme deux, trois ou six jours) d'un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, comme un adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv0125, par exemple, un adénovirus
5 simien non humain codant pour un antigène mycobactérien (comme tout adénovirus simien non humain), en particulier tout adénovirus codant pour un antigène mycobactérien (comme tout adénovirus).

69. Procédé, utilisation, polypeptide ou
10 adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 68 où l'adénovirus simien non humain codant pour un antigène apparenté à Rv1196 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un antigène polypeptidique apparenté à
15 Rv1196, par exemple, tout antigène mycobactérien polypeptidique (comme tout autre antigène).

70. Procédé, utilisation, polypeptide ou
adénovirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 68 où l'adénovirus simien non humain codant pour un
20 antigène apparenté à Rv0125 n'est pas administré au sein d'une période d'un jour (comme deux, trois ou six jours) d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125, par exemple, tout antigène mycobactérien polypeptidique (comme tout autre antigène).

25 71. Adénovirus simien non humain comprenant un transgène codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ou Rv0125.

72. Adénovirus simien non humain selon la revendication 71, contenant au moins le penton de
30 SEQ ID NO : 10, l'hexon de SEQ ID NO : 11 ou la fibre de SEQ ID NO : 12.

73. Adénovirus simien non humain selon la revendication 72, comprenant les protéines du penton (SEQ ID NO : 10), de l'hexon (SEQ ID NO : 11) et de la fibre (SEQ ID NO : 12) de ChAd3.

5 74. Adénovirus simien non humain selon la revendication 71, comprenant au moins le penton de SEQ ID NO : 15, l'hexon de SEQ ID NO : 16 ou la fibre de SEQ ID NO : 17.

10 75. Adénovirus simien non humain selon la revendication 74, comprenant une protéine du penton (SEQ ID NO : 16), de l'hexon (SEQ ID NO : 17) et de la fibre (SEQ ID NO : 18) de ChAd63.

15 76. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 75 où l'antigène codé comprend une séquence présentant au moins 90 % d'identité avec SEQ ID NO : 6.

20 77. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 76 où l'antigène codé comprend un fragment de SEQ ID NO : 6 qui a une longueur d'au moins 450 acides aminés, comme les acides aminés 2 à 723 de SEQ ID NO : 6.

78. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 77, qui est un adénovirus déficient pour la réplication.

25 79. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 78, où l'adénovirus comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E1.

30 80. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 79, où l'adénovirus

comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E4.

81. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 80, où l'adénovirus
5 comprend une inactivation fonctionnelle (comme une délétion) du gène E3.

82. Adénovirus simien non humain selon l'une quelconque des revendications 71 à 81, où l'adénovirus comprend une substitution du gène Ad5E4orf6.

10 83. Adénovirus simien non humain selon la revendication 71, constitué de la séquence de SEQ ID NO : 13.

84. Adénovirus simien non humain selon la revendication 71, constitué de la séquence de
15 SEQ ID NO : 18.

85. Polynucléotide comprenant SEQ ID NO : 8 ou comprenant l'un de ses variants dégénérés présentant au moins 95 % d'identité avec SEQ ID NO : 8.

86. Polynucléotide selon la revendication 85,
20 comprenant SEQ ID NO : 8 ou comprenant un variant dégénéré présentant au moins 98 % d'identité avec SEQ ID NO : 8.

87. Polynucléotide selon la revendication 85, constitué de SEQ ID NO : 8 ou constitué d'un variant
25 dégénéré présentant au moins 95 % d'identité avec SEQ ID NO : 8.

88. Polynucléotide selon la revendication 85, constitué de SEQ ID NO : 8 ou constitué d'un variant
dégénéré présentant au moins 98 % d'identité avec
30 SEQ ID NO : 8.

89. Polynucléotide selon la revendication 85,
comprenant SEQ ID NO : 8.

90. Polynucléotide selon la revendication 89,
constitué de SEQ ID NO : 8.

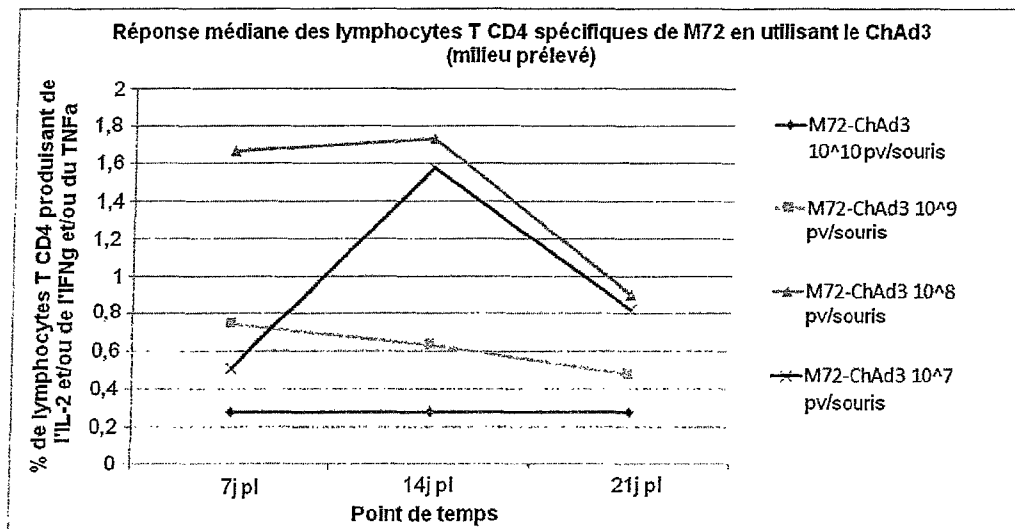


Figure 1

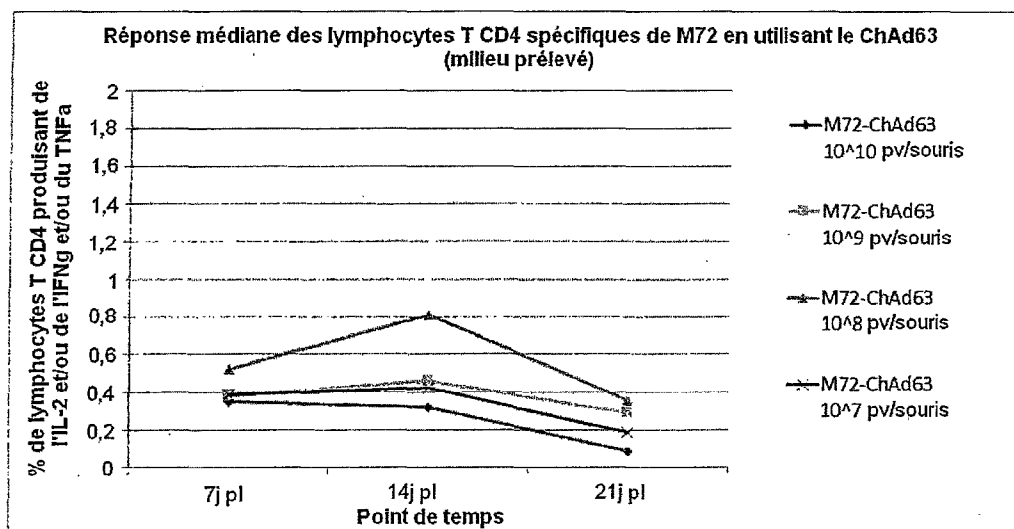


Figure 2

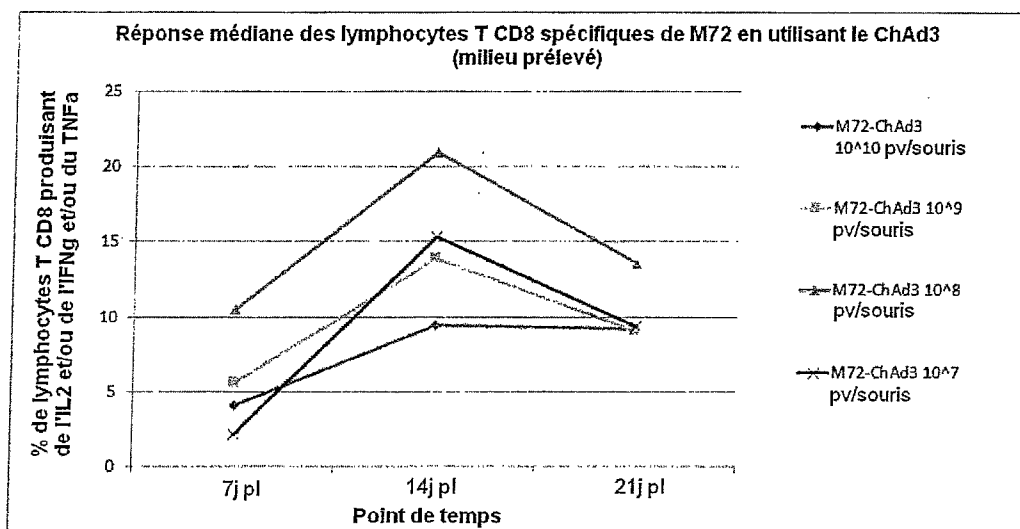


Figure 3

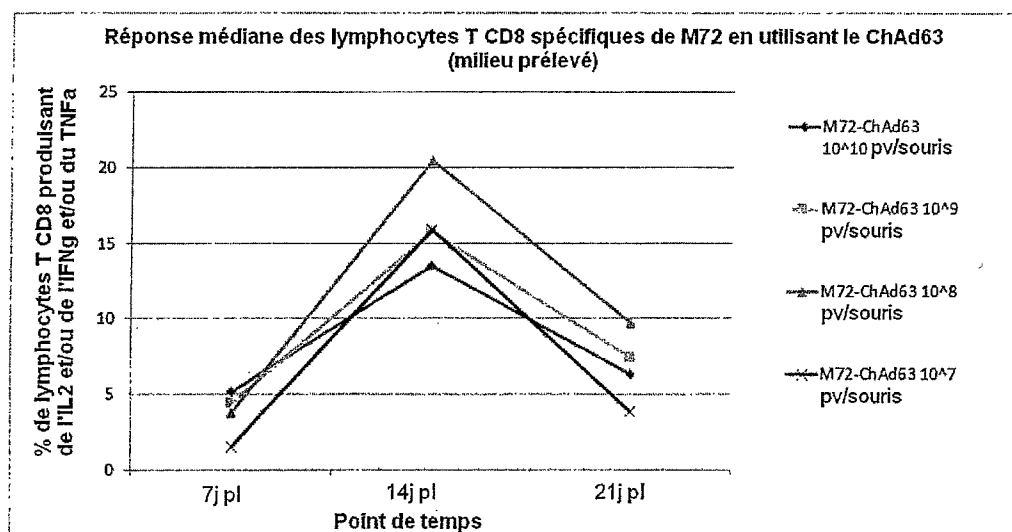


Figure 4

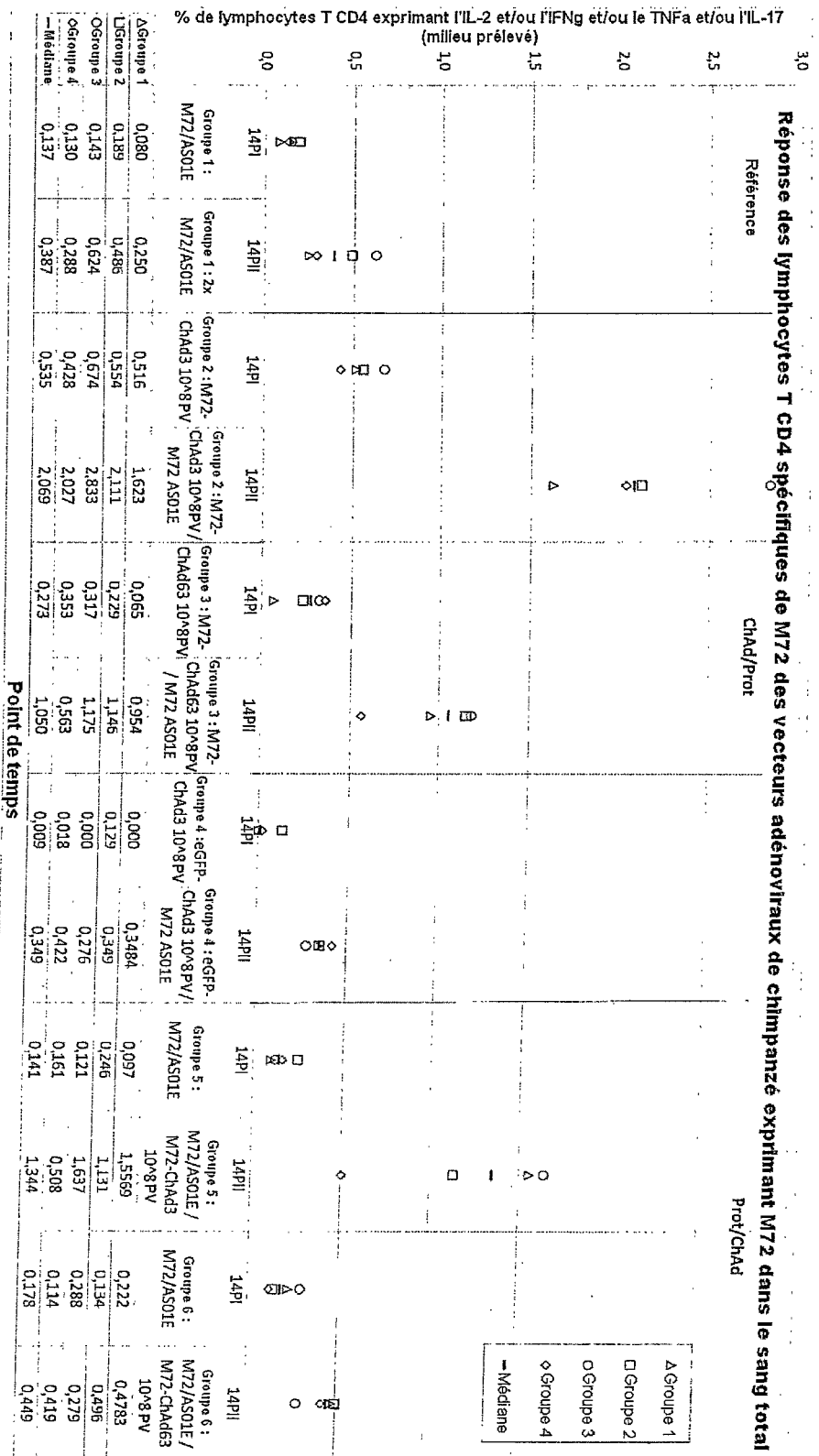


Figure 5

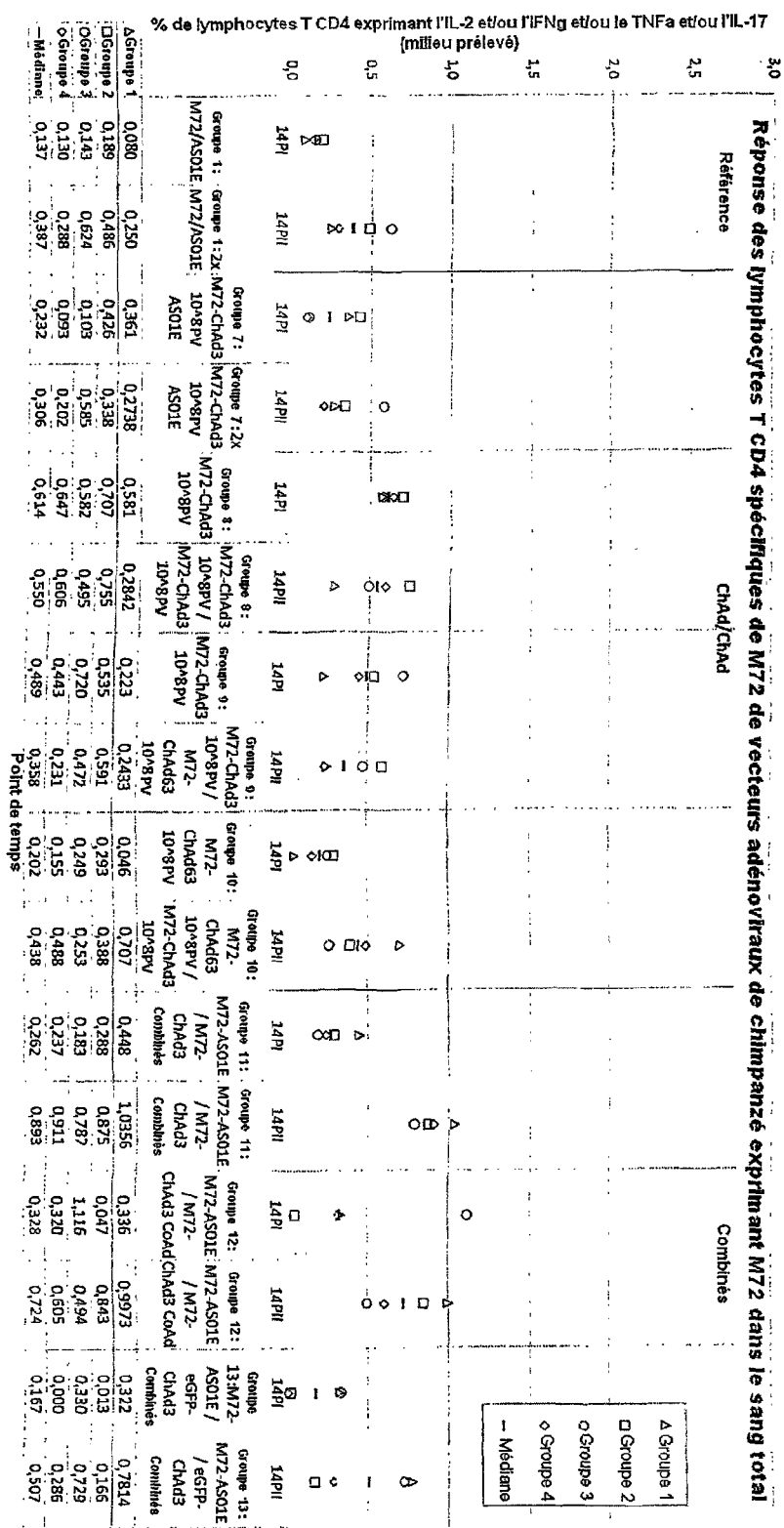


Figure 6

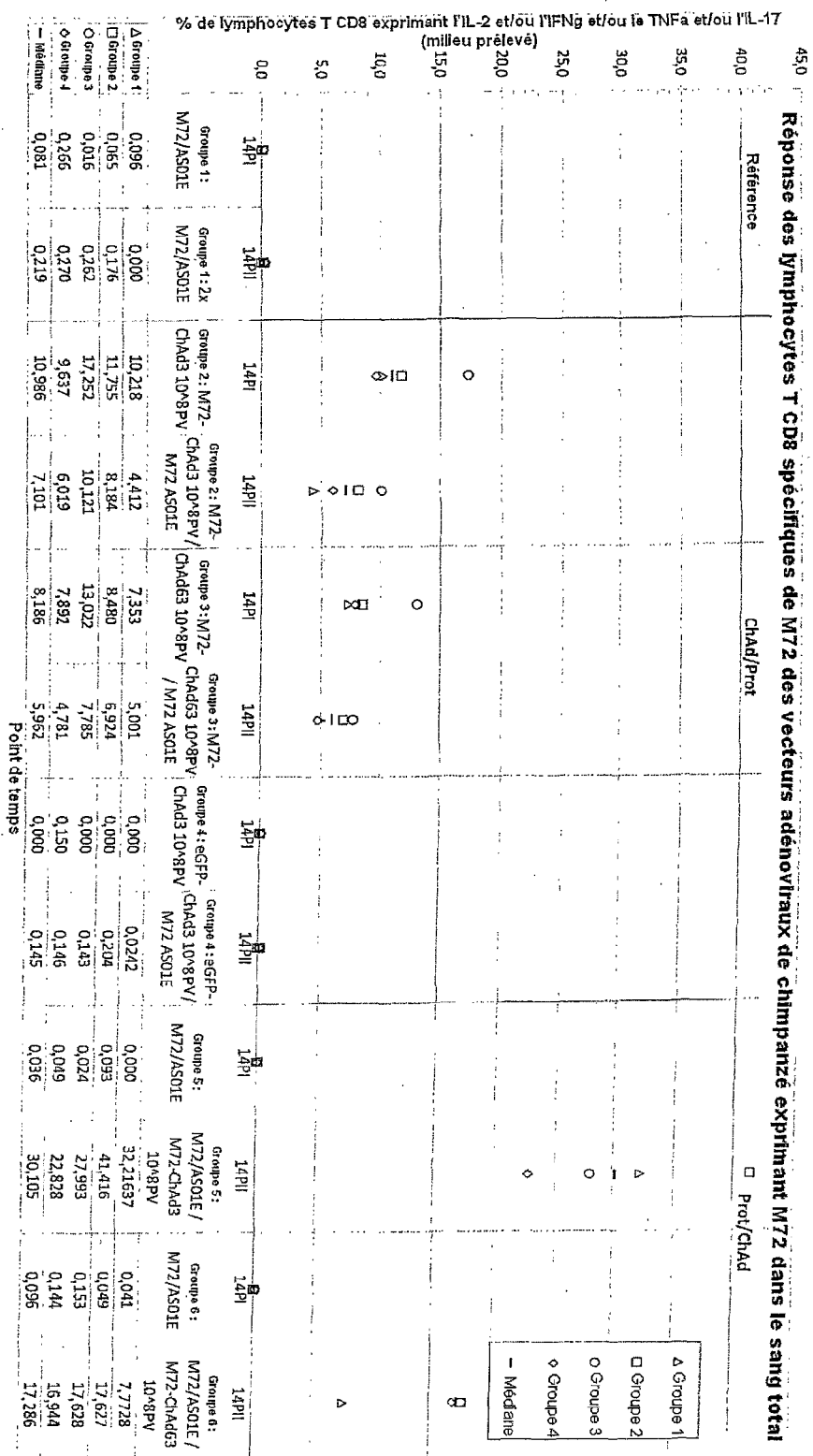
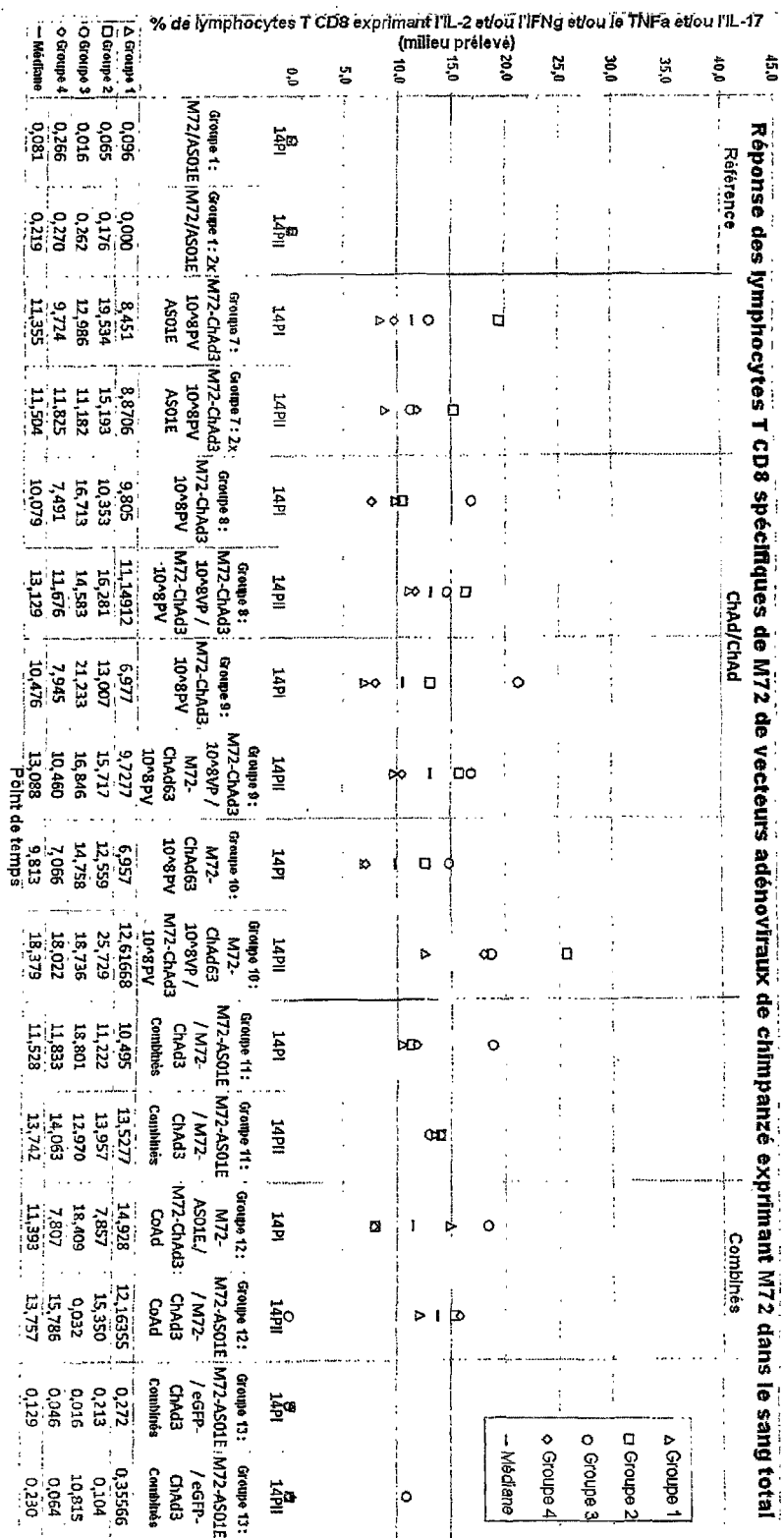


Figure 7



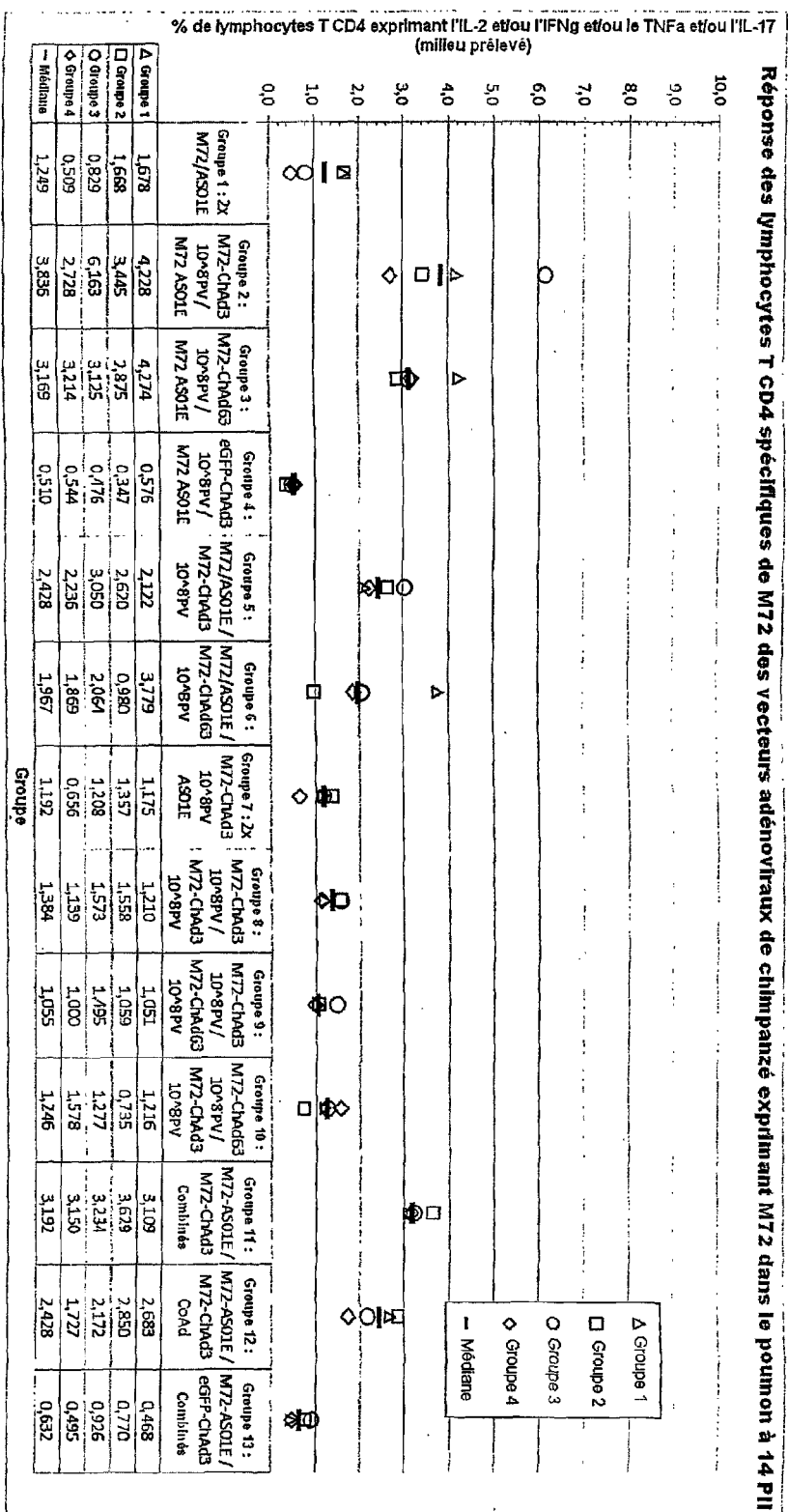


Figure 9

Réponse des lymphocytes T CD8 spécifiques de M72 des vecteurs adénoviraux de chimpanzé exprimant M72 dans le poumon à 14 PI

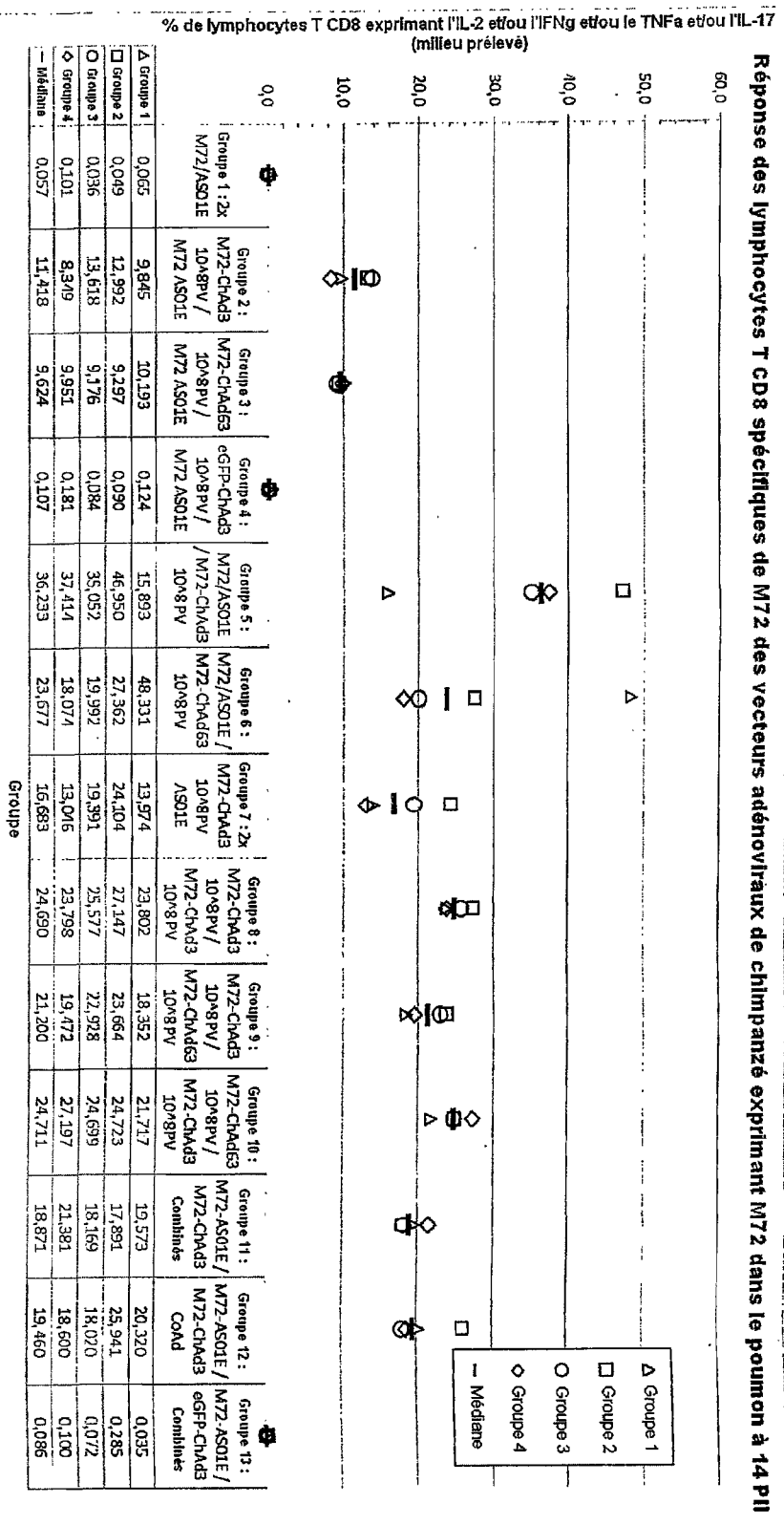


Figure 10

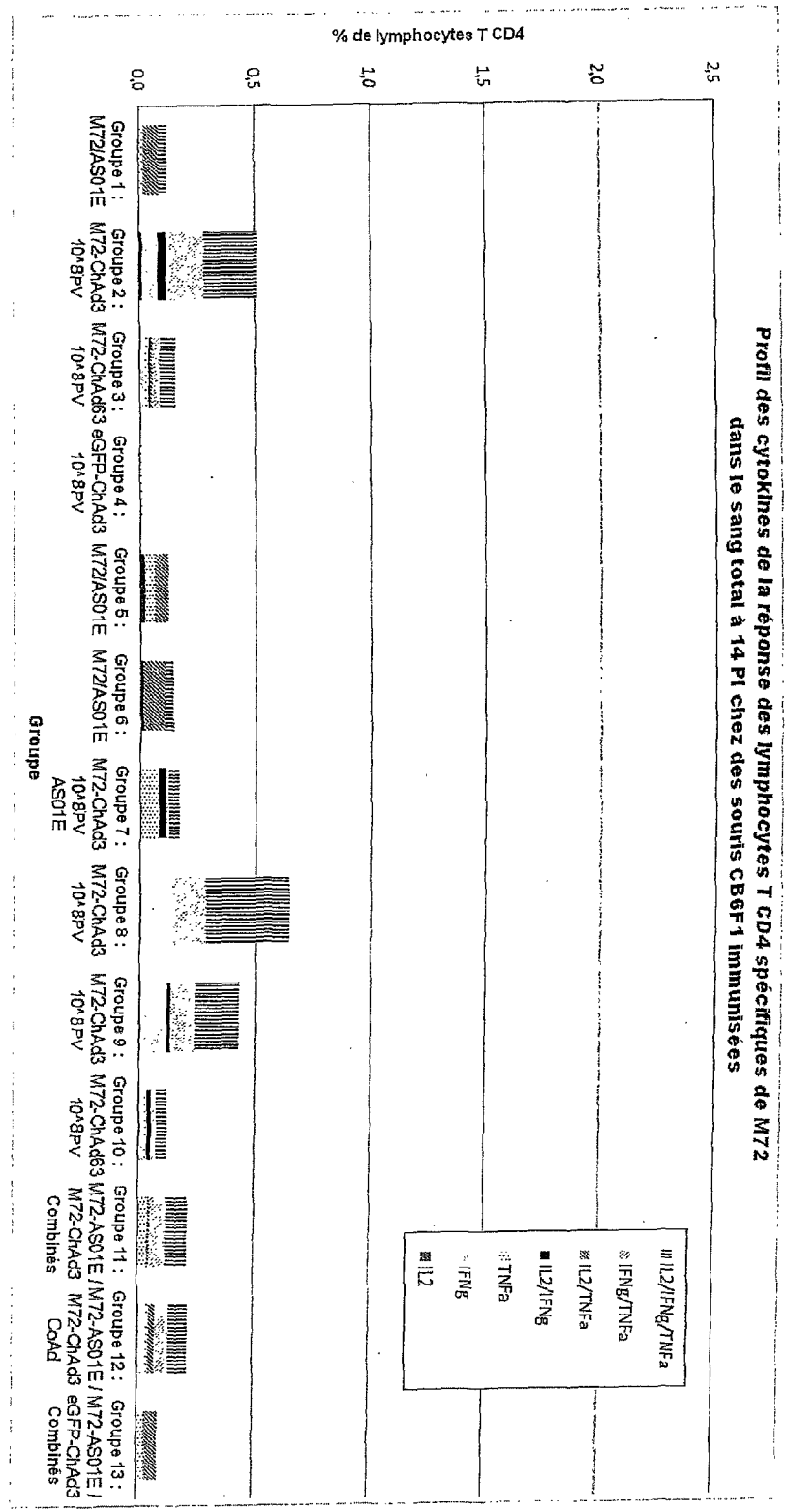


Figure 11

| | % de lymphocytes T CD4 exprimant des cytokines (sang total à 14 PI) | | | | | | |
|-----------|---|-------|-------|----------|---------|----------|-----------------|
| | IL2 | IFNg | TNFa | IL2/IFNg | IL2/TNF | IFNg/TNF | IL2/IFNg / TNFa |
| Groupe 1 | 0,000 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | 0,072 | 0,000 | 0,029 |
| Groupe 2 | 0,011 | 0,071 | 0,000 | 0,032 | 0,000 | 0,166 | 0,225 |
| Groupe 3 | 0,000 | 0,025 | 0,017 | 0,006 | 0,006 | 0,035 | 0,064 |
| Groupe 4 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 5 | 0,016 | 0,000 | 0,048 | 0,000 | 0,056 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 6 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,013 | 0,095 | 0,000 | 0,034 |
| Groupe 7 | 0,000 | 0,002 | 0,079 | 0,026 | 0,000 | 0,020 | 0,041 |
| Groupe 8 | 0,000 | 0,137 | 0,002 | 0,000 | 0,000 | 0,148 | 0,362 |
| Groupe 9 | 0,000 | 0,116 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | 0,106 | 0,190 |
| Groupe 10 | 0,000 | 0,027 | 0,007 | 0,023 | 0,000 | 0,018 | 0,042 |
| Groupe 11 | 0,000 | 0,000 | 0,043 | 0,000 | 0,008 | 0,072 | 0,091 |
| Groupe 12 | 0,006 | 0,032 | 0,012 | 0,000 | 0,027 | 0,060 | 0,081 |
| Groupe 13 | 0,000 | 0,000 | 0,030 | 0,000 | 0,059 | 0,000 | 0,000 |

Figure 12

Profil des cytokines de la réponse des lymphocytes T CD4 spécifiques de M72 dans le sang total à 14 PII chez des souris CB6F1 immunisées

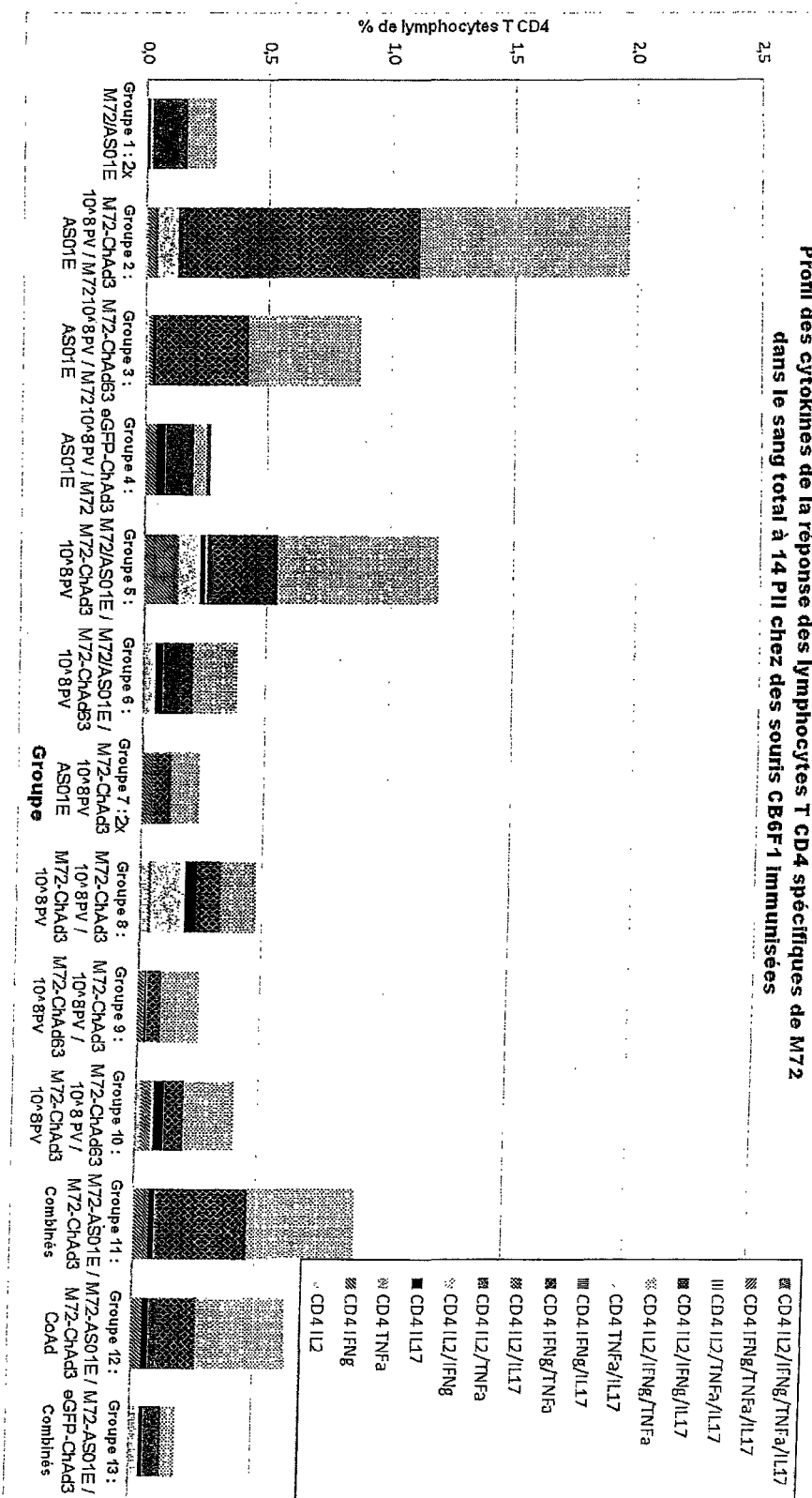


Figure 13

| % de lymphocytes T CD4 exprimant des cytokines (sang total à 14 p1) | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|------------------|------------------|----------|----------------------|----------------------|--------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| | CD4 IL2 | CD4 IFN γ | CD4 TNF α | CD4 IL17 | CD4 IL2/IFN γ | CD4 IL2/TNF α | CD4 IL2/IL17 | CD4 IFN γ /TNF α | CD4 IFN γ /IL17 | CD4 TNF α /IL17 | CD4 IL2/IFN γ /TNF α | CD4 IL2/IFN γ /IL17 | CD4 TNF α /IL17 | CD4 IFN γ /TNF α /IL17 |
| Groupe 1 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,009 | 0,119 | 0,000 | 0,029 | 0,000 | 0,000 | 0,112 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 2 | 0,005 | 0,044 | 0,084 | 0,000 | 0,000 | 0,026 | 0,000 | 0,951 | 0,000 | 0,000 | 0,855 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 3 | 0,014 | 0,009 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,370 | 0,000 | 0,000 | 0,449 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 4 | 0,001 | 0,041 | 0,000 | 0,036 | 0,001 | 0,115 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,058 | 0,014 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 5 | 0,000 | 0,140 | 0,090 | 0,018 | 0,011 | 0,028 | 0,000 | 0,255 | 0,000 | 0,000 | 0,649 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 6 | 0,009 | 0,002 | 0,041 | 0,027 | 0,000 | 0,085 | 0,000 | 0,040 | 0,000 | 0,000 | 0,177 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 7 | 0,000 | 0,051 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,068 | 0,000 | 0,000 | 0,119 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 8 | 0,033 | 0,008 | 0,142 | 0,047 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,098 | 0,000 | 0,000 | 0,142 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 9 | 0,000 | 0,019 | 0,007 | 0,007 | 0,008 | 0,002 | 0,000 | 0,052 | 0,000 | 0,000 | 0,157 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 10 | 0,022 | 0,041 | 0,009 | 0,043 | 0,000 | 0,008 | 0,000 | 0,073 | 0,000 | 0,000 | 0,204 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 11 | 0,000 | 0,063 | 0,000 | 0,019 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,365 | 0,000 | 0,000 | 0,436 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 12 | 0,000 | 0,039 | 0,004 | 0,027 | 0,000 | 0,045 | 0,000 | 0,150 | 0,000 | 0,000 | 0,365 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 13 | 0,028 | 0,000 | 0,013 | 0,013 | 0,000 | 0,071 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,059 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Figure 14

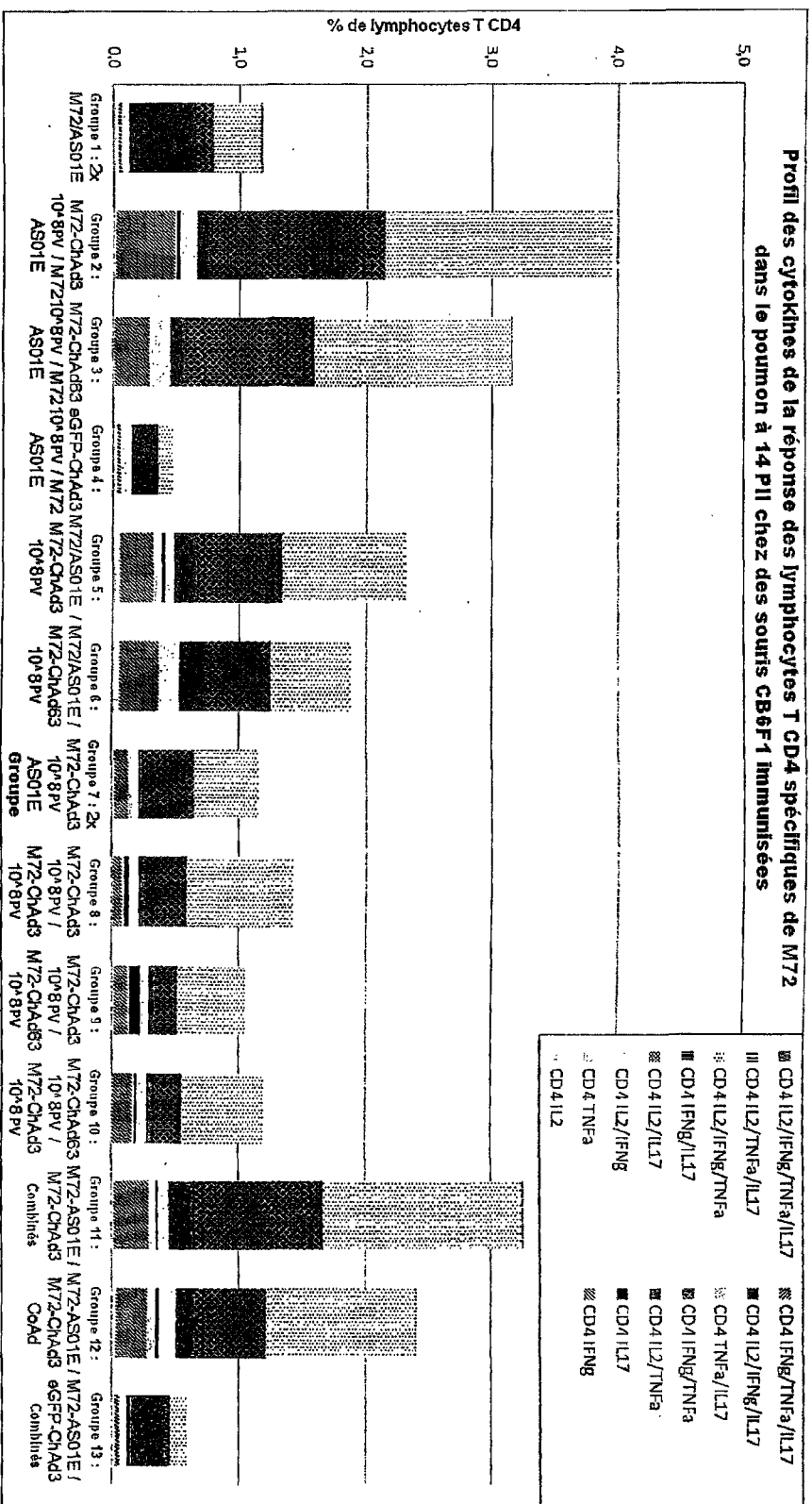


Figure 15

| % de lymphocytes T CD4 exprimant des cytokines (poumon à 14 PII) | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------------------|----------|----------|----------------------|--------------|--------------|------------------------|------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
| | CD4 IL2 | CD4 IFN γ | CD4 TNFa | CD4 IL17 | CD4 IL2/IFN γ | CD4 IL2/TNFa | CD4 IL2/IL17 | CD4 IFN γ /TNFa | CD4 IFN γ /IL17 | CD4 TNFa/IL17 | CD4 IL2/IFN γ /TNFa | CD4 IL2/IFN γ /IL17 | CD4 IL2/TNFa/IL17 |
| Groupe 1 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,009 | 0,119 | 0,000 | 0,029 | 0,000 | 0,000 | 0,112 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 2 | 0,005 | 0,044 | 0,084 | 0,000 | 0,000 | 0,026 | 0,000 | 0,951 | 0,000 | 0,000 | 0,855 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 3 | 0,014 | 0,009 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,370 | 0,000 | 0,000 | 0,449 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 4 | 0,001 | 0,041 | 0,000 | 0,036 | 0,001 | 0,115 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,058 | 0,014 | 0,000 |
| Groupe 5 | 0,000 | 0,140 | 0,090 | 0,018 | 0,011 | 0,028 | 0,000 | 0,255 | 0,000 | 0,000 | 0,649 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 6 | 0,009 | 0,002 | 0,041 | 0,027 | 0,000 | 0,085 | 0,000 | 0,040 | 0,000 | 0,000 | 0,177 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 7 | 0,000 | 0,051 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,068 | 0,000 | 0,000 | 0,119 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 8 | 0,033 | 0,008 | 0,142 | 0,047 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,098 | 0,000 | 0,000 | 0,142 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 9 | 0,000 | 0,019 | 0,007 | 0,007 | 0,008 | 0,002 | 0,000 | 0,052 | 0,000 | 0,000 | 0,157 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 10 | 0,022 | 0,041 | 0,009 | 0,043 | 0,000 | 0,008 | 0,000 | 0,073 | 0,000 | 0,000 | 0,204 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 11 | 0,000 | 0,063 | 0,000 | 0,019 | 0,000 | 0,016 | 0,000 | 0,365 | 0,000 | 0,000 | 0,436 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 12 | 0,000 | 0,039 | 0,004 | 0,027 | 0,000 | 0,045 | 0,000 | 0,150 | 0,000 | 0,000 | 0,365 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 13 | 0,028 | 0,000 | 0,013 | 0,013 | 0,000 | 0,071 | 0,000 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,059 | 0,000 | 0,000 |

Figure 16

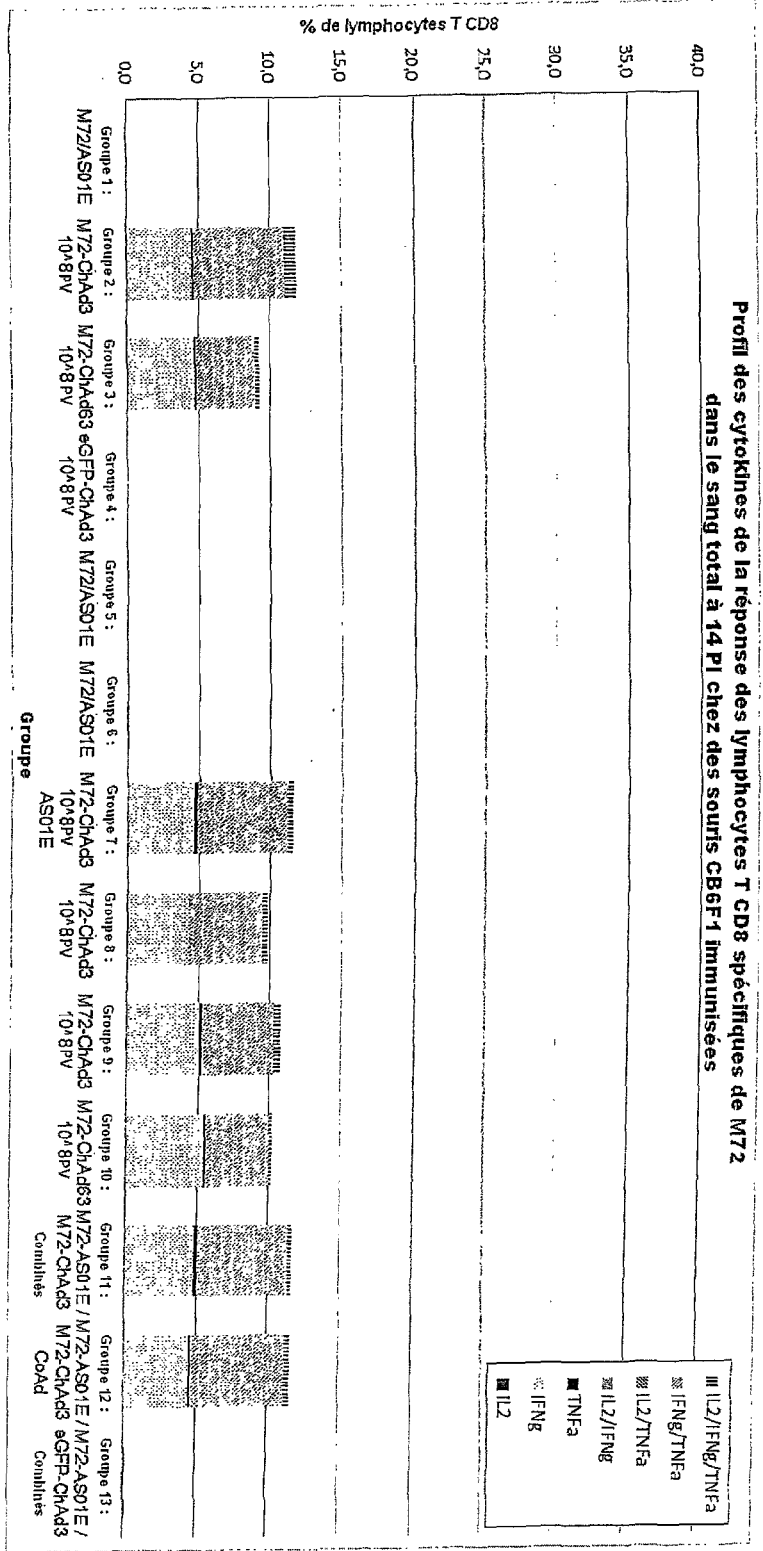


Figure 17

| | % de lymphocytes T CD8 exprimant des cytokines (sang total à 14 PI) | | | | | | |
|-----------|---|-------|-------|----------|----------|-----------|-------------------|
| | IL2 | IFNg | TNFa | IL2/IFNg | IL2/TNFa | IFNg/TNFa | IL2/IFNg/ TNFa |
| Groupe 1 | 0,000 | 0,009 | 0,040 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 2 | 0,005 | 4,528 | 0,046 | 0,047 | 0,000 | 6,451 | 0,749 |
| Groupe 3 | 0,000 | 4,744 | 0,041 | 0,022 | 0,000 | 4,155 | 0,293 |
| Groupe 4 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 5 | 0,000 | 0,012 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 6 | 0,000 | 0,021 | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,019 | 0,000 |
| Groupe 7 | 0,000 | 4,694 | 0,141 | 0,000 | 0,000 | 6,410 | 0,321 |
| Groupe 8 | 0,000 | 4,352 | 0,000 | 0,038 | 0,000 | 5,090 | 0,410 |
| Groupe 9 | 0,000 | 5,046 | 0,180 | 0,017 | 0,000 | 5,064 | 0,510 |
| Groupe 10 | 0,000 | 5,515 | 0,050 | 0,009 | 0,000 | 4,455 | 0,234 |
| Groupe 11 | 0,000 | 4,850 | 0,233 | 0,000 | 0,000 | 6,440 | 0,182 |
| Groupe 12 | 0,000 | 4,547 | 0,118 | 0,035 | 0,000 | 6,545 | 0,385 |
| Groupe 13 | 0,000 | 0,000 | 0,102 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Figure 18

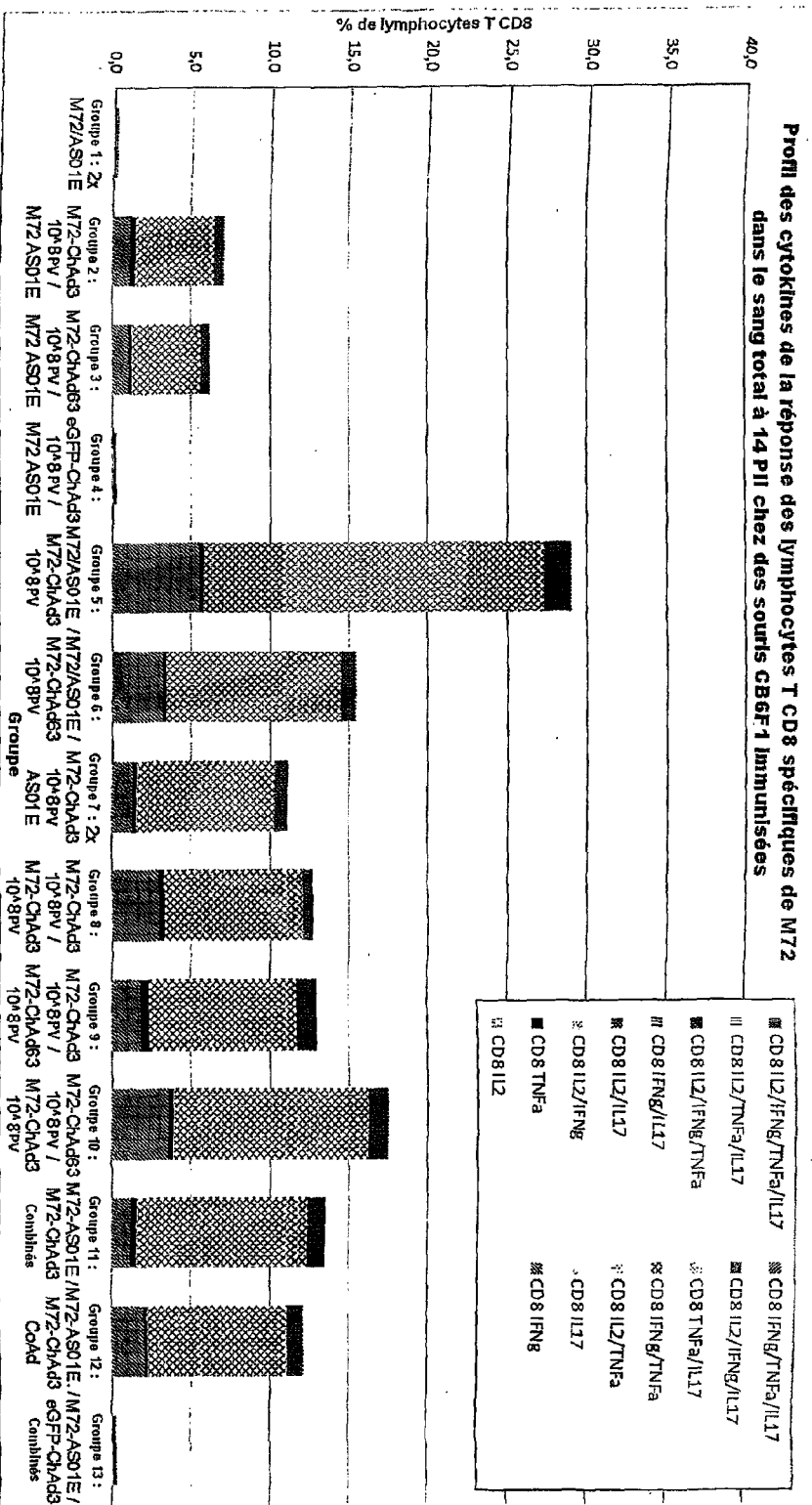


Figure 19

| % de lymphocytes T CD8 exprimant des cytokines (sang total à 14 PII) | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------------------|----------|----------|----------------------|--------------|--------------|------------------------|------------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | CD8 IL2 | CD8 IFN γ | CD8 TNFa | CD8 IL17 | CD8 IL2/IFN γ | CD8 IL2/TNFa | CD8 IL2/IL17 | CD8 IFN γ /TNFa | CD8 IFN γ /IL17 | CD8 TNFa/IL17 | CD8 IL2/IFN γ /TNFa | CD8 IL2/IFN γ /IL17 | CD8 IFN γ /TNFa/IL17 |
| Groupe 1 | 0,022 | 0,000 | 0,073 | 0,000 | 0,000 | 0,013 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,013 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 2 | 0,000 | 1,033 | 0,358 | 0,031 | 0,011 | 0,014 | 0,000 | 5,025 | 0,000 | 0,000 | 0,611 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 3 | 0,035 | 0,939 | 0,207 | 0,027 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 4,370 | 0,000 | 0,000 | 0,544 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 4 | 0,009 | 0,019 | 0,010 | 0,018 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,011 | 0,003 | 0,000 | 0,014 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 5 | 0,000 | 5,514 | 0,238 | 0,000 | 0,023 | 0,000 | 0,000 | 21,497 | 0,004 | 0,000 | 1,670 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 6 | 0,009 | 3,145 | 0,208 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 11,115 | 0,009 | 0,000 | 0,837 | 0,000 | 0,011 |
| Groupe 7 | 0,023 | 1,196 | 0,271 | 0,030 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 8,742 | 0,021 | 0,000 | 0,773 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 8 | 0,019 | 2,830 | 0,401 | 0,000 | 0,017 | 0,000 | 0,000 | 8,740 | 0,002 | 0,004 | 0,584 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 9 | 0,000 | 1,771 | 0,522 | 0,000 | 0,019 | 0,000 | 0,000 | 9,275 | 0,000 | 0,000 | 1,218 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 10 | 0,014 | 3,514 | 0,346 | 0,009 | 0,039 | 0,006 | 0,000 | 12,300 | 0,008 | 0,000 | 1,220 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 11 | 0,000 | 1,141 | 0,318 | 0,010 | 0,007 | 0,007 | 0,000 | 10,800 | 0,000 | 0,000 | 1,145 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 12 | 0,000 | 1,965 | 0,204 | 0,000 | 0,024 | 0,000 | 0,000 | 8,900 | 0,000 | 0,000 | 0,910 | 0,000 | 0,012 |
| Groupe 13 | 0,000 | 0,019 | 0,148 | 0,018 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,011 | 0,013 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Figure 20

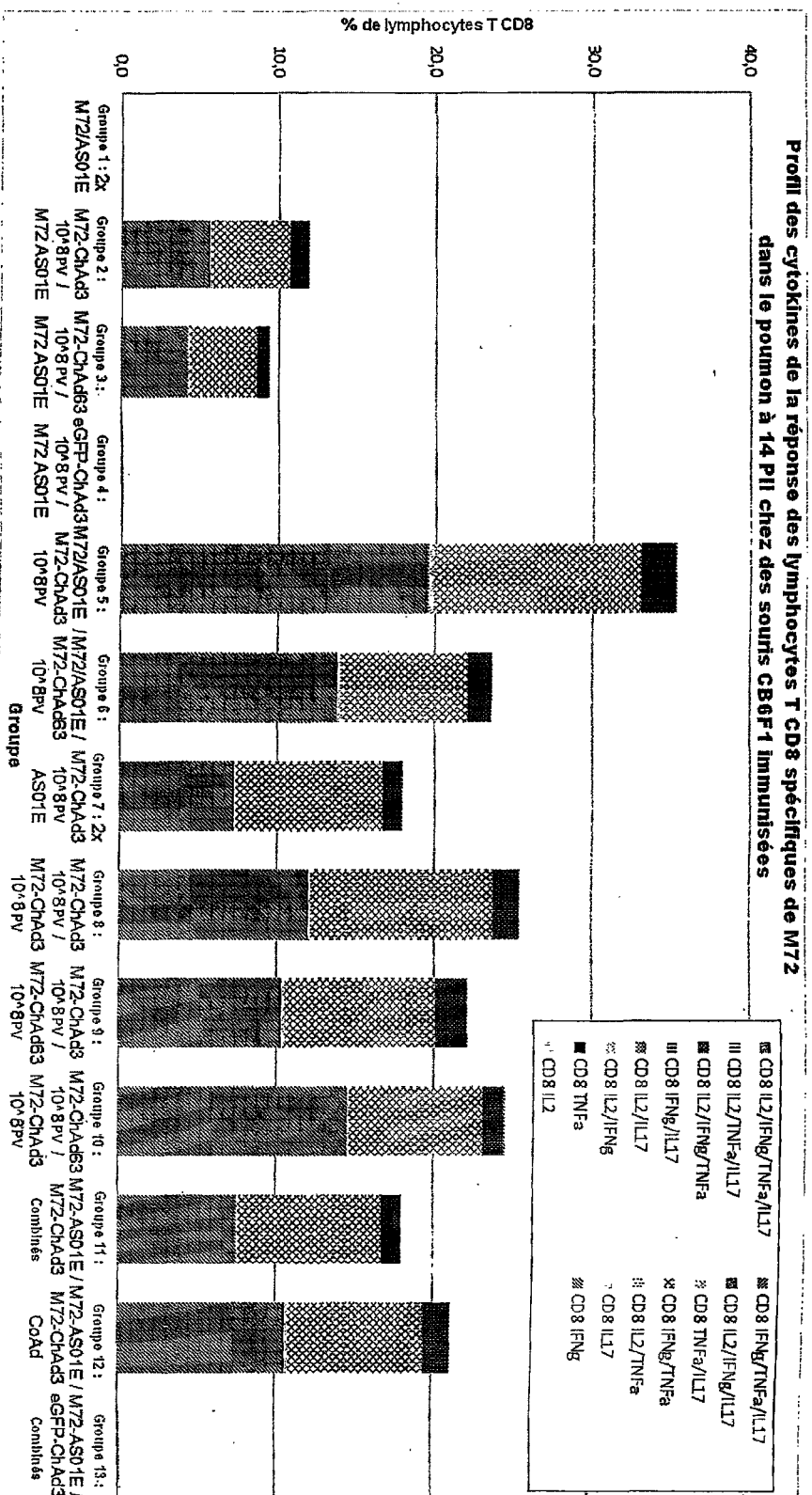


Figure 21

| % de lymphocytes T CD8 exprimant des cytokines (poumon à 14 PII) | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------------------|------------------|----------|-----------------------|-----------------------|---------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | CD8 IL2 | CD8 IFN γ | CD8 TNF α | CD8 IL17 | CD8 IL2/ IFN γ | CD8 IL2/ TNF α | CD8 IL2/ IL17 | CD8 IFN γ / TNF α | CD8 IFN γ / IL17 | CD8 TNF α / IL17 | CD8 IL2/ IFN γ / TNF α | CD8 IL2/ IFN γ / IL17 | CD8 IL2/ TNF α / IL17 |
| Groupe 1 | 0,003 | 0,001 | 0,000 | 0,006 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,007 | 0,000 | 0,000 | 0,014 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 2 | 0,000 | 5,514 | 0,043 | 0,000 | 0,140 | 0,004 | 0,000 | 5,038 | 0,000 | 0,000 | 1,190 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 3 | 0,005 | 4,198 | 0,015 | 0,012 | 0,077 | 0,000 | 0,000 | 4,324 | 0,004 | 0,000 | 0,728 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 4 | 0,000 | 0,015 | 0,001 | 0,013 | 0,013 | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,006 | 0,000 | 0,042 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 5 | 0,000 | 19,541 | 0,012 | 0,000 | 0,351 | 0,000 | 0,000 | 13,197 | 0,003 | 0,000 | 2,192 | 0,000 | 0,003 |
| Groupe 6 | 0,004 | 13,756 | 0,078 | 0,000 | 0,233 | 0,000 | 0,000 | 8,007 | 0,000 | 0,000 | 1,550 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 7 | 0,003 | 7,149 | 0,077 | 0,008 | 0,125 | 0,000 | 0,000 | 9,360 | 0,003 | 0,000 | 1,253 | 0,000 | 0,003 |
| Groupe 8 | 0,000 | 11,930 | 0,074 | 0,000 | 0,186 | 0,000 | 0,000 | 11,598 | 0,000 | 0,000 | 1,605 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 9 | 0,000 | 10,236 | 0,070 | 0,000 | 0,229 | 0,000 | 0,000 | 9,624 | 0,000 | 0,000 | 1,860 | 0,000 | 0,002 |
| Groupe 10 | 0,007 | 14,468 | 0,033 | 0,000 | 0,209 | 0,000 | 0,000 | 8,383 | 0,006 | 0,000 | 1,357 | 0,000 | 0,006 |
| Groupe 11 | 0,000 | 7,477 | 0,015 | 0,001 | 0,108 | 0,003 | 0,000 | 9,159 | 0,001 | 0,000 | 1,245 | 0,000 | 0,000 |
| Groupe 12 | 0,008 | 10,488 | 0,095 | 0,000 | 0,248 | 0,002 | 0,000 | 8,624 | 0,012 | 0,000 | 1,595 | 0,000 | 0,002 |
| Groupe 13 | 0,000 | 0,010 | 0,030 | 0,015 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,000 |

Figure 22



Figure 23

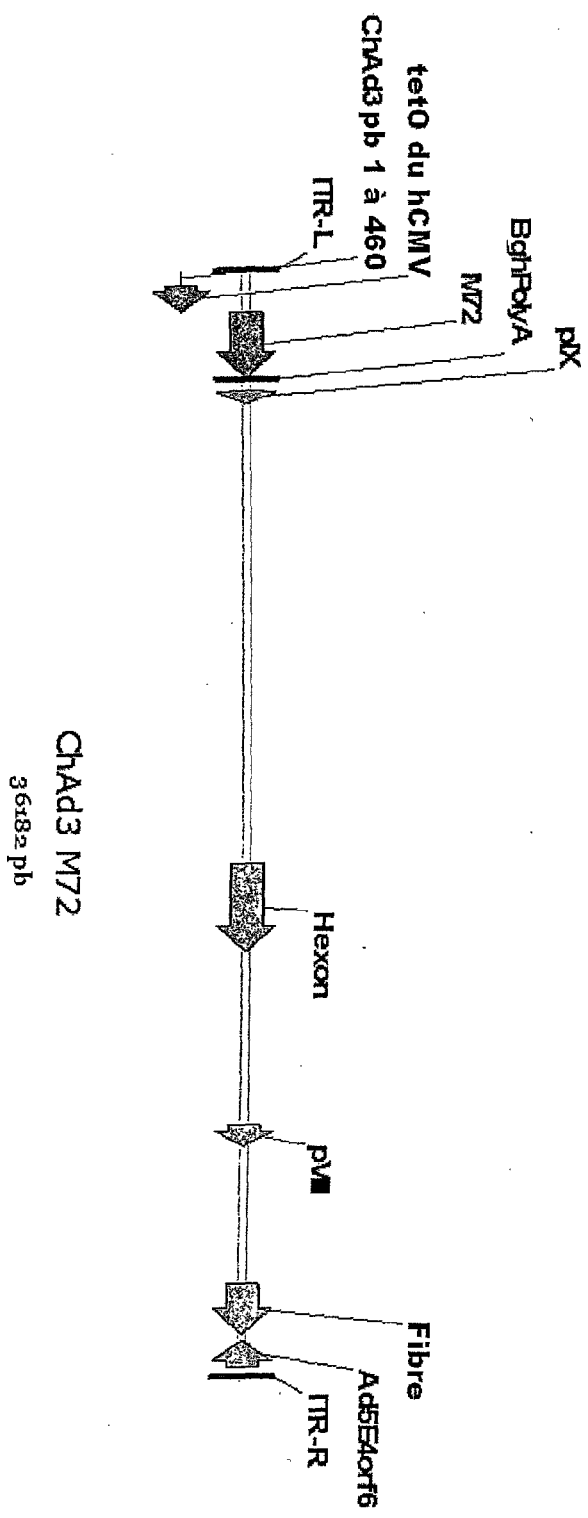


Figure 24

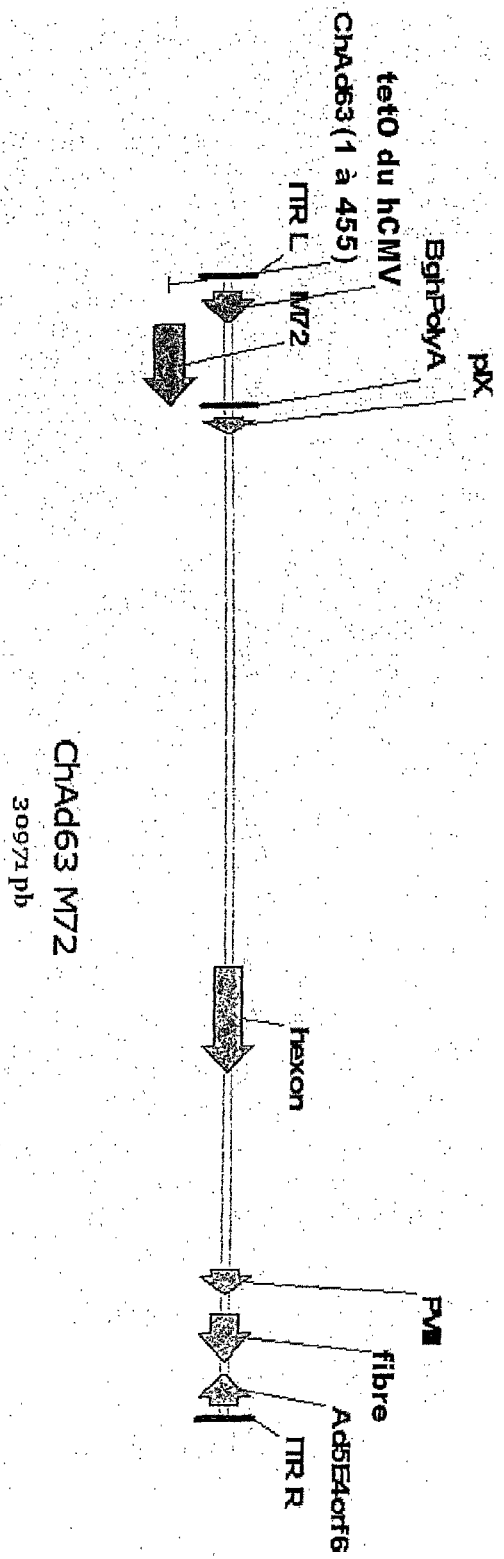


Figure 25

ABREGENOUVEAUX PROCEDES POUR INDUIRE UNE REPONSE IMMUNITAIRE

5

La présente invention concerne des procédés pour induire une réponse immunitaire, en particulier des procédés pour induire une réponse immunitaire contre des infections ou des maladies mycobactériennes comprenant (i) au moins une administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv1196 et au moins une administration d'un adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv1196 ou (ii) au moins une administration d'un antigène polypeptidique apparenté à Rv0125 et au moins une administration d'un adénovirus codant pour un antigène apparenté à Rv0125. Des compositions associées, des constructions adénovirales et des séquences polynucléotidiques sont également fournies.



Europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets

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 1984

Numero de la demande
nationale

BO 11338
BE 201605611

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | | |
|--|--|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC) |
| Y | WO 2005/071093 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CIRILLO AGOSTINO [IT]; COLLOCA STE) 4 août 2005 (2005-08-04) * revendication 7; séquences 1,83,116,122 * | 1-90 | INV. A61K39/04 C12N7/00 C12N15/861 C07K14/075 |
| Y | WO 2006/133911 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; LAHM ARMIN [IT]; COLLOCA STEFANO [I] 21 décembre 2006 (2006-12-21) * revendications 1-50; exemples 1,2,3; tableaux 1-3; séquences 2,5-7,14 * | 1-90 | |
| Y | WO 2013/123579 A1 (UNIV MCMASTER [CA]) 29 août 2013 (2013-08-29) * le document en entier * | 1-90 | |
| Y | WO 2011/130627 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; OKAIROS AG [IT]; SULLIVAN NANCY J [US] 20 octobre 2011 (2011-10-20) * abrégé; exemples 4,5,6 * | 1-90 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) |
| Y | COLLOCA STEFANO ET AL: "Vaccine Vectors Derived from a Large Collection of Simian Adenoviruses Induce Potent Cellular Immunity Across Multiple Species", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 4, no. 115, 1 janvier 2012 (2012-01-01), pages 47-55, XP009166675, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3002925 * le document en entier * | 1-90 | C12N A61K |
| -/- | | | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 3 avril 2017 | | Renggli-Zulliger, N | |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | | |

1
EPO FORM 1501 (3.02.2014)

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

B0 11338
BE 201605611

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.

03-04-2017

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 2005071093 A2 | 04-08-2005 | AT 449105 T | 15-12-2009 |
| | | AU 2005206292 A1 | 04-08-2005 |
| | | AU 2011247884 A1 | 01-12-2011 |
| | | CA 2553541 A1 | 04-08-2005 |
| | | CA 2880060 A1 | 04-08-2005 |
| | | CA 2880061 A1 | 04-08-2005 |
| | | CN 101014613 A | 08-08-2007 |
| | | CN 102719478 A | 10-10-2012 |
| | | CY 1109841 T1 | 10-09-2014 |
| | | DK 1711518 T3 | 06-04-2010 |
| | | EP 1711518 A2 | 18-10-2006 |
| | | EP 2163260 A2 | 17-03-2010 |
| | | ES 2337374 T3 | 23-04-2010 |
| | | JP 4814800 B2 | 16-11-2011 |
| | | JP 5427874 B2 | 26-02-2014 |
| | | JP 5753377 B2 | 22-07-2015 |
| | | JP 2007518414 A | 12-07-2007 |
| | | JP 2011120588 A | 23-06-2011 |
| | | JP 2012110326 A | 14-06-2012 |
| | | JP 2014158467 A | 04-09-2014 |
| | | PT 1711518 E | 26-02-2010 |
| | | SI 1711518 T1 | 30-04-2010 |
| | | US 2011217332 A1 | 08-09-2011 |
| | | US 2012328651 A1 | 27-12-2012 |
| | | WO 2005071093 A2 | 04-08-2005 |
| WO 2006133911 A2 | 21-12-2006 | AU 2006257323 A1 | 21-12-2006 |
| | | CA 2610919 A1 | 21-12-2006 |
| | | CN 101213204 A | 02-07-2008 |
| | | EP 1893636 A2 | 05-03-2008 |
| | | EP 2570423 A1 | 20-03-2013 |
| | | HK 1123055 A1 | 21-03-2014 |
| | | JP 5475279 B2 | 16-04-2014 |
| | | JP 2008543295 A | 04-12-2008 |
| | | US 2009035277 A1 | 05-02-2009 |
| | | WO 2006133911 A2 | 21-12-2006 |
| WO 2013123579 A1 | 29-08-2013 | AUCUN | |
| WO 2011130627 A2 | 20-10-2011 | EP 2560680 A2 | 27-02-2013 |
| | | US 2013101618 A1 | 25-04-2013 |
| | | US 2017044571 A1 | 16-02-2017 |
| | | WO 2011130627 A2 | 20-10-2011 |
| WO 2006033672 A2 | 30-03-2006 | CA 2563500 A1 | 30-03-2006 |
| | | EP 1742657 A2 | 17-01-2007 |

EPC FORM P043

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

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

BO 11338
BE 201605611

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.

03-04-2017

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| | | ES 2442225 T3 | 10-02-2014 |
| | | JP 2007535541 A | 06-12-2007 |
| | | US 2007231347 A1 | 04-10-2007 |
| | | WO 2006033672 A2 | 30-03-2006 |
| WO 03070187 A2 | 28-08-2003 | AU 2003213118 A1 | 09-09-2003 |
| | | US 2003235593 A1 | 25-12-2003 |
| | | US 2007184074 A1 | 09-08-2007 |
| | | US 2008242630 A1 | 02-10-2008 |
| | | US 2010183657 A1 | 22-07-2010 |
| | | US 2010183677 A1 | 22-07-2010 |
| | | WO 03070187 A2 | 28-08-2003 |
| WO 2006117240 A2 | 09-11-2006 | AT 543832 T | 15-02-2012 |
| | | AU 2006243357 A1 | 09-11-2006 |
| | | BR PI0611347 A2 | 31-08-2010 |
| | | CA 2607715 A1 | 09-11-2006 |
| | | CA 2821389 A1 | 09-11-2006 |
| | | CN 101273055 A | 24-09-2008 |
| | | CN 102617739 A | 01-08-2012 |
| | | CN 106390108 A | 15-02-2017 |
| | | CY 1112851 T1 | 10-02-2016 |
| | | DK 1877426 T3 | 14-05-2012 |
| | | DK 2426141 T3 | 10-11-2014 |
| | | DK 2457926 T3 | 05-01-2015 |
| | | EA 200702081 A1 | 28-04-2008 |
| | | EP 1877426 A2 | 16-01-2008 |
| | | EP 2426141 A2 | 07-03-2012 |
| | | EP 2457926 A1 | 30-05-2012 |
| | | ES 2381492 T3 | 28-05-2012 |
| | | ES 2524570 T3 | 10-12-2014 |
| | | ES 2524572 T3 | 10-12-2014 |
| | | HR P20120331 T1 | 31-05-2012 |
| | | HR P20141125 T1 | 02-01-2015 |
| | | HR P20141184 T1 | 13-03-2015 |
| | | IL 186654 A | 30-04-2013 |
| | | IL 215112 A | 31-07-2013 |
| | | JP 5164830 B2 | 21-03-2013 |
| | | JP 5659207 B2 | 28-01-2015 |
| | | JP 2008539187 A | 13-11-2008 |
| | | JP 2012065650 A | 05-04-2012 |
| | | JP 2013040190 A | 28-02-2013 |
| | | JP 2015057403 A | 26-03-2015 |
| | | KR 20080021624 A | 07-03-2008 |
| | | KR 20120089475 A | 10-08-2012 |
| | | KR 20130110233 A | 08-10-2013 |

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

B0 11338
BE 201605611

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.

03-04-2017

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| | | KR 20150036658 A | 07-04-2015 |
| | | MA 29678 B1 | 01-08-2008 |
| | | NZ 562729 A | 30-10-2009 |
| | | PH 12013502449 A1 | 14-12-2015 |
| | | PT 1877426 E | 02-05-2012 |
| | | PT 2426141 E | 25-11-2014 |
| | | PT 2457926 E | 25-11-2014 |
| | | SI 1877426 T1 | 29-06-2012 |
| | | SI 2426141 T1 | 30-01-2015 |
| | | SI 2457926 T1 | 30-01-2015 |
| | | US 2009123491 A1 | 14-05-2009 |
| | | US 2014050776 A1 | 20-02-2014 |
| | | US 2015231224 A1 | 20-08-2015 |
| | | WO 2006117240 A2 | 09-11-2006 |
| ----- | | | |



OPINION ÉCRITE

| | | | |
|--|---|--|---------------------------|
| Dossier N° BO11338 | Date du dépôt (jour/mois/année) 25.07.2016 | Date de priorité (jour/mois/année) 27.07.2015 | Demande n° BE201605611 |
| Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/04 C12N7/00 C12N15/861 C07K14/075 | | | |
| 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

Renggli-Zulliger, N

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201605611

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 | 1-90 |
| | Non : | Revendications | |
| Activité inventive | Oui : | Revendications | |
| | Non : | Revendications | 1-90 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : | Revendications | 1-90 |
| | Non : | Revendications | |

2. Citations et explications

voir feuille séparée

1 **Point V**

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 WO 2005/071093 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CIRILLO AGOSTINO [IT]; COLLOCA STE) 4 août 2005 (2005-08-04)
- D2 WO 2006/133911 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; LAHM ARMIN [IT]; COLLOCA STEFANO () 21 décembre 2006 (2006-12-21)
- D3 WO 2013/123579 A1 (UNIV MCMASTER [CA]) 29 août 2013 (2013-08-29)
- D4 WO 2011/130627 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; OKAIROS AG [IT]; SULLIVAN NANCY J [US) 20 octobre 2011 (2011-10-20)
- D5 COLLOCA STEFANO ET AL: "Vaccine Vectors Derived from a Large Collection of Simian Adenoviruses Induce Potent Cellular Immunity Across Multiple Species",
SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, vol. 4, no. 115, 1 janvier 2012 (2012-01-01), pages 47-55, XP009166675, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3002925
- D6 NEHA DALMIA ET AL: "Prime-boost approaches to tuberculosis vaccine development",
EXPERT REVIEW OF VACCINES,
vol. 11, no. 10, 1 octobre 2012 (2012-10-01), pages 1221-1233, XP055309819,
GB
ISSN: 1476-0584, DOI: 10.1586/erv.12.94
- D7 WO 2006/033672 A2 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; WILSON JAMES M [US]; ZHI YAN [US]) 30 mars 2006 (2006-03-30)
- D8 WO 03/070187 A2 (CORIXA CORP [US]; SKEIKY YASIR [US]; GUDERIAN JEFF [US]; REED STEVEN () 28 août 2003 (2003-08-28)
- D9 WO 2006/117240 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; INFECTIOUS DISEASE RES INST ID [US]; C) 9 novembre 2006 (2006-11-09)

2 **Nouveauté**

- 2.1 Aucun documents de l'état de la technique cité dans le rapport de recherche ne divulgue un vaccin comprenant comme "primo-immunisation " et comme "rappel " (prime-boost) un adénovirus (ChAd) exprimant au moins Rv1196 et/ ou Rv025 or MI72 comme antigène de fusion.

C'est pourquoi, l'objet des revendications 1-90 est considéré nouveau au vu de l'art antérieur cité.

3 **Activité inventive**

- 3.1 D7 qui divulgue un schéma de vaccination contre le virus Ebola comprenant un "prime-boost " basé sur l'expression d'un antigène par un adénovirus. D7 est considéré comme l'état de la technique le plus proche.

D7 suggère l'utilisation de ce schéma de vaccination utilisant l'adénovirus contre *Mycobacterium tuberculosis*, et suggère de supprimer les régions E de l'adénovirus.

La différence entre D7 et la présente demande est l'utilisation de Rv01196 et/ ou Rv0125 comme antigène.

Il n'y pas d'effet technique surprenant démontré lié à cette différence.

Le problème à résoudre est par conséquent la mise à disposition d'un vaccin contre *Mycobacterium tuberculosis* .

WO2005071093 (D1) décrit un adénovirus de chimpanzé de type 3 qui est 100% identique aux SEQ. ID 11,12 et 16 et 99,9% identique à la SEQ. ID 13 utilisé comme vaccine contre *Mycobacterium tuberculosis* en général (revendication 7).

WO2006133911 (D2) décrit ChAd3 (exemple 2, tableau 1) dont les séquences sont 100% identiques aux séquences SEQ. ID 10,11,12 et 16 et 99.9% identique à la SEQ. ID 13. Il est utilisé comme vaccin contre l'hépatite C (HCV). Il inclut les délétions Δ E1, E3,E4 et/ou E4Ad5orf6 (exemple 2). Chad63 (exemple 3, tableau 3) comprend les délétions Δ E1, E3,E4 et/ou E4Ad5orf6.

WO2013123579 (D3) décrit un adénovirus de chimpanzé, de manière préférée, ChAd3 or ChAd63 codant pour un antigène de *Mycobacterium tuberculosis*. Des régimes de "prime and boost" homologues et hétérologues utilisant des adénovirus de chimpanzé sont évalués dans le paragraphe [40].

WO2011130627 (D4) décrit ChAd63 (SEQ. ID 4,5,6) qui est 100% identique à la SEQ. ID 18 et Chad3 qui sont utilisés comme vaccin " prime-boost " contre le virus Ebola.

D1 to D5 décrivent l'utilisation comme vaccin des adénovirus Chad3 et/ou Chad63.

Les antigènes spécifiques utilisés sont connus et sont protecteurs. L'antigène M170 utilisé comme vaccin ayant un schéma d'administration de type "prime boost" est divulgué dans D8, D9 et Rv1196 et Rv0125 sont décrits dans D6.

C'est pourquoi, la combinaison de ces documents est évidente à moins qu'un effet technique inattendu soit démontré pour une combinaison spécifique décrite dans la présente demande telle que déposée.

Il est noté que la présente demande ne décrit dans ses exemples que des résultats incluant la séquence optimisée de M72 (SEQ. ID 8) exprimée dans ChAd3 et ChAd63 utilisant un schéma d'administration de type " prime-boost" et comprenant de grandes délétions des régions E (page 68). Il n'y a pas de résultats concernant Rv1196 ou Rv0125 dans ChAd.

C'est pourquoi, l'objet des revendications 1-90 n'implique pas d'activité inventive.

4 Remarque

- 4.1 Les revendications 1-4,17-70 concernent une méthode de traitement chirurgical/thérapeutique du corps humain/animal. Par conséquent, leur objet n'est pas brevetable. Cependant, les revendications ayant pour objet un produit, notamment des substances ou compositions destinées à être utilisées dans un premier traitement médical ou tout traitement médical suivant peuvent être acceptées.