



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2009/06/16	(51) Cl.Int./Int.Cl. <i>C12N 7/04</i> (2006.01), <i>A61K 39/29</i> (2006.01), <i>A61K 39/295</i> (2006.01), <i>C07K 14/02</i> (2006.01), <i>C07K 14/18</i> (2006.01), <i>C12N 15/62</i> (2006.01)
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2009/12/23	
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2018/11/20	
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2010/12/16	(72) Inventeurs/Inventors: ROINGEARD, PHILIPPE, FR; HOURIOUX, CHRISTOPHE, FR; PATIENT, ROMUALD, FR
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2009/051142	(73) Propriétaire/Owner: UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS DE TOURS, FR
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2009/153518	(74) Agent: LAVERY, DE BILLY, LLP
(30) Priorité/Priority: 2008/06/17 (FR0803377)	

(54) Titre : NOUVELLES PROTEINES DE FUSION ET LEUR APPLICATION POUR LA PREPARATION DE VACCINS
CONTRE L'HEPATITE C
(54) Title: NOVEL FUSION PROTEINS AND USE THEREOF FOR PREPARING HEPATITIS C VACCINES

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne une protéine de fusion immunogène qui comprend au moins du côté C-terminal, un premier peptide constitué de la protéine S déletée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale d'un isolât du virus de l'hépatite B (HBV), et du côté N-terminal, un second peptide constitué du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'au moins une protéine d'enveloppe d'un isolât du virus de l'hépatite C (HCV). L'invention a également pour objet une molécule d'acides nucléiques hybride codant ladite protéine de fusion, ainsi qu'un vecteur comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride, une particule sous virale comprenant ladite protéine de fusion, une composition immunogène comprenant au moins ladite protéine de fusion, ou au moins ladite molécule d'acides nucléiques hybride, ou au moins ladite particule sous-virale, et une lignée cellulaire pour la production de ladite protéine de fusion, ou de ladite molécule d'acides nucléiques hybride, ou de ladite particule sous-virale.

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/153518 A3(43) Date de la publication internationale
23 décembre 2009 (23.12.2009)

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 7/04 (2006.01) *A61K 39/29* (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01) *A61K 39/295* (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2009/051142

(22) Date de dépôt international :

16 juin 2009 (16.06.2009)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0803377 17 juin 2008 (17.06.2008) FR

(71) **Déposant** (*pour tous les États désignés sauf US*) :
UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS DE TOURS
 [FR/FR]; 3, rue Tanneurs, BP 4103, F-37041 Tours
 Cedex 01 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) **Inventeurs/Déposants** (*pour US seulement*) :
ROINGEARD, Philippe [FR/FR]; 14, résidence de la
 Baraudière, F-37510 Savonnières (FR). **HOURIOUX,**
Christophe [FR/FR]; 20, rue des Fonchers, F-37190
 Druye (FR). **PATIENT, Romuald** [FR/FR]; 21bis, rue
 d'Amboise, F-37300 Joue-les-tours (FR).

(74) **Mandataires** : **GROSSET-FOURNIER, Chantal** et al.;
 Grosset-Fournier & Demachy, 54, rue Saint-Lazare,
 F-75009 Paris (FR).

(81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre
 de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
 CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
 DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
 HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
 KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
 ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
 NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
 SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
 TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(88) **Date de publication du rapport de recherche
 internationale :**

11 février 2010

(54) **Title** : NOVEL FUSION PROTEINS AND USE THEREOF FOR PREPARING HEPATITIS C VACCINES

(54) **Titre** : NOUVELLES PROTEINES DE FUSION ET LEUR APPLICATION POUR LA PREPARATION DE VACCINS CONTRE L'HEPATITE C

(57) **Abstract** : The present invention relates to an immunogenic fusion protein which comprises at least, on the C-terminal side, a first peptide constituted of the S protein deleted of the transmembrane domain thereof located at the N-terminal end thereof, of a hepatitis B virus (HBV) isolate, and on the N-terminal side, a second peptide constituted of the transmembrane domain and of the ectodomain of at least one envelope protein of a hepatitis C virus (HCV) isolate. The subject matter of the invention is also a hybrid nucleic acid molecule encoding said fusion protein, and also a vector comprising said hybrid nucleic acid molecule, a subviral particle comprising said fusion protein, an immunogenic composition comprising at least said fusion protein, or at least said hybrid nucleic acid molecule, or at least said subviral particle, and a cell line for the production of said fusion protein, or of said hybrid nucleic acid molecule, or of said subviral particle.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne une protéine de fusion immunogène qui comprend au moins du côté C-terminal, un premier peptide constitué de la protéine S déletée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale d'un isolat du virus de l'hépatite B (HBV), et du côté N-terminal, un second peptide constitué du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'au moins une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C (HCV). L'invention a également pour objet une molécule d'acides nucléiques hybride codant ladite protéine de fusion, ainsi qu'un vecteur comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride, une particule sous virale comprenant ladite protéine de fusion, une composition immunogène comprenant au moins ladite protéine de fusion, ou au moins ladite molécule d'acides nucléiques hybride, ou au moins ladite particule sous-virale, et une lignée cellulaire pour la production de ladite protéine de fusion, ou de ladite molécule d'acides nucléiques hybride, ou de ladite particule sous-virale.



WO 2009/153518 A3

Nouvelles protéines de fusion et leur application pour la préparation de vaccins contre l'hépatite C

5 L'invention a pour objet de nouvelles protéines de fusion et leur application
notamment pour la préparation de vaccins destinés à la prévention et/ou au traitement
prophylactique et/ou thérapeutique de l'hépatite C, ou à la prévention et/ou au traitement
prophylactique et/ou thérapeutique de l'hépatite C et de l'hépatite B. La présente invention
concerne également l'obtention de particules d'enveloppes sous virales chimères entre les
10 protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite B (HBV, pour hepatitis B virus) et du virus de
l'hépatite C (HCV, pour hepatitis C virus).

Le virus de l'hépatite C, identifié en 1989, puis cloné et séquencé, représente encore
à l'heure actuelle un réel problème de santé publique du fait de sa large répartition à travers
15 le monde et de l'évolution fréquente de la maladie vers la chronicité. En 2000, l'OMS
estimait qu'environ 3% de la population mondiale, soit environ 170 millions de personnes,
était infectée par le HCV.

Le HCV induit des hépatites chroniques qui peuvent évoluer vers la cirrhose et le
carcinome hépatocellulaire. L'interféron et la ribavirine forment le traitement de base des
20 hépatites chroniques induites par le HCV, mais ces traitements ne sont pas suffisamment
efficaces et ont des effets secondaires importants. Les traitements disponibles restent
coûteux, relativement toxiques et ne sont efficaces que dans la moitié des cas d'infection.

Bien que l'intégralité du génome et que les protéines virales soient connus depuis de
nombreuses années, sa structure et sa morphogenèse restent hypothétiques. Aujourd'hui
25 encore, il n'existe aucun vaccin contre l'hépatite C, et la recherche d'un tel candidat vaccin
est actuellement très active, [Houghton, M., and Abrignani, S. (2005). Prospects for a
vaccine against the hepatitis C virus. Nature 436 (7053), 961-6].

Dans le cas d'un vaccin prophylactique, la quasi-totalité des candidats potentiels
reposent sur l'utilisation de l'une des deux ou des deux protéines d'enveloppe du HCV,
30 communément dénommées les protéines E1 et E2, et susceptibles d'induire à la fois une
réponse immunitaire cellulaire, et une réponse humorale neutralisante.

Cependant, les protéines E1 et E2 du HCV ne s'auto-assemblent pas en particules
sous-virales comme cela peut être le cas pour d'autres virus. Par ailleurs, du fait d'une

forte rétention de leur région transmembranaire dans le réticulum endoplasmique, leur purification nécessite de les solubiliser avec des détergents. Il en résulte des rendements décevants et la pureté des fractions obtenues est médiocre [Forns, X., Bukh, J., and Purcell, R. H. (2002). The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. J Hepatol 37(5), 684-95].

L'alternative consistant à recourir aux protéines d'enveloppe délétées de leur domaine transmembranaire permet de favoriser la sécrétion de E1 et E2 à l'extérieur de la cellule, mais le changement de conformation tridimensionnelle qui en résulte peut s'avérer indésirable du fait d'une qualité antigénique amoindrie au regards des protéines sauvages.

Le virus HBV existe sous deux formes : sous la forme de virions infectieux, et sous la forme de particules d'excès d'enveloppe que l'on retrouve dans le sang des sujets infectés en quantité bien plus importante que le virus lui-même. Ce phénomène est dû à la capacité de la protéine S du HBV à s'auto-assembler et à bourgeonner en particules sous-virales (ou d'excès d'enveloppe) qui ne contiennent pas de protéine de capsid ni d'acide nucléique [Moriarty, A. M., Hoyer, B. H., Shih, J. W., Gerin, J. L., and Hamer, D. H. (1981). Expression of the hepatitis B virus surface antigen gene in cell culture by using a simian virus 40 vector. Proc Natl Acad Sci U S A 78(4), 2606-10]. La protéine S sauvage du HBV comporte quatre domaines transmembranaires. Les particules sous-virales qui résultent de l'auto-assemblage de la protéine S sauvage sont non infectieuses mais très immunogènes : elles sont considérées comme un bon candidat vaccin contre l'hépatite B depuis le milieu des années 70. Elles ont en effet servi de fondement à l'élaboration de vaccins ayant fait la preuve de leur efficacité à induire une réponse immunitaire protectrice de l'infection par le HBV.

L'utilisation des particules sous-virales d'enveloppe de HBV comme vecteur de protéines étrangères au virus de l'hépatite B a déjà fait l'objet de travaux antérieurs. Ainsi la demande de brevet n° US2004/0146529 intitulée « HBV /HCV virus like particle » décrit l'obtention de chimères d'enveloppe HBV-HCV comportant, d'une part, systématiquement l'intégralité de la protéine S du virus HBV, et, d'autre part, d'après les exemples, un fragment de l'ectodomaine d'une des protéines d'enveloppes E1 ou E2 de HCV, greffé à l'extrémité N-terminale de la protéine S du virus HBV [Mark Selby, Edward Glazer and Michael Houghton « HBV/HCV virus-like particle » brevet US n°2004/0146529].

Cependant il n'est pas démontré que ces constructions peuvent induire la formation de particules sous-virales bien structurées, et qu'elles sont susceptibles d'induire une réponse antigénique de qualité.

5 En réponse aux inconvénients de l'art antérieur, la présente invention a pour but de fournir une protéine de fusion HCV-HBV capable de former des particules sous-virales non infectieuses, bien structurées et efficacement secrétées, et contenant la quasi-totalité de E1 et/ou E2.

10 Un des objectifs de l'invention est également de fournir un vaccin contre l'hépatite C et/ou contre l'hépatite B.

Un intérêt supplémentaire de l'invention vient du fait qu'elle peut aisément s'adapter aux chaînes existantes de production industrielles des vaccins contre l'hépatite B actuellement commercialisés.

15

L'invention a pour objet une protéine de fusion immunogène comprenant au moins les deux peptides suivants:

a)- du côté C-terminal, un premier peptide constitué :

20 - de la séquence d'acides aminés de la protéine S d'un isolat du virus de l'hépatite B (HBV), laquelle protéine S est déletée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S déletée en N-terminal, sous
25 réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, ou,

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un autre isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides aminés de ladite protéine S déletée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve
30 la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, et,

b)- du côté N-terminal, un second peptide constitué :

- de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'au moins une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C (HCV), ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'un isolat du virus de l'hépatite C, sous réserve que ladite

5 séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou,

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides aminés d'une des dites protéines E1 ou E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés

10 immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

ledit second peptide étant choisi parmi la protéine E1, la protéine E2 ou un peptide de fusion comprenant la protéine E1 et la protéine E2.

L'invention concerne également une protéine de fusion immunogène ayant une

15 séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 83%, notamment d'au moins 85%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec la séquence d'acides aminés constituée de la protéine S déletée de son domaine transmembranaire N-terminal (Sd), du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'un isolat du virus de l'hépatite C (E1 ou E2).

On entend par « **protéine de fusion** », toute protéine comprenant au moins la protéine S déletée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale d'un isolat du HBV (Sd), et la quasi-intégralité d'une protéine d'enveloppe E1 et/ou E2 d'un isolat du HCV, dont le domaine transmembranaire se substitue à celui déleté en N-terminal de S du HBV

20 (Figures 3B, 3C, 4D et 4E).

On entend par « **protéine immunogène** », toute protéine, notamment toute protéine de fusion selon l'invention ainsi que tout fragment de toute protéine de fusion décrit ici, dotée de propriétés antigéniques et capable d'induire une réaction ou une réponse immunitaire. En

30 particulier, une protéine est considérée comme immunogène envers HCV et/ou HBV, si elle induit respectivement après immunisation une réponse humorale anti-E1, anti-E2 et/ou anti-S, détectée par exemple selon un protocole décrit :

- par Huzly *et al.*, 2008, en ce qui concerne HBV, [Huzly D, Schenk T, Jilg W, Neumann-Haefelin D. Comparison of nine commercially available assays for quantification

of antibody response to hepatitis B virus surface antigen. J Clin Microbiol. 2008 Apr, 46(4):1298-306], ou,

- par Hamed *et al.*, 2008, en ce qui concerne HCV, [Hamed MR, Tarr AW, McClure CP, Ball JK, Hickling TP, Irving WL. Association of antibodies to hepatitis C virus glycoproteins 1 and 2 (anti-E1E2) with HCV disease. J Viral Hepat. 2008 May, 15(5):339-45].

On entend par « **capacité à former des particules sous-virales** », l'aptitude de toute protéine, notamment la protéine S du HBV, particulièrement de la protéine S délétée de son domaine transmembranaire N-terminal, et plus particulièrement d'une protéine de fusion de l'invention comprenant la protéine S délétée en N-terminal, à s'assembler en présence de la protéine S sauvage ou, le cas échéant, à s'auto-assembler, en particules sous-virales filamenteuses ou sphériques ; la dite capacité à former des particules sous-virales pouvant au moins être mise en évidence par observation selon notamment une analyse en microscopie électronique, et notamment par le test décrit dans l'exemple 1 et 2 (§I-5 et §II-7) de ce document et notamment illustré par les figures 7D, 7G, 11B à 11D.

On entend par « **particule sous-virale non infectieuse** », toute particule filamenteuse ou sphérique, résultant de l'assemblage de la protéine S sauvage du HBV (figure 2B) et/ou de la protéine S délétée de son domaine transmembranaire N-terminal, ladite particule étant dépourvue du génome viral, et notamment synthétisée et sécrétée en très large excès, et qui peut être analysé par tout protocole permettant de mettre en évidence l'absence de fragments nucléotidiques spécifiques de HBV ou de HCV, tel que notamment, par l'amplification par PCR antérieurement décrite par exemple:

- en ce qui concerne HCV, par [Halfon P, Bourlière M, Ouzan D, Sène D, Saadoun D, Khiri H, Pénaranda G, Martineau A, Oulès V, Cacoub P. Occult HCV infection revisited with ultra-sensitive real-time PCR assay. J. Clin. Microbiol. 2008 Apr 30],
- en ce qui concerne HCV, par [Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, Thamm S, Zoulim F. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. J. Clin. Microbiol. 2007 Dec. 45(12):3948-53],

et dont le résultat est négatif.

On entend par « **isolat du virus HCV** », tout isolat membre de la famille des *Flaviviridae* et appartenant au genre *Hepacivirus* et constitué d'une polyprotéine de plus de 3 000 acides aminés du virus HCV, schématisée dans la figure 1 [Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244(4902), 359-362 ; Choo et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) v88:2451-2455; Han et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715]; ou tout isolat classifié par l'International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) comme étant apparenté au HCV.

On entend par « **isolat du virus HBV** », tout isolat membre de la famille des *Hepadnaviridae* et appartenant au genre *Orthohepadnavirus*, ou tout isolat classifié par l'International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) comme étant apparenté au HBV [Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol. 2007 Jan 7; 13(1):14-21].

On entend par « **protéines S** » ou par « **protéine S sauvage** » (S) :

- la protéine d'enveloppe d'un isolat du virus HBV comprenant notamment 226 acides aminés et comportant quatre domaines transmembranaires (Figure 2A), et notamment la protéine d'enveloppe de l'isolat HBV_{adw}, ou
- le variant naturel issu d'un isolat du virus HBV, ou le variant synthétique de la protéine susmentionnée.

On entend par « **assemblage** » la capacité d'une protéine à former des particules sous-virales en s'associant à la protéine S sauvage. On entend par « **auto assemblage** » la capacité d'une protéine à former par elle-même des particules sous-virales.

On entend par « **protéine S déléetée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale** » ou par « **protéine S déléetée en N-terminal** » ou par « **protéine S déléetée** » (S_d):

- la protéine S susdéfinie, déléetée de la région comprise de l'acide aminé en position 1 à celui en position 19, ou en position 1 à celui en position 20, ou en position 1 à celui en position 21, et préférentiellement en position 1 à celui en position 22 de la protéine S d'un isolat du virus HBV, ou

- la protéine S susmentionnée présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite région de la protéine S délétée, ou
 - le « variant naturel » issu d'un isolat du virus HBV, ou le « variant synthétique » de la
- 5 protéine S délétée susmentionnée.

On entend par « **protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C** », la quasi-intégralité de l'une des deux protéines E1 et E2, constituées de leur ectodomaine et de leur domaine transmembranaire (Figure 4B et 4C), et, correspondant :

- 10 * aux fragments peptidiques de la polyprotéine du virus HCV, et notamment de l'isolat HCV-1a du virus HCV, localisés dans les régions comprises:
- de l'acide aminé en position 192 à celui en position 383, ou notamment de l'acide aminé en position 192 à celui en position 380, en ce qui concerne la protéine E1, et,
 - de l'acide aminé en position 384 à celui en position 746, ou notamment de l'acide
- 15 aminé en position 384 à celui en position 743, en ce qui concerne la protéine E2; ou
- * les fragments présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite région E1 susmentionnée, ou
 - * les fragments présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins
- 20 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite région E2 susmentionnée, ou
- * les variants naturels ou à des variants synthétiques de la polyprotéine d'un isolat du virus HCV.

- 25 On entend par « **ectodomaine des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C** »,
- * les parties de fragments peptidiques de E1 ou E2, issues de la polyprotéine du virus HCV, et notamment de l'isolat HCV-1a du virus HCV, localisés dans les régions comprises:
- de l'acide aminé en position 192 à celui en position 352, ou notamment de l'acide aminé en position 192 à celui en position 352, en ce qui concerne l'ectodomaine de la
- 30 protéine E1, et,
- de l'acide aminé en position 384 à celui en position 717, ou notamment de l'acide aminé en position 384 à celui en position 717, en ce qui concerne l'ectodomaine de la protéine E2 ; ou

* à des fragments présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite région E1 susmentionnée, ou

* à des fragments présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite région E2 susmentionnée, ou

* à des variants naturels ou à des variants synthétiques de la polyprotéine d'un isolat du virus HCV.

10 On entend par « **domaines transmembranaires des protéines d'enveloppe du virus de l'hépatite C** »,

* les parties de fragments peptidiques de E1 ou E2, issues de la polyprotéine du virus HCV, et notamment de l'isolat HCV-1a du virus HCV, localisés dans les régions comprises :

- de l'acide aminé en position 353 à celui en position 383, et avantageusement de l'acide aminé en position 353 à celui en position 380, en ce qui concerne le domaine transmembranaire de la protéine E1, et,

- de l'acide aminé en position 718 à celui en position 746 et avantageusement de l'acide aminé en position 718 à celui en position 743, en ce qui concerne le domaine transmembranaire de la protéine E2 ; ou

20 * les fragments présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite région E1 susmentionnée, ou

* les fragments présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite région E2 susmentionnée, ou

* les **variants naturels** ou **variants synthétiques** de la polyprotéine d'un isolat du virus HCV.

30 On entend par « **pourcentage d'identité** », le pourcentage déterminé par comparaison directe de deux séquences de molécules polypeptidiques, en déterminant le nombre de résidus d'acides aminés aux deux séquences, puis en le divisant par le nombre de résidus d'acides aminés de la séquence la plus longue des deux, et en multipliant le résultat par 100.

Un objet de la présente invention porte sur une protéine de fusion comportant toute séquence nucléotidique et/ou peptidique d'un quelconque isolat du virus HCV et/ou du virus

HBV, et ce quel que soit le pourcentage d'identité susmentionné de ladite séquence au regard des séquences spécifiques mentionnées ici.

Le terme « **variant naturel** » fait référence à toute variabilité, tout polymorphisme, toute diversité, d'une séquence d'ADN, d'un allèle, ou d'une séquence de protéine, entre isolats
5 d'une même espèce ou d'une même population. On détermine le « **pourcentage de variabilité naturelle** » par comparaison directe de deux molécules polypeptidiques, ou polynucléotidiques, dérivée d'une molécule de référence sauvage et dotées de propriétés biologiques d'intérêt, telles que des propriétés immunogènes et/ou la capacité à former des particules sous-virales. Il se quantifie en déterminant le nombre exact de résidus d'acides
10 aminés, ou d'acides nucléiques, identiques entre les deux séquences, puis en les divisant par le nombre de résidus d'acides aminés, ou d'acides nucléiques, de la séquence la plus courte des deux, et en multipliant le résultat par 100.

Ledit pourcentage de variabilité entre deux séquences est particulièrement versatile car il dépend notamment du virus considéré, du génotype considéré, du fragment de séquence
15 considéré – la région de l'ectodomaine du HCV étant par exemple plus variable que la région du domaine transmembranaire -, etc... Ainsi, le pourcentage de variabilité des protéines E1 et E2 du HCV, est de 88% en nucléotide, et de 90% en acides aminés, entre souches d'un même génotype. Mais elle tombe à 55% en nucléotide, et à 59% en acides aminés, entre souches de différents génotypes. HBV étant un virus à ADN, il est beaucoup moins variable que le HCV
20 [Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, Korber B. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. Glycobiology. 2004 Dec. 14(12):1229-46].

Un objet de la présente invention porte sur une protéine de fusion, et/ou une molécule
25 d'acides nucléiques hybride, comportant tout variant naturel ou tout fragment de variant naturel, dotée d'une séquence peptidique et/ou nucléotidique issue d'un quelconque isolat du virus HCV et/ou du virus HBV, et ce quel que soit le pourcentage de variabilité naturelle et/ou synthétique, susmentionnée de ladite séquence au regard des séquences spécifiques décrites ici.

30

Le terme « **variant synthétique** » fait référence à toute molécule polypeptidique, ou polynucléotidique selon l'invention, ou tout fragment de molécule polypeptidique, ou polynucléotidique décrit ici, dérivée par recombinaison d'une molécule sauvage de référence, soit par adition, délétion, substitution, à ladite molécule sauvage de référence, sous réserve

qu'elle conserve les propriétés biologiques d'intérêt, telles que des propriétés immunogènes et/ou la capacité à former des particules sous-virales. On détermine le « **pourcentage de variabilité synthétique** » par comparaison directe de ladite molécule dérivée à ladite molécule sauvage de référence, et en déterminant le nombre exact de résidus d'acides aminés, ou d'acides nucléiques, identiques entre les deux séquences, au regard de leur position et de leur nature, puis en les divisant par le nombre de résidus d'acides aminés, ou d'acides nucléiques, de la séquence la plus courte des deux, et en multipliant le résultat par 100.

Un objet de la présente invention porte sur une protéine de fusion comportant tout variant synthétique ou tout fragment de variant synthétique, doté d'une séquence nucléotidique et/ou peptidique dérivé d'un quelconque isolat du virus HCV et/ou du virus HBV.

Selon un aspect particulièrement avantageux de l'invention, les domaines transmembranaires de E1 et/ou de E2, et constituant une partie de la protéine de fusion, sont délétés d'au moins l'un des trois derniers acides aminés, et notamment des trois derniers acides aminés, situés en position C-terminale, de sorte que lesdits domaines transmembranaires délétés de E1 et/ou de E2 présentent un pourcentage d'identité avec les domaines transmembranaires de E1 et/ou E2 sauvages, d'au moins 91%, en ce qui concerne E1 et d'au moins 90%, en ce qui concerne E2.

Ladite délétion d'au moins l'un des trois acides aminés, et notamment des trois derniers acides aminés, en position C-terminale présente l'avantage d'inactiver le site de clivage des peptidases représenté sur la figure 1 par le symbole $\times$, et qui est nécessaire à la maturation de la polyprotéine du HCV, mais qui est indésirable dans le cadre des constructions chimériques de la présente invention.

[1]. L'invention a pour objet une protéine de fusion immunogène comprenant au moins les deux peptides suivants:

a)- du côté C-terminal, un premier peptide constitué :

- de la séquence d'acides aminés de la protéine S d'un isolat du virus de l'hépatite B (HBV), laquelle protéine S est délétée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S délétée en N-terminal, sous

réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, ou,

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un autre isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite séquence d'acides aminés de la protéine S
5 déléetée, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, et,

b)- du côté N-terminal, un second peptide constitué :

- de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine
d'au moins une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C (HCV), ou

10 - d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%,
notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au
moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de
l'ectodomaine d'une protéine d'un isolat du virus de l'hépatite C, sous réserve que ladite
séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non
15 infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou
d'un variant synthétique dérivée de ladite séquence d'acides aminés, desdites protéines E1 ou
E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes
vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

20 ledit second peptide étant choisi parmi la protéine E1, la protéine E2 ou un peptide de fusion
comprenant la protéine E1 et la protéine E2.

L'objet de la présente invention porte notamment sur une protéine de fusion
comprenant au moins :

- d'une part la protéine S de HBV déléetée (Sd), essentiellement constitué de ses trois
25 domaines transmembranaires situés à l'extrémité C-terminale (figures 2A et 3A), ladite
protéine S déléetée conservant la capacité d'assemblage en particules sous-virales, et
conservant les propriétés immunogènes contre le virus HBV, et

- d'autre part la quasi-intégralité de la séquence d'une des protéines E1 et E2,
conservant également les propriétés immunogènes contre le virus HCV,

30 de sorte que ladite protéine de fusion, notamment représentée par les figures 3B ou 3C, soit
capable de s'assembler en particules sous-virales, en présence de la protéine S sauvage, et soit
susceptible d'induire une immunisation contre les virus HBV et/ou HCV, et notamment
d'induire une double immunisation contre les virus HBV et HCV.

[1a]. Avantageusement, la présente invention a pour objet une protéine de fusion immunogène susmentionnée, comprenant à l'extrémité N-terminale dudit second peptide (E1 ou E2), un troisième peptide constitué de la séquence d'acides aminés d'un peptide d'initiation de transfert (PIT) d'un isolat du virus de l'hépatite C.

5

On entend par « **peptide d'initiation de transfert** » d'une protéine E1 ou E2 (respectivement PIT1 et PIT2) ou d'une protéine de fusion selon l'invention,

* le fragment peptidique de la polyprotéine du virus HCV, et notamment de l'isolat HCV-1a, localisé dans la région comprise :

10 - de l'acide aminé en position 166 à celui en position 191 en ce qui concerne la protéine E1, et,

- de l'acide aminé en position 366 à celui en position 383 en ce qui concerne la protéine E2 ; ou

* le variant naturel issu d'un isolat du virus HCV, ou le variant synthétique dudit fragment
15 peptidique susmentionné, ou

* tout fragment peptidique greffé en N-terminal dudit second peptide, sous réserve que ledit fragment peptidique, quand il constitue une partie de la protéine de fusion de la présente invention, conserve la capacité à adresser, après traduction, ladite protéine de fusion au réticulum endoplasmique de sorte qu'elle soit correctement glycosylée
20 et que sa conformation tridimensionnelle, et/ou que ses qualités antigéniques, soient au mieux préservées au regard des protéines sauvages.

[2]. Selon un autre aspect particulièrement avantageux, la présente invention a pour objet une protéine de fusion immunogène susmentionnée, dans laquelle le second peptide
25 situé du côté N-terminal, est constitué :

- de la totalité de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe E1, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au
30 moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite protéine E1; sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

Un objet particulier de l'invention réside dans la protéine de fusion E1-Sd, dont on trouve une représentation schématique dans la figure 3B, et qui comprend la quasi-intégralité de la protéine E1 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

[3]. Avantageusement, la présente invention a particulièrement pour objet une protéine de fusion immunogène susmentionnée dans laquelle le second peptide situé du côté N-terminal, est constitué :

- de la totalité de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe E2, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine d'enveloppe E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

Un objet particulier de l'invention réside dans la protéine de fusion E2-Sd, dont on trouve une représentation schématique dans la figure 3C, et qui comprend la quasi-intégralité de la protéine E2 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

[3b]. A ce titre, l'invention porte plus particulièrement sur une protéine de fusion immunogène, comprenant les trois peptides suivants:

a)- du côté C-terminal, un premier peptide constitué :

- de la séquence d'acides aminés de la protéine S délétée de son domaine transmembranaire de l'extrémité N-terminale d'un isolat du virus de l'hépatite B, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel, issue d'un isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite la séquence d'acides aminés de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B ;

b)- un second peptide de séquence constitué :

- de la totalité de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'enveloppe E2 d'un isolat du virus de l'hépatite C, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de ladite protéine d'enveloppe, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel, issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite la séquence d'acides aminés de la protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, et,

c)- du côté N-terminal, un troisième peptide de séquence constituée :

- de la totalité de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'enveloppe E1, d'un isolat du virus de l'hépatite C, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de ladite protéine d'enveloppe, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel, issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite la séquence d'acides aminés d'une protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

ledit second peptide étant situé entre le premier et le troisième peptide, le premier, second et troisième peptides étant de préférence contigus.

Un objet particulier de l'invention réside dans la protéine de fusion E1-E2-Sd, qui comprend l'ectodomaine de E1 du HCV greffée en N-terminal de la quasi-intégralité de la protéine E2, elle même greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

Un objet particulier de l'invention réside également dans la protéine de fusion E2-E1-Sd, et qui comprend l'ectodomaine de E2 du HCV greffée en N-terminal de la quasi-intégralité de la protéine E1, elle même greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

5

[4]. Selon un aspect particulièrement avantageux de l'invention, le premier et le second peptide constituant la protéine de fusion immunogène sont contigus, et l'extrémité C-terminale du second peptide est liée de façon covalente à l'extrémité N-terminale du premier peptide.

10 Avantageusement, selon l'invention, les protéines E1 ou E2 du virus HCV, ou les fragments d'une protéine de fusion de l'invention PIT1-E1, PIT2-E2, E1-E2, ou PIT1-E1-E2 sont liés de façon covalente et contigüe à la protéine S délétée du virus HBV.

 Selon un autre aspect avantageux de l'invention, un peptide de liaison relie le premier et le second peptide constituant la protéine de fusion susmentionnée, le dit peptide de liaison
15 étant constitué de 1'acide aminé, ou de 2 acides aminés, ou de 3 acides aminés, ou de 4 acides aminés, ou de 5 acides aminés ; sous réserve que ladite protéine de fusion immunogène conserve la capacité à s'assembler en particules sous-virales, en présence de la protéine S sauvage, et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV, ou du virus HBV, ou, des virus HCV et HBV.

20

[5]. L'invention a également pour objet particulier, une protéine de fusion immunogène susmentionnée, dans laquelle le premier peptide en position C-terminale est constitué :

 - d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés dans la région comprise de l'acide aminé en position 23 à celui en position 226 de la protéine S
25 délétée en N-terminal du virus HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw,

 et notamment de la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°2, ou

 - d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides aminés contigus de la protéine S délétée en N-
30 terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, ou

 - de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides aminés de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à

former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B.

Un objet plus particulier de l'invention réside dans la protéine de fusion E1-Sd ou E2-Sd, ou E1-E2-Sd, pour laquelle protéine S déléetée est celle de l'isolat HBVadw et a pour
5 séquence la SEQ ID N°2 (cf tableau 1).

[6]. L'invention a également pour objet particulier une protéine de fusion immunogène susmentionnée, dans laquelle le second peptide en position N-terminale est constitué :

- d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés dans la
10 région comprise de l'acide aminé en position 192 à celui en position 380 de la protéine E1 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a,

et notamment de la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°4, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%,
notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au
15 moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés contigus de ladite protéine E1, sous réserve
que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus
de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou
d'un variant synthétique dérivée de ladite la séquence d'acides aminés contigus de ladite
20 protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés
immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet particulier, une protéine de fusion pour laquelle la
séquence de protéine E1 est issue de l'isolat HCV-1a, et correspond spécifiquement à la
région susmentionnée, telle que notamment les protéines de fusion E1-Sd de SEQ ID N°4 ou
25 E1-E2-Sd, PIT1-E1- E2-Sd (cf tableau 1).

[7]. L'invention porte particulièrement sur une protéine de fusion immunogène susmentionnée, dans laquelle le premier et le second peptide sont contigus, ladite protéine de
fusion étant constituée par :

30 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%,
notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au
moins 95%, avec SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la

capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique dérivée de ladite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV.

L'invention a également pour objet une protéine de fusion E1-Sd pour laquelle la séquence de protéine E1 est issue de l'isolat HCV-1a, et est dotée de la séquence SEQ ID N°8 susmentionnée, ladite séquence correspondant à la SEQ ID N°2 de Sd, greffée en amont de la SEQ ID N°4 de E1.

[7b]. A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet une protéine de fusion immunogène susmentionnée, comprenant un troisième peptide d'initiation de transfert situé du côté N-terminal du second peptide, ladite protéine de fusion étant représentée par :

- la SEQ ID N°12, ou

- une séquence d'acides aminés présentant une homologie d'identité d'au moins 83%, notamment d'au moins 85%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec ladite SEQ ID N°12, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique dérivée de ladite SEQ ID N°12, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, protéine de fusion PIT1-E1-Sd pour laquelle la séquence de protéine E1 est issue de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, et est dotée de la séquence SEQ ID N°12 susmentionnée, ladite séquence correspondant à la SEQ ID N°2 de Sd, greffée en N-terminal de la SEQ ID N°4 de E1, elle même greffée en N-terminal de la séquence d'acides aminés du peptide d'initiation de transfert de la protéine E1 (PIT1) compris dans la région constituée de l'acide aminé en position 166 à celui en position 191 de HCV.

L'insertion d'un peptide d'initiation de transfert en N-terminal de la protéine de fusion E1-Sd susmentionnée a pour avantage particulier d'adresser cette dernière une fois traduite au réticulum endoplasmique, de sorte qu'elle soit correctement glycosylée et que sa

conformation tridimensionnelle et/ou que ses qualités antigéniques ne présentent pas d'altération substantielle au regard des protéines sauvages.

[8]. L'invention a également pour objet une protéine de fusion immunogène susmentionnée, dans laquelle le second peptide en position N-terminale est constitué :

- d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés de l'acide aminé en position 384 à celui en position 743 de la protéine E2 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a,

et notamment de la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°6, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite la séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite la séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite la séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

L'invention a également pour objet, la protéine de fusion E2-Sd ou E1-E2-Sd, pour laquelle la séquence de protéine E2 est issue du HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, et correspond spécifiquement à la région de la séquence susmentionnée de la protéine E2.

[9]. L'invention porte particulièrement sur une protéine de fusion immunogène susmentionnée, dans laquelle le premier et le second peptide sont contigus, ladite protéine de fusion étant constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique dérivée de ladite SEQ ID N°10,

sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet la protéine de fusion E2-Sd pour laquelle la
5 séquence de la protéine E2 est issue de l'isolat HCV-1a, et est dotée de la séquence SEQ ID N°10 susmentionnée, ladite séquence correspondant à la SEQ ID N°2 de Sd, greffée en amont de la SEQ ID N°6 de E2.

[9b]. A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet une protéine de fusion
10 immunogène susmentionnée (PIT2-E2-Sd), comprenant un troisième peptide d'initiation de transfert situé du côté N-terminal du second peptide, ladite protéine de fusion étant représentée par :

- la SEQ ID N°14, ou
- une séquence d'acides aminés présentant une homologie d'identité d'au moins 82%,
15 notamment d'au moins 85%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec ladite SEQ ID N°14, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique dérivée de ladite SEQ ID N°14, sous réserve que ladite SEQ ID N°14 conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du
20 virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, la protéine de fusion PIT2-E2-Sd pour laquelle la séquence de protéine E2 est issue de l'isolat HCV-1a, et est dotée de la séquence susmentionnée SEQ ID N°14, ladite séquence correspondant à la SEQ ID N°2 de Sd, greffée en N-terminal de la SEQ ID N°6 de E2, elle même greffée en N-terminal de la séquence
25 d'acides aminés du peptide d'initiation de transfert de la protéine E2 (PIT2) compris dans la région constituée de l'acide aminé en position 366 à celui en position 383 de HCV.

L'invention a également pour objet, la protéine de fusion E1-E2-Sd ou PIT1-E1-E2-Sd. L'invention a également pour objet, les protéines de fusion susmentionnées sous forme purifiée.

30

L'invention concerne également une molécule d'acides nucléiques hybride codant pour l'une quelconque des protéines de fusion susmentionnées.

On entend par le terme « **molécule d'acide nucléiques hybride** », toutes molécules d'acide nucléiques comprenant au moins une séquence codant pour la protéine S délétée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale d'un isolat du virus de l'hépatite B, et au moins une séquence codant pour la quasi-intégralité d'une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C, ou toute molécule issue d'une molécule définie ci-dessus, et modifiée suite à la dégénérescence naturelle de son code génétique.

Avantageusement, l'invention porte sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, codant pour une protéine de fusion définie ci-dessus, comprenant les trois séquences d'acides nucléiques suivantes :

a)- du côté 3', une première séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S délétée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale, d'un isolat du virus de l'hépatite B, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 91%, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides nucléiques de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un autre isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique, dérivée d'une séquence d'acides nucléiques de ladite protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, et,

b)- du côté 5' de la première séquence, une seconde séquence d'acides nucléiques codant pour le domaine transmembranaire et l'ectodomaine d'au moins une protéine d'enveloppe E1 ou E2 d'un isolat du virus de l'hépatite C, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides nucléiques codant pour l'une desdites protéines E1 ou E2 d'un isolat du virus de l'hépatite C, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides nucléiques d'une des dites protéines E1 ou E2, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

5 ladite seconde séquence étant choisie parmi les séquences codant pour la protéine E1, pour la protéine E2 ou pour un peptide de fusion comprenant la protéine E1 et la protéine E2, et,

c)- du côté 5' de la seconde séquence, une troisième séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide d'initiation de transfert d'une protéine d'enveloppe E1 ou E2 d'un isolat du virus de l'hépatite C (PIT), ou

10 - une séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite la séquence d'acides nucléiques de la protéine codant pour un peptide d'initiation de transfert (PIT), sous réserve que le peptide d'initiation de transfert codé par ladite la séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à adresser, après traduction, ladite protéine de fusion au réticulum endoplasmique de sorte qu'elle soit
15 correctement glycosylée et que sa conformation tridimensionnelle présente le moins d'altération possible, et/ou que ses qualité antigéniques soient au mieux préservées au regard des protéines sauvages, ou,

- toute séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide capable d'adresser, après traduction, ladite protéine de fusion au réticulum endoplasmique de sorte qu'elle soit
20 correctement glycosylée et que sa conformation tridimensionnelle présente le moins d'altérations possibles, et/ou que ses qualités antigéniques soient au mieux préservées au regard des protéines sauvages.

Avantageusement, la présente invention a pour objet une molécule d'acides nucléiques
25 hybride susmentionnée (notamment les molécules e1-sd ou e2-sd, ou e1-e2-sd, pit1-e1-sd ou pit2-e2-sd, telles que définies dans le tableau 1 ci-dessous), codant pour une protéine de fusion susmentionnée (notamment E1-Sd ou E2-Sd, ou E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd ou PIT2-E2-Sd), comprenant respectivement de son extrémité 5' à son extrémité 3', une séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide d'initiation de transfert (PIT) d'un isolat du virus
30 de l'hépatite C, une séquence d'acides nucléiques codant pour une protéine E1 ou E2 d'un isolat du virus HCV, une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S délétée d'un isolat du virus HBV.

L'insertion d'une séquence d'acide nucléiques codant pour ledit peptide d'initiation de transfert greffé en N-terminal de la protéine de fusion susmentionnée (notamment E1-Sd ou

E2-Sd, ou E1-E2-Sd) a pour avantage particulier que cette dernière une fois traduite est adressée au réticulum endoplasmique, de sorte qu'elle soit correctement glycosylée et que sa conformation tridimensionnelle et/ou que ses qualités antigéniques ne présentent pas d'altération substantielle au regard des protéines sauvages.

5

La présente invention a également pour objet une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée ne comprenant que les deux premières séquences d'acides nucléiques susmentionnées et dépourvue de séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide d'initiation de transfert.

10

L'objet de la présente invention porte notamment sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée codant pour une protéine de fusion de l'invention, comprenant au moins :

- la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S de HBV délétée (Sd),
essentiellement constitué de ses trois domaines transmembranaires situés à l'extrémité C-terminale (figures 2A et 3A), ladite protéine S délétée conservant la capacité d'assemblage en particules sous-virales, et conservant les propriétés immunogènes contre le virus HBV, et

- la séquence d'acides nucléiques codant pour la quasi-intégralité de la séquence d'une des protéines E1 et E2 (figures 3B et 3C), conservant également les propriétés immunogènes contre le virus HCV,

- la séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide d'initiation de transfert de l'invention, conservant la capacité à adresser après traduction ladite protéine de fusion au réticulum endoplasmique de sorte qu'elle soit correctement glycosylée et que sa conformation tridimensionnelle présente le moins d'altérations possibles, et/ou que les qualités antigéniques soient au mieux préservées au regard des protéines sauvages,

de sorte que la protéine de fusion codée par ladite molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, conserve la capacité à former des particules sous-virales, et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HBV et/ou HCV, et notamment la propriété d'induire une double immunisation contre les virus HBV et HCV.

30

On entend par « **pourcentage d'homologie** », le pourcentage déterminé par comparaison directe de deux séquences de molécules polynucléotidiques, en déterminant le nombre de résidus d'acides nucléiques des deux séquences, puis en le divisant par le nombre

de résidus d'acides nucléiques de la séquence la plus longue des deux, et en multipliant le résultat par 100.

Selon un aspect particulièrement avantageux de l'invention, les séquences d'acides nucléiques codant pour les domaines transmembranaires de E1 et/ou de E2, sont délétés d'au moins l'un des neuf derniers acides nucléiques, et préférentiellement des neuf derniers acides nucléiques, situés en position 3', de sorte que les séquences d'acides nucléiques codant pour les domaines transmembranaires de E1 et/ou de E2 correspondent :

- aux fragments nucléotidiques du génome d'un isolat de HCV, localisés dans les régions comprises :

* de l'acide nucléique en position 1398 à celui en position 1490 et, avantageusement, de l'acide nucléique en position 1398 à celui en position 1481 en ce qui concerne la séquence d'acides nucléiques codant pour les domaines transmembranaires de E1, ou

* de l'acide nucléique en position 2493 à celui en position 2579 et, avantageusement, de l'acide nucléique en position 2493 à celui en position 2570 en ce qui concerne la séquence d'acides nucléiques codant pour les domaines transmembranaires de E2, ou

- aux fragments nucléotidiques du génome d'un isolat de HCV présentant un pourcentage d'homologie avec lesdits fragments nucléotidiques sauvages du génome du HCV susmentionnés, d'au moins 91%, en ce qui concerne E1 et d'au moins 90%, en ce qui concerne E2, ou

- aux fragments nucléotidiques issus de variant naturels du virus HCV, et/ou issus de variants synthétiques desdits fragments nucléotidiques sauvages du génome d'un isolat de HCV.

L'expression « domaines transmembranaires de E1 et/ou de E2 délétés d'au moins l'un des neuf derniers acides nucléiques situés en position 3' » concerne des délétions, de 3 acides nucléiques, ou de 6 acides nucléiques, ou de 9 acides nucléiques situés en position 3' d'un desdits domaines transmembranaires.

Avantageusement, la première et la seconde séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, et codant pour la protéine de fusion immunogène susmentionnée sont contigües, et l'extrémité 5' de la première séquence d'acides nucléiques est liée de façon covalente à l'extrémité 3' de la seconde séquence d'acides nucléiques.

Selon un aspect particulièrement avantageux, la molécule d'acides nucléiques hybride définie ci-dessus correspond par exemple aux molécules suivantes : e1-sd, e2-sd, ou pit1-e1-

sd ou pit 2-e2-sd, codant respectivement pour les protéines de fusion suivantes : E1-Sd, E2-Sd, PIT1-E1-Sd ou PIT2-E2-Sd).

Selon un autre aspect avantageux de l'invention, une séquence nucléotidique codant pour un peptide de liaison, relie lesdites première et seconde séquences nucléotidiques susmentionnées, ladite séquence nucléotidique étant constituée

- de 3 acides nucléiques, ou de 6 acides nucléiques, ou de 9 acides nucléiques, ou de 12 acides nucléiques, ou de 15 acides nucléiques, ou

- de toute séquence nucléotidique codant pour tout peptide de liaison ;

sous réserve que la protéine de fusion immunogène codée par la molécule d'acides nucléiques hybride et qui comprend ledit peptide de liaison, lui-même codé par ladite séquence nucléotidique, conserve la capacité à s'assembler en particules sous-virales non infectieuses, en présence de la protéine S sauvage, et conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV, et/ou, du virus HBV.

A ce titre, l'invention a particulièrement pour objet une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, dans laquelle la première séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S délétée en N-terminal, de HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw, est située du côté 3' de ladite molécule d'acides nucléiques hybride, et est constituée :

- d'une séquence d'acides nucléiques délimitée par les acides nucléiques contigus situés de la position 1630 à la position 2241 du génome de HBV, et notamment,

- de la séquence d'acides nucléiques représentée par la SEQ ID N°1, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 91 %, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, ou,

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HBV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides nucléiques codant pour ladite protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B.

Un objet plus particulier de l'invention porte sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e1-sd ou e2-sd, ou e1-e2-sd, pit1-e1-sd ou pit2-e2-sd, ou pit1-e1-e2-sd) codant pour une protéine de fusion susmentionnée (notamment E1-Sd ou E2-Sd, ou E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd ou PIT2-E2-Sd, ou PIT1-E1-E2-Sd) pour laquelle ladite
5 séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S déletée du HCV est celle de l'isolat HBV_{adw}, et a pour séquence SEQ ID N°1.

A ce titre encore, l'invention concerne plus particulièrement une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, dans laquelle la seconde séquence d'acides nucléiques
10 codant pour le domaine transmembranaire et l'ectodomaine de la protéine E1 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, est située du côté 5' de ladite molécule d'acides nucléiques hybride, et est constituée :

- d'une séquence d'acides nucléiques délimitée par les acides nucléiques contigus situés de la position 915 à la position 1490, et particulièrement de la position 915 à la position 1481,
15 du génome de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a,

et notamment de la séquence d'acides nucléiques représentée par la SEQ ID N°3, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides nucléiques de la protéine E1, sous réserve que la
20 protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique dérivée de ladite séquence d'acides nucléiques de la protéine E1, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les
25 propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

Un objet plus particulier de l'invention porte sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e1-sd ou pit1-e1-sd, ou e1-e2-sd, ou pit1-e1-e2-sd) codant pour une protéine de fusion (notamment E1-Sd ou PIT1-E1-Sd, ou E1-E2-Sd, ou PIT1-E1-E2-Sd), pour laquelle ladite séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine E1 est celle de
30 l'isolat HCV-1a, est la séquence SEQ ID N°3.

L'invention concerne particulièrement une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, codant pour une protéine de fusion susmentionnée, comprenant un peptide

d'initiation de transfert situé du côté N-terminal, ladite molécule d'acides nucléiques hybride étant représentée par :

- la SEQ ID N°11, ou

- une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou de HBV, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou de HBV.

La séquence d'acides nucléiques SEQ ID N°11, également nommée pit1-e1-sd, code pour la protéine de fusion PIT1-E1-Sd de SEQ ID N°12 (cf tableau 1).

L'invention a également pour objet, une molécule d'acide nucléiques hybride (notamment pit1-e1-sd de SEQ ID N°11) pour laquelle :

- la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine E1 est issue de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, et est la séquence SEQ ID N°3 susmentionnée et,
- la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine S est issue de HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw, et est la séquence SEQ ID N°1 susmentionnée, ladite SEQ ID N°1 étant greffée en 5' de la SEQ ID N°3 de E1, elle même greffée en 5' de la séquence d'acide nucléiques codant pour le peptide d'initiation de transfert de la protéine E1 (PIT1) compris dans la région constituée de l'acide nucléique en position 837 à celui en position 914 de HCV.

25

A ce titre, l'objet de l'invention porte plus particulièrement sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, dans laquelle la seconde séquence d'acides nucléiques codant pour le domaine transmembranaire et l'ectodomaine de la protéine E2 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, est située du côté 5' de ladite molécule, et est constituée :

30

- d'une séquence d'acides nucléiques délimitée par les acides nucléiques contigus situés de la position 1491 à la position 2579, et particulièrement de la position 1491 à la position 2570, du génome de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a,

et notamment de la séquence d'acides nucléiques représentée par la SEQ ID N°5, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides nucléiques de la protéine E2, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID N°5, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

10 Un objet plus particulier de l'invention porte sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e2-sd ou pit2-e2-sd) codant pour une protéine de fusion (notamment E2-Sd ou PIT2-E2-Sd).

L'invention porte particulièrement sur une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée, codant pour une protéine de fusion de l'invention, comprenant un peptide d'initiation de transfert situé du côté N-terminal, ladite molécule d'acides nucléiques hybride étant représentée par :

- la SEQ ID N°13, ou

20 - une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'identité d'au moins 80%, notamment d'au moins 85%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec ladite SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et/ou de HBV, ou

25 - de la séquence d'acides nucléiques dérivée d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et/ou de HBV.

La séquence d'acides nucléiques SEQ ID N°13, également nommée pit2-e2-sd, code pour la protéine de fusion PIT2-E2-Sd de SEQ ID N°14 (cf tableau 1).

L'invention a également pour objet, une molécule d'acide nucléiques hybride (notamment pit2-e2-sd de SEQ ID N°13) pour laquelle :

30 - la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine E2 est issue de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, et est la séquence SEQ ID N°5 susmentionnée et, pour laquelle

- 5 - la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine S est issue de HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw, et est la séquence SEQ ID N °1 susmentionnée, ladite SEQ ID N°1 étant greffée en 5' de la SEQ ID N°5 de E2, elle même greffée en 5' de la séquence d'acide nucléiques codant pour le peptide d'initiation de transfert de la protéine E2 (PIT2) compris dans la région constituée de l'acide nucléique en position 1437 à celui en position 1490 de HCV.

10 L'invention a également pour objet un vecteur comprenant une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée codant pour une protéine de fusion susmentionnée, ainsi que les moyens nécessaires pour leur expression liés de façon opérationnelle à ladite molécule d'acides nucléiques hybride.

15 A titre de vecteurs d'expression qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer par exemple les plasmides, les vecteurs viraux type lentiviraux, Semliki, adenovirus, poxvirus, virus de la vaccine, baculovirus, les vecteurs bactériens du type salmonelle, BCG.

20 On entend par « **moyen nécessaire à l'expression** » d'une protéine, le terme protéine étant utilisé pour toute molécule d'acides aminés, telle que protéine, protéine de fusion, fragment de protéine, peptide, polyprotéine, polypeptide, etc., tout moyen qui permet d'obtenir la protéine, tel que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de répllication et de préférence un marqueur de sélection. Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide sont liés de façon opérationnelle à la séquence d'acide nucléique codant pour le peptide d'intérêt.

25

Par « **liés de façon opérationnelle** », on entend une juxtaposition desdits éléments nécessaires à l'expression et du gène codant pour le peptide d'intérêt, lesquels sont en une relation telle que cela leur permet de fonctionner de façon attendue. Par exemple, il peut exister des bases supplémentaires entre le promoteur et le gène d'intérêt tant que leur relation fonctionnelle est préservée.

30

Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide peuvent être des moyens homologues, c'est-à-dire inclus dans le génome du vecteur utilisé, ou bien être hétérologues. Dans ce dernier cas, lesdits moyens sont clonés avec le peptide d'intérêt à exprimer.

De préférence, le promoteur utilisé dans le vecteur Semliki et le vecteur lentiviral utilisés comme vecteur d'expression, est un promoteur homologue et est un promoteur du cytomégolovirus (CMV).

Des exemples non limitatifs de promoteurs hétérologues comprennent notamment (i) les promoteurs viraux tels que le promoteur SV40 (Virus simien 40), le promoteur du gène de la thymidine-kinase du virus simplex de l'Herpès (TK-HSV-1), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), le promoteur du cytomégolovirus (CMV) et le promoteur dernier majeur adénoviral (MLP), ainsi que (ii) tout promoteur cellulaire qui contrôle la transcription des gènes codant pour des peptides chez des eucaryotes supérieurs, tel que le promoteur du gène de phosphoglycérate-kinase (PGK) constitutif (Adra et al., 1987, Gene, 60 : 65-74), le promoteur des gènes spécifiques du foie alfa1-antitrypsine et FIX et le promoteur SM22 spécifique des cellules du muscle lisse (Moessler et al., 1996, Development, 122 : 2415-2425).

L'invention porte particulièrement sur un vecteur susmentionné, comprenant en outre, un vecteur lentiviral

L'invention a plus particulièrement pour objet un vecteur susmentionné, dans lequel le vecteur lentiviral est le vecteur pLenti.

Ce dernier a été antérieurement décrit notamment par Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272(5259), 263-7.

L'invention a également pour objet un vecteur susmentionné, comprenant en outre, un vecteur viral défectif dérivé du génome du virus de la forêt Semliki.

Ces derniers ont été antérieurement décrits notamment par Schlesinger, S., and T. M. Dubensky, Jr. 1999. Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. Curr. Opin. Biotechnol. 10:434-439.

30

L'invention a notamment pour objet un vecteur susmentionné, dans lequel le vecteur viral défectif dérivé du génome du virus de la forêt Semliki est le vecteur pSFV1, ce dernier étant notamment commercialisé par Invitrogen.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un vecteur susmentionné, dans lequel la molécule d'acides nucléiques hybride est constituée:

- de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°11, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 78%,
5 notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques code pour une protéine de fusion capable de former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis HCV et/ou HBV, lequel vecteur est notamment représenté par la SEQ ID N° 15, ou

10 - de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique dérivé de séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques code pour une protéine de fusion capable de former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis HCV et/ou HBV.

15 L'invention a également pour objet, un vecteur dérivé de pSFV1 de séquence SEQ ID N° 15, comprenant une molécule d'acide nucléiques hybride (notamment pit1-e1-sd de SEQ ID N°11) codant pour la protéine de fusion susmentionnée (notamment PIT1-E1-Sd de SEQ ID N°12), et pour laquelle :

- la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine E1 est issue de HCV, et
20 particulièrement de l'isolat HCV-1a, et est la séquence SEQ ID N °3 susmentionnée et, pour laquelle

- la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine S est issue de HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw, et est la séquence SEQ ID N °1 susmentionnée, ladite SEQ ID N°1 étant greffée en 5' de la SEQ ID N°3 de E1, elle même greffée en 5'

25 de la séquence d'acide nucléiques codant pour le peptide d'initiation de transfert de la protéine E1 (PIT1) compris dans la région constituée de l'acide nucléique en position 837 à celui en position 914 de HCV.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet l'un des vecteurs susmentionné,
30 dans lequel la molécule d'acides nucléiques hybride est constituée :

- de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°13, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, plus particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec ladite séquence SEQ ID N°13, sous réserve que

ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide capable de former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et/ou HCV, lequel vecteur est notamment représenté par la SEQ ID N° 16,

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide capable de former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et/ou HCV.

L'invention a également pour objet, un vecteur de SEQ ID N° 16, comprenant une molécule d'acide nucléiques hybride (notamment pit1-e1-sd de SEQ ID N°13) codant pour la protéine de fusion susmentionnée (notamment PIT1-E1-Sd de SEQ ID N°14), et pour laquelle :

- la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine E2 est issue de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, et est la séquence SEQ ID N°5 susmentionnée et, pour laquelle
- la séquence d'acide nucléiques codant pour la protéine S est issue de HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw, et est la séquence SEQ ID N°1 susmentionnée,
- ladite SEQ ID N°1 étant greffée en 5' de la SEQ ID N°5 de E2, elle même greffée en 5' de la séquence d'acide nucléiques codant pour le peptide d'initiation de transfert de la protéine E2 (PIT2) compris dans la région constituée de l'acide nucléique en position 1437 à celui en position 1490 de HCV.

L'invention concerne également un vecteur susmentionné, comprenant une molécule d'acides nucléiques hybride constituée des trois séquences d'acides nucléiques suivantes :

- a)- du côté 3', une première séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S déléetée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale (Sd), d'un isolat du virus de l'hépatite B, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 91 %, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite séquence d'acides nucléiques de la protéine S déléetée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide capable de former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de HBV, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique dérivé de ladite séquence d'acides nucléiques codant pour la

protéine S délétée (Sd), sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide capable de former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de HBV, et,

b)- à l'extrémité 5' de ladite première séquence d'acides nucléiques, une seconde
5 séquence d'acides nucléiques codant pour le domaine transmembranaire et l'ectodomaine d'au moins une protéine d'enveloppe E1 ou E2, d'un isolat du virus de l'hépatite C, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 78%,
notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au
moins 90%, avec ladite séquence d'acides nucléiques codant pour l'une desdites protéines E1
10 ou E2, d'un isolat du virus de l'hépatite C, sous réserve que la protéine codée par ladite
séquence d'acides nucléiques code pour un peptide immunogènes vis-à-vis du virus de
l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV
ou d'un variant synthétique dérivé de ladite seconde séquence d'acides nucléiques codant
15 pour une protéine d'enveloppe E1 ou E2, sous réserve que la protéine codée par ladite
séquence d'acides nucléiques code pour un peptide immunogènes vis-à-vis du virus de
l'hépatite C,

ladite seconde séquence étant choisie parmi les séquences codant pour la protéine E1,
pour la protéine E2 ou pour un peptide de fusion comprenant la protéine E1 et la protéine
20 E2, et,

c)- à l'extrémité 5' de ladite seconde séquence d'acides nucléiques, une troisième
séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide d'initiation de transfert (PIT) d'un isolat
du virus de l'hépatite C, ou

- une séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV,
25 ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite la séquence d'acides nucléiques de la protéine
codant pour un peptide d'initiation de transfert (PIT), sous réserve que le peptide d'initiation
de transfert codé par ladite la séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à adresser,
après traduction, ladite protéine de fusion au réticulum endoplasmique de sorte qu'elle soit
correctement glycosylée et que sa conformation tridimensionnelle présente le moins
30 d'altération possible, et/ou que ses qualité antigéniques soient au mieux préservées au regard
des protéines sauvages, ou,

- toute séquence d'acides nucléiques codant pour un peptide capable d'adresser, après
traduction, ladite protéine de fusion au réticulum endoplasmique de sorte qu'elle soit
correctement glycosylée et que sa conformation tridimensionnelle présente le moins

d'altérations possibles, et/ou que ses qualités antigéniques soient au mieux préservées au regard des protéines sauvages.

Avantageusement, l'invention a également pour objet un vecteur susmentionné, dans lequel la première et la seconde séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e1-sd ou e1-e2-sd) et codant pour la protéine de fusion immunogène susmentionnée (notamment E1-Sd ou E2-Sd) sont contigües, et l'extrémité 5' de la première séquence d'acides nucléiques est liée de façon covalente à l'extrémité 3' de la seconde séquence d'acides nucléiques.

Selon un autre aspect avantageux, l'invention concerne le vecteur susmentionné (notamment un vecteur lentiviral, tel que le vecteur pLenti, ou un vecteur viral déficient dérivé du génome du virus de la forêt Semliki, tel que le vecteur pSFV1) pour lequel une séquence nucléotidique, codant pour un peptide de liaison, relie lesdites première et seconde séquences nucléotidiques codant pour la protéine de fusion immunogène susmentionnée (notamment E1-Sd ou E2-Sd), ladite séquence nucléotidique étant constituée

de 3 acides nucléiques, ou de 6 acides nucléiques, ou de 9 acides nucléiques, ou de 12 acides nucléiques, ou de 15 acides nucléiques, sous réserve que ladite séquence nucléotidique, codant pour un peptide de liaison, n'altère pas la capacité de la protéine de fusion immunogène susmentionnée (notamment E1-Sd ou E2-Sd), à s'assembler en particules sous-virales, en présence de la protéine S sauvage, et que cette dernière conserve également les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV, et/ou, du virus HBV.

Avantageusement, le vecteur susmentionné comprend la première séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S déletée en N-terminal, de HBV, et notamment de l'isolat HBVadw du virus de l'hépatite B, ladite séquence étant :

- une séquence d'acides nucléiques délimitée par les acides nucléiques contigus situés en positions 1630 à 2241 de HBV, et particulièrement de l'isolat HBVadw,

- et notamment de la séquence d'acides nucléiques représentée par la SEQ ID N°1, ou

- une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 91 %, notamment d'au moins 93%, particulièrement d'au moins 95%, et plus particulièrement d'au moins 97%, avec ladite SEQ ID N°1, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HBV ou d'un variant synthétique dérivé de la SEQ ID N°1, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses, immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B.

5 Un objet plus particulier de l'invention réside dans le vecteur susmentionné (notamment un vecteur lentiviral, tel que le vecteur pLenti, ou un vecteur viral déficient dérivé du génome du virus de la forêt Semliki, tel que le vecteur pSFV1) comprenant d'une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e1-sd ou e2-sd, ou e1-e2-sd, pit1-e1-sd ou pit2-e2-sd) codant pour une protéine de fusion (notamment E1-Sd ou E2-Sd, ou E1-E2-Sd, 10 PIT1-E1-Sd ou PIT2-E2-Sd) pour laquelle ladite séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S déletée du HBV est celle de l'isolat HBV*adw*, et a pour séquence SEQ ID N°1.

Selon un aspect particulier de l'invention, le vecteur susmentionné comprend la seconde séquence d'acides nucléiques codant pour le domaine transmembranaire et l'ectodomaine de 15 la protéine E1 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, qui est située du côté 5' de ladite molécule, et qui est constituée :

- d'une séquence d'acides nucléiques délimitée par les acides nucléiques contigus situés de la position 915 à la position 1490, et particulièrement de la position 915 à la position 1481, du génome de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a,

20 et notamment de la séquence d'acides nucléiques représentée par la SEQ ID N°3, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine E1, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés 25 immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivé de ladite d'acides nucléiques codant pour ladite protéine E1, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

30 Un objet plus particulier de l'invention réside dans le vecteur susmentionné (notamment un vecteur lentiviral, tel que le vecteur pLenti, ou un vecteur viral déficient dérivé du génome du virus de la forêt Semliki, tel que le vecteur pSFV1) comprenant une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e1-sd, ou e1-e2-sd, pit1-e1-sd) codant pour une protéine de fusion (notamment E1-Sd, ou E1-E2-Sd, PIT1-E1-Sd) pour laquelle ladite

séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine E1 du HCV est celle de l'isolat HCV-1a, et a pour séquence SEQ ID N°3.

Conformément à un aspect avantageux de l'invention, le vecteur susmentionné
5 comprend la seconde séquence d'acides nucléiques codant pour le domaine transmembranaire et l'ectodomaine de la protéine E2 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, qui est située du côté 5' de ladite molécule, et qui est constituée :

- d'une séquence d'acides nucléiques délimitée par les acides nucléiques contigus situés de la position 1491 à la position 2579, et particulièrement de la position 1491 à la position
10 2570, du génome de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a,

et notamment de la séquence d'acides nucléiques représentée par la SEQ ID N°5, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine E2, sous réserve
15 que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant naturel, issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivé de ladite d'acides nucléiques codant pour ladite protéine E2, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques
20 conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

Un objet plus particulier de l'invention réside dans le vecteur susmentionné (notamment un vecteur lentiviral, tel que le vecteur pLenti, ou un vecteur viral déficient dérivé du génome du virus de la forêt Semliki, tel que le vecteur pSFV1) comprenant d'une molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée (notamment e2-sd, ou e1-e2-sd, pit2-e2-sd) codant pour
25 une protéine de fusion (notamment E2-Sd, ou E1-E2-Sd, PIT2-E2-Sd) pour laquelle ladite séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine E2 du HCV est celle de l'isolat HCV-1a, et a pour séquence SEQ ID N°5.

30

L'invention a également pour objet une particule d'enveloppe sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, comprenant les protéines suivantes :

- la protéine constituée de la protéine S sauvage de l'antigène de surface d'un isolat du virus de l'hépatite B, et,

35 - au moins une protéine de fusion immunogène susmentionnée.

On entend par le terme « **particule sous-virale chimère** », toute particule sous virale comprenant au moins la protéine S sauvage de HBV et une protéine de fusion immunogène susmentionnée résultant de l'auto-assemblage de la protéine S sauvage, ou de l'assemblage de
5 d'une protéine de fusion susmentionnée, en présence de la protéine S sauvage.

Avantageusement, la protéine de fusion immunogène de la particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée, est:

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou
- 10 - une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec la dite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV, ou
- 15 - de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV et/ou du virus HBV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène
20 susmentionnée comprenant une protéine de fusion susmentionnée, et notamment la protéine de fusion E1-Sd de SEQ ID N°8, ou E1-E2-Sd, et pour laquelle la séquence de la protéine E1 est notamment la SEQ ID N°4 susmentionnée, et est notamment greffée en C-terminal de la séquence d'acides aminés de la protéine S délétée (Sd) de séquence SEQ ID N°2.

25 Selon un aspect particulier de l'invention, la protéine de fusion immunogène de la particule sous-virale chimère immunogène sus-mentionnée, est constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au
30 moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules

sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée comprenant une protéine de fusion susmentionnée, et notamment la protéine de fusion E1-Sd de SEQ ID N°10, ou E1-E2-Sd, et pour laquelle la séquence de la protéine E1 est notamment la SEQ ID N°6 susmentionnée, et est notamment greffée en C-terminal de la séquence d'acides aminés de la protéine S délétée (Sd) de séquence SEQ ID N°2.

Conformément à un aspect avantageux de l'invention, la particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée, comprenant les deux protéines de fusion suivantes :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec la dite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite SEQ ID N°8 code pour une protéine qui conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°8, sous réserve que ladite SEQ ID N°8 code pour une protéine qui conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, et
- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée comprenant deux protéines de fusion susmentionnée (notamment E1-Sd de SEQ ID N°8, ou E1-E2-Sd ; et E2-Sd de SEQ ID N°10).

L'invention concerne également une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée, dans laquelle la protéine de fusion immunogène comprend au moins une des protéines d'enveloppe (E1) d'un isolat du virus de l'hépatite C, ladite protéine étant
5 constituée :

- d'une séquence d'acides aminés correspondant aux résidus d'acides aminés situés dans la région comprenant l'acide aminé en position 192 à celui en position 380 de la protéine sauvage de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%,
10 notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence de la protéines E1 sauvage d'un isolat de HCV, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou
15 d'un variant synthétique, dérivée de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée comprenant une protéine de fusion susmentionnée (notamment E1-Sd, ou E1-E2-Sd ou PIT1-E1-E2-Sd, ou PIT2-E2-E1-Sd), pour laquelle la séquence de la protéine E1 est
20 issue de l'isolat HCV-1a.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée, dans laquelle la protéine de fusion immunogène comprend au moins une des protéines d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C, ladite protéine étant constituée de
25 séquences d'acides aminés choisies parmi les suivantes :

- une séquence d'acides aminés correspondant aux résidus d'acides aminés situés dans la région comprenant l'acide aminé en position 384 à celui en position 743 de la protéine sauvage E2 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%,
30 notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquences de la protéines E2 sauvage dudit isolat HCV, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée comprenant une protéine de fusion susmentionnée (notamment E2-Sd, ou E1-E2-Sd ou PIT1-E1-E2-Sd), pour laquelle la séquence de la protéine E2 est issue de l'isolat HCV-1a.

Selon un aspect particulier, l'invention concerne également une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée, comprenant les deux protéines de fusion suivantes :

- la protéine de fusion comprenant la séquence d'acides aminés constituée de l'acide aminé en position 192 à celui en position 383, et particulièrement en position 192 à celui en position 380 de la protéine sauvage E1 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a ; ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence de la protéines E1 sauvage d'un isolat de HCV, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, et

- la protéine de fusion comprenant la séquence d'acides aminés constituée de l'acide aminé en position 384 à celui en position 746, et particulièrement en position 384 à celui en position 743 de la protéine sauvage E2 de HCV, et particulièrement de l'isolat HCV-1a, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquences de la protéines E2 sauvage dudit isolat HCV, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

L'invention a également pour objet, une particule sous-virale chimère immunogène susmentionnée comprenant deux protéines de fusion susmentionnée (notamment E1-Sd, ou PIT1-E1-Sd ou E2-Sd ou PIT1-E1-Sd ou E1-E2-Sd ou PIT1- E1-E2-Sd).

5

L'invention a également pour objet une composition immunogène comprenant comme substance active au moins un composé choisi parmi :

- une protéine de fusion susmentionnée,
 - 10 - une molécule d'acides nucléiques hybride précédemment décrite,
 - un vecteur susmentionné comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride,
 - une particule sous-virale chimères décrite ci-dessus,
- et, un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition pharmaceutique contient également un véhicule pharmaceutiquement approprié dont l'homme du métier déterminera facilement la nature et la quantité à utiliser en fonction de paramètres usuels et des constituants de la composition pharmaceutique, la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités.

20 Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont appropriées pour l'administration orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, topique, locale, intra-trachéale, intra-nasale, transdermique, rectale, intraoculaire, intra-auliculaire, ledit principe actif pouvant être administré sous forme unitaire d'administration.

Les formes unitaires d'administration peuvent être par exemple des comprimés, des
25 gélules, des granules, des poudres, des solutions injectables ou suspensions orales, des timbres transdermiques (patch), des formes d'administration sublinguale, buccale, intra-trachéale, intraoculaire, intra-nasale, intra-auriculaire, par inhalation, des formes d'administration topique, transdermique, sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse, des formes d'administration rectale ou des implants. Pour l'administration topique, on peut
30 envisager des crèmes, gels, pommades, lotions ou collyres.

Avantageusement, la composition immunogène susmentionnée, comprend une substance active choisie parmi au moins l'un des trois composés suivants :

a)- une protéine de fusion susmentionnée constituée par :

* la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou

* une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

* de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

b)- une molécule d'acides nucléiques hybride constituée par :

* la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°11, ou

* d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 78%, notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

* de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou un vecteur susmentionné comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride,

c)- une particule sous-virale chimères, comprenant la protéine de fusion immunogène constituée par :

* la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou

* une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HBV et de HCV, ou

* de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HBV et de HCV.

Un objet particulier de l'invention porte sur l'une des trois composés suivants :

5 a)- la protéine de fusion susmentionnée comprenant la protéine E1 (notamment E1-Sd, PIT1-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd), dont on trouve une représentation schématique dans la figure 3B, et qui comprend la quasi-intégralité de la protéine E1 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV, ou

10 b)- la molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée comprenant séquence d'acides nucléique codant pour la protéine E1 (notamment e1-sd, pit1-e1-sd, e1-e2-sd, pit1-e1-e2-sd), et qui comprend la quasi-intégralité de la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine E1 du HCV, greffée en 5' de la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine S délétée de HBV, ou

15 c)- la particule sous-virale susmentionnée comprenant la protéine E1 (notamment E1-Sd, PIT1-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd), dont on trouve une représentation schématique dans la figure 3B, et qui comprend la quasi-intégralité de la protéine E1 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

20 Selon un aspect particulier de l'invention, la composition immunogène susmentionnée, comprend une substance active choisie parmi au moins l'un des composés suivants:

a)- une protéine de fusion constituée par :

* la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou

25 * une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

30 de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C,

b)- une molécule d'acides nucléiques hybride constituée par :

* de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°13, ou

* d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 80%, notamment d'au moins 85%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec la dite SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

* de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C; ou un vecteur susmentionné comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride,

c)- une particule sous-virales chimères, comprenant la protéine de fusion immunogène constituée par :

* la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou

* une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

* de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

Un objet particulier de l'invention porte sur l'une des trois composés suivants :

a)- la protéine de fusion susmentionnée comprenant la protéine E2 (notamment E2-Sd, PIT2-E2-Sd, E1-E2-Sd, PIT1-E1-E2-Sd), dont on trouve une représentation schématique dans la figure 3C, et qui comprend la quasi-intégralité de la protéine E2 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S déletée de HBV, ou

b)- la molécule d'acides nucléiques hybride susmentionnée comprenant séquence d'acides nucléique codant pour la protéine E2 (notamment e2-sd, pit2-e2-sd, e1-e2-sd, pit1-e1-e2-sd), et qui comprend la quasi-intégralité de la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine E1 du HCV, greffée en 5' de la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine S déletée de HBV, ou

c)- la particule sous-virale susmentionnée comprenant la protéine E1 (notamment E1-Sd, PIT-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT-E1-E2-Sd), et qui comprend la quasi-intégralité de la protéine E2 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

5 Conformément à un aspect avantageux de l'invention, la composition immunogène susmentionnée comprend pour substance active, une particule sous-virale chimère, comprenant au moins les deux protéines de fusion immunogènes constituées par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou

10 - une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec la dite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

15 - de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, et,

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou

20 - une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10 de E2-Sd, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou

25 - de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

Un objet particulier de l'invention porte sur la particule sous-virale susmentionnée comprenant deux protéines de fusion susmentionnées, l'une comprenant :

30 - la protéine E1 du HCV (notamment E1-Sd, PIT1-E1-Sd, E1-E2-Sd, PIT-E1-E2-Sd), et la protéine E2 du HCV, greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV, et l'autre

- la protéine E2 du HCV (notamment E2-Sd, PIT2-E2-Sd, E1-E2-Sd, PIT-E1-E2-Sd), greffée en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

[27]. Selon un aspect particulièrement avantageux de l'invention, la substance active de la composition immunogène susmentionnée, est constituée du mélange comprenant :

- au moins deux protéines de fusion suivante :

* l'une constituée par :

- 5 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du
- 10 virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C ;

15 * l'autre constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la
- 20 capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis du virus de l'hépatite C, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis du virus de l'hépatite B et/ou vis-à-vis
- 25 vis du virus de l'hépatite C.

- au moins deux molécules d'acides nucléiques hybrides suivantes :

* l'une constituée par :

- de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°11, ou
- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 78%,
- 30 notamment d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, et plus particulièrement d'au moins 90%, avec ladite séquence SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis HCV et/ou HBV, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique dérivé ladite séquence SEQ ID N°11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis HCV et/ou HBV, ou un vecteur susmentionné comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride,

* l'autre constituée par :

- de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID N°13, ou

- d'une séquence d'acides nucléiques présentant une homologie d'au moins 80%, particulièrement d'au moins 85%, plus particulièrement d'au moins 90%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec ladite séquence SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis HCV et/ou HBV, ou

- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivé de ladite séquence SEQ ID N°13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis HCV et/ou HBV ou un vecteur susmentionné comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride;

- au moins deux particules sous-virales chimères suivantes :

* l'une comprenant la protéine de fusion immunogène constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°8, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, notamment d'au moins 90%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec la dite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID N°8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV,

* l'une comprenant la protéine de fusion immunogène constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID N°10, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, notamment d'au moins 88%, particulièrement d'au moins 92%, et plus particulièrement d'au moins 95%, avec SEQ ID N°10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la

capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID N°10,

sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des
5 particules sous-virales, non infectieuses et immunogènes vis-à-vis de HCV et/ou vis-à-vis de HBV.

Un objet particulier de l'invention porte sur le mélange comprenant les composés suivants :

a)- au moins deux protéines de fusion susmentionnées, l'une comprenant la protéine E1
10 (notamment E1-Sd de séquence SEQ ID N°8, ou PIT1-E1-Sd, ou E1-E2-Sd, ou PIT1-E1-E2-Sd) l'autre comprenant la protéine E2 (notamment E2-Sd de séquence SEQ ID N°10, ou PIT2-E2-Sd, ou E1-E2-Sd, ou PIT1-E1-E2-Sd) du HCV, ces dernières étant greffées en N-terminal de la protéine S délétée de HBV, ou

b)- au moins deux molécules d'acides nucléiques hybrides susmentionnées l'une
15 comprenant la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine E1 (notamment pit1-e1-sd de séquence SEQ ID N°11, ou e1-sd, ou e1-e2-Sd, ou pit1-e1-e2-sd), l'autre comprenant la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine E1 (notamment pit2-e2-sd de séquence SEQ ID N°13, ou e2-sd, ou e1-e2-Sd, ou pit1-e1-e2-sd), ces dernières étant greffées en 5' de la séquence d'acides nucléique codant pour la protéine S délétée de HBV, ou

c)- au moins deux particules sous-virales susmentionnées, l'une comprenant la protéine
20 E1 (notamment E1-Sd de séquence SEQ ID N°8, ou PIT1-E1-Sd, ou E1-E2-Sd, ou PIT1-E1-E2-Sd) l'autre comprenant la protéine E2 (notamment E2-Sd de séquence SEQ ID N°10, ou PIT2-E2-Sd, ou E1-E2-Sd, ou PIT1-E1-E2-Sd) du HCV, ces dernières étant greffées en N-terminal de la protéine S délétée de HBV.

25

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition immunogène
30 susmentionnée, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique et/ou pour la prévention de l'hépatite C.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une composition immunogène susmentionnée, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique et/ou pour la prévention de l'hépatite B.

5 Avantageusement l'objet de la présente invention porte sur l'utilisation d'une composition immunogène susmentionnée, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique et/ou pour la prévention de l'hépatite B et de l'hépatite C.

10

L'invention a également pour objet une lignée cellulaire qui exprime des particules sous virales chimère, immunogènes non infectieuses précédemment décrites.

15 A titre d'exemples de microorganisme qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer les levures, telles que celles des familles suivantes : Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Kluveromyces, Pichia, Hanseluna, Yarowia, Schwaniomyces, Zygosaccharomyces, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis et Kluveromyces lactis étant préférées ; et les bactéries, telles que E. coli et celles des familles
20 suivantes : Lactobacillus, Lactococcus, Salmonella, Strptococcus, Bacillus et Streptomyces.

A titre d'exemples de cellules eucaryotes, on peut citer les cellules provenant d'animaux tels que les mammifères, les reptiles, les insectes et équivalent. Les cellules eucaryotes préférées sont les cellules provenant du hamster chinois (cellules CHO), du singe (cellules
25 COS et Vero), du rein de hamster nain (cellules BHK), du rein de cochon (cellules PK 15) et du rein de lapin (cellules RK13, les lignées cellulaires humaines de l'ostéosacorme (cellules 143 B), les lignées cellulaires humaines HeLa et les lignées cellulaires humaines de l'hépatome (du type cellules Hep G2), ainsi que les lignées cellulaires d'insecte (par exemple de Spodoptera frugiperda).

30

Avantageusement l'objet de la présente invention porte sur une lignée cellulaire susmentionnée, laquelle est la lignée d'ovaire de hamster chinois nommée CHO.

Ces derniers ont été antérieurement décrits notamment par Michel ML, Pontisso P, Sobczak E, Malpièce Y, Streeck RE, Tiollais P. Synthesis in animal cells of hepatitis B

surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Dec;81(24):7708-12.

La présente invention concerne également sur une lignée cellulaire susmentionnée,
5 laquelle est une levure, ladite levure pouvant être notamment *Saccharomyces Cerevisae*.

L'invention a également pour objet une lignée cellulaire décrite ci-dessus, laquelle est la lignée cellulaire de rein de hamster nouveau-né (BHK), et est particulièrement la lignée cellulaire de rein de hamster nouveau-né (BHK-21).

10 Ces derniers ont été antérieurement décrits notamment par Goldman RD, Follett EA. Birefringent filamentous organelle in BHK-21 cells and its possible role in cell spreading and motility. Science. 1970 Jul 17;169(942):286-8.

15

Selon un aspect particulier, l'invention porte également sur une méthode de production des particules sous virales chimères, immunogènes non infectieuses susmentionnées, à partir d'une lignée cellulaire susmentionnée, comprenant les étapes suivantes:

1- une étape de TRANSDUCTION des cellules de la lignée cellulaire avec un vecteur
20 lentiviral comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine S sauvage d'un isolat du virus de l'hépatite B,

2- une étape de CULTURE desdites cellules afin de produire une lignée cellulaire capable d'exprimer les particules sous-virales d'enveloppe sauvage du virus de l'hépatite B.

3- une étape de SELECTION d'un clone présentant une secretion optimale de particules
25 sous-virales d'enveloppe sauvage du virus de l'hépatite B,

4- une étape de SUR-TRANSDUCTION dudit clone avec un vecteur susmentionné,

5- une étape de CULTURE desdites cellules afin de produire une lignée cellulaire capable d'exprimer les particules sous virales chimères, immunogènes non infectieuses susmentionnées,

30 6- une étape de SELECTION desdites cellules capables de sécréter de manière optimale les particules sous virales chimères, immunogènes non infectieuses susmentionnées,

7- une étape de CULTURE dudit clone pour la production des particules sous virales chimères, immunogènes non infectieuses susmentionnées, et

8- une étape de PURIFICATION des particules sous virales à partir du milieu de culture collecté (centrifugation, ultracentrifugation sur gradients, collecte des fractions positives pour les particules sous-virales chimères, dialyse).

5 Le tableau 1 fournit une liste des séquences d'acides nucléiques et d'acides aminés décrites dans la présente invention. Par convention, les séquences d'acides nucléiques sont libellées en minuscules et les séquences d'acides aminés sont libellées et majuscules.

Tableau 1 : LISTE DE SEQUENCES

10

Acides nucléiques	Acides aminés
SEQ ID N° 1 : sd	SEQ ID N° 2 : Sd
SEQ ID N° 3 : e1	SEQ ID N° 4 : E1
SEQ ID N° 5 : e2	SEQ ID N° 6 : E2
SEQ ID N° 7 : e1-sd	SEQ ID N° 8 : E1-Sd
SEQ ID N° 9 : e2-sd	SEQ ID N° 10 : E2-Sd
SEQ ID N° 11 : pit1-e1-sd	SEQ ID N° 12 : PIT1-E1-Sd
SEQ ID N° 13 : pit2-e2-sd	SEQ ID N° 14 : PIT2-E2-Sd
SEQ ID N° 15 : Vecteur avec pit1-e1-sd	/
SEQ ID N° 16 : Vecteur avec pit2-e2-sd	/

15 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront plus clairement à la lecture de la description suivante d'un mode de réalisation préférentiel, donné à titre de simple exemple illustratif et non limitatif, et des figures annexées, parmi lesquelles :

La **Figure 1** schématise la topologie d'un fragment de la polyprotéine du virus HCV de plus de 3 000 acides aminés. Les clivages effectués par les peptidases cellulaires (✂) aboutissent à la maturation de ladite polyprotéine notamment en protéines structurales (capside, enveloppe E1 et E2). Les nombres indiquent la position des résidus d'acides aminés délimitant les domaines des différentes protéines structurales de la polyprotéine.

Les **Figures 2A et 2B** schématise la topologie transmembranaire de la protéine S sauvage du virus HBV.

25 - La **Figure 2A** schématise les 226 résidus d'acides aminés de la protéine S sauvage du virus HBV qui comprend notamment quatre domaines transmembranaires, représentés par des rectangles verticaux gris, et dont les extrémités N- et C-terminales sont orientées vers la

lumière du RE. Dans le cas de l'isolat HBV_{adv}, cette protéine d'environ 25 kD comporte 226 résidus d'acides aminés.

- La **Figure 2B** représente une particule sous-virale obtenue suite à l'auto-assemblage de ladite protéine S sauvage.

5

Les **Figures 3A à 3C** représentent la co-expression des protéines de fusion E1-Sd (Figure 3B) ou E2-Sd (Figure 3C) qui, en présence de la protéine S sauvage (Figure 3B) s'assemble en particules sous-virales chimères de la présente invention.

- La **Figure 3A** représente la protéine S sauvage de HBV qui s'auto-assemble en particules sous-virales.

10

- La **Figure 3B** représente la protéine de fusion E1-Sd qui résulte de la substitution du domaine transmembranaire situé à l'extrémité N-terminale de la protéine S sauvage par le domaine transmembranaire de la protéine d'enveloppe E1 du virus HCV, représenté par un rectangle vertical noir, et par l'ectodomaine de E1, représenté par des pointillés; puis schématise l'assemblage de ladite protéine de fusion E1-Sd, en présence de la protéine S sauvage, en particules sous-virales S + E1-Sd.

15

Selon le mode de réalisation particulier mais non limitatif de l'invention, la protéine de fusion E1-Sd d'environ 50 kD comporte 393 résidus d'acides aminés issus de la protéine E1 et du domaine S. Les résidus 192 à 380 de la protéine complète E1 sont liés à l'extrémité N-terminale de la protéine S délétée constituée des résidus 23 à 226 de la protéine S sauvage.

20

- La **Figure 3C** représente la protéine de fusion E2-Sd qui résulte de la substitution du domaine transmembranaire situé à l'extrémité N-terminale de la protéine S sauvage par le domaine transmembranaire de la protéine d'enveloppe E2 du virus HCV, représenté par un rectangle vertical blanc, et par l'ectodomaine de E2, représenté par des pointillés; puis schématise l'assemblage de ladite protéine de fusion E2-Sd, en présence de la protéine S sauvage, en particules sous-virales S + E2-Sd.

25

Selon le mode de réalisation particulier mais non limitatif de l'invention, la protéine de fusion E2-Sd d'environ 85 kD comporte 564 résidus d'acides aminés issus de la protéine E2 et du domaine S. Les résidus 384 à 743 de la protéine complète E2 sont liés à l'extrémité N-terminale de la protéine S délétée constituée des résidus 23 à 226 de la protéine S sauvage.

30

Les **Figures 4A à 4E** schématisent la topologie des protéines d'enveloppe S sauvage du HBV, E1 et E2 du HCV, ainsi que les protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd.

- La **Figure 4A** représente la topologie de la protéine d'enveloppe sauvage E1 du HCV qui est constituée d'un domaine transmembranaire unique (rectangle verticale noir) et un large ectodomaine orienté vers la lumière du RE. Dans le cas de l'isolat HCV 1a, cette protéine d'environ 35 kD et comporte 192 résidus d'acides aminés.
- 5 - La **Figure 4B** représente la topologie de la protéine d'enveloppe sauvage E2 du HCV qui est constituée d'un domaine transmembranaire unique (rectangle verticale blanc) et un large ectodomaine orienté vers la lumière du RE. Dans le cas de l'isolat HCV 1a, cette protéine d'environ 70 kD et comporte 363 résidus d'acides aminés.
- La **Figure 4C** représente la topologie de la protéine d'enveloppe sauvage S du HBV qui
10 comprend notamment quatre domaines transmembranaires (rectangles verticaux gris).
- La **Figure 4D** représente la séquence d'ADNc de la molécule d'acides nucléiques hybride pit1-e1-sd, constituée de son extrémité 5' à 3' :
 - de la séquence codant pour le peptide d'initiation de transfert PIT1 du virus HCV,
 - la séquence codant pour l'intégralité de l'ectodomaine de la protéine E1 et la séquence
15 codant pour le domaine transmembranaire de la protéine E1 déletée des 3 derniers codons de l'extrémité 3' du virusHCV,
 - de la séquence codant pour la protéine S déletée du virus HBV,
 et son utilisation pour la production de la protéine de fusion E1-Sd de l'invention.
- La **Figure 4E** représente la séquence d'ADNc de la molécule d'acides nucléique hybride
20 pit2-e2-sd, constituée de son extrémité 5' à 3' :
 - de la séquence codant pour le peptide d'initiation de transfert PIT2 du virus HCV,
 - la séquence codant pour l'intégralité de l'ectodomaine de la protéine E2, la séquence codant pour le domaine transmembranaire de la protéine E2 déletée des 3 derniers codons de l'extrémité 3'-du virus HCV,
 - 25 - de la séquence codant pour la protéine S déletée du virus HBV,
 et son utilisation pour la production de la protéine de fusion E2-Sd de l'invention.

La **Figure 5** schématise le protocole utilisé pour l'obtention des ADNc codant pour les protéines de fusion de l'invention. La séquence codant pour les protéines E1 et E2 est
30 représentée par un trait noir (séquence A). La séquence codant pour la protéine S déletée est représentée par un trait gris (séquence B). Le site de restriction BamHI est représenté par un losange noir. Les amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification des séquences d'acides nucléiques e1-sd A, e1-sd B, e2-sd A et e2-sd B sont répertoriées dans le tableau x.

Les **Figures 6A et 6B** proposent une représentation schématique du protocole expérimental de production transitoire d'une des protéines de fusion de l'invention E1-Sd ou E2-Sd en système Semliki / cellules BHK-21.

- La **Figure 6A** montre que l'ARN dérivé du plasmide pSFV1-E1-Sd est transfectée dans des cellules BHK-21 dans le but d'obtenir la production de de particules sous-virales d'enveloppe chimériques E1-Sd.

- La **Figure 6B** montre que l'ARN dérivé du plasmide pSFV1-E2-Sd est transfecté dans des cellules BHK-21 dans le but d'obtenir la production de particules sous-virales d'enveloppe chimériques E2-Sd.

Les **Figures 6C et 6D** montrent les Western-blot révélés soit par un anticorps anti-S (6C), soit par un anticorps anti-E1 et anti-E2 (6D), sur les lysats des cellules transfectées par les ARN dérivés des plasmides pSFV1-E1-Sd et pSFV1-E2-Sd..

- La **Figure 6C** montre que les protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd (bandes encadrées) sont détectées aux tailles de 50 kD et 85 kD respectivement, et correspondant aux tailles théoriques. M : marqueur de poids moléculaire (kD).

- La **Figure 6D** montre que les protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd (bandes encadrées) sont détectées aux tailles de 50 kD et 85 kD respectivement, par l'anticorps anti-E1 et anti-E2 respectivement. M : marqueur de poids moléculaire (kD).

Les **Figure 7A à 7B** montrent la co-production de la protéine S sauvage du HBV et des deux protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd en système Semliki / cellules BHK-21.

Légende : M : marqueur de poids moléculaire (kD) ; les pistes β -gal, E1E2 ou E1E2 et S représentent les lysats cellulaires témoins issus de transfections de cellules BHK-21 par les ARN SFV correspondants.

- La **Figure 7A** propose une représentation schématique du protocole expérimental. Les ARN dérivés des plasmides pSFV1-E1-Sd et pSFV1-E2-Sd sont co-transfectés individuellement dans des cellules BHK-21 avec l'ARN dérivé du plasmide pSFV1-S dans le but d'obtenir la production de deux types de particules sous-virales d'enveloppe chimériques S+E1-Sd et S+E2-Sd, la première comprenant la protéine S sauvage et la protéine de fusion E1-Sd, la seconde comprenant la protéine S sauvage et la protéine de fusion E2-Sd.

- La **Figure 7B** montre un Western-blot révélé par un anticorps anti-E1 sur les particules intracellulaires purifiées à partir des cellules transfectées par les ARN dérivés des vecteurs

pSFV1-E1-Sd et pSFV1-S. Les résultats montrent que la protéine de fusion E1-Sd (bande encadrée) est détectée à la taille de 50 kD correspondant à la taille théorique.

- La **Figure 7C** montre un Western-blot révélé par un anticorps anti-S sur les particules intracellulaires purifiées à partir des cellules transfectées par les ARN dérivés des vecteurs pSFV1-E1-Sd et pSFV1-S. Les résultats montrent que la protéine de fusion E1-Sd (bande encadrée) est détectée à la taille de 50 kD correspondant à la taille théorique.

- La **Figure 7D** montre une micrographie en microscopie électronique à transmission par coloration négative sur les particules intracellulaires purifiées à partir des cellules transfectées par les ARN dérivés des plasmides pSFV1-E1-Sd et pSFV1-S. Barre : 100 nm.

- La **Figure 7E** montre un Western-blot révélé par un anticorps anti-E2 sur les particules intracellulaires purifiées à partir des cellules transfectées par les ARN dérivés des plasmides pSFV1-E2-Sd et pSFV1-S. Les résultats montrent que la protéine de fusion E2-Sd (bande encadrée) est détectée à la taille de 85 kD correspondant à la taille théorique.

- La **Figure 7F** montre un Western-blot révélé par un anticorps anti-S sur les particules intracellulaires purifiées à partir des cellules transfectées par les ARN dérivés des plasmides pSFV1-E2-Sd et pSFV1-S. Les résultats montrent que la protéine chimère E2-Sd (bande encadrée) est détectée à la taille de 85 kD correspondant à la taille théorique.

- La **Figure 7G** montre une micrographie en microscopie électronique à transmission par coloration négative sur les particules intracellulaires purifiées à partir des cellules transfectées par les ARN dérivés des plasmides pSFV1-E2-Sd et pSFV1-S. Barre : 100 nm.

La **Figure 8** représente le protocole d'obtention des lignées clonales CHO produisant la protéine S sauvage et les protéines de fusion de l'invention. Elle schématise comment à partir d'une lignée cellulaire CHO, la transduction par un lentivirus (LV) contenant un gène de résistance à l'hygromycine (*hph*) ainsi que le gène codant pour la protéine S sauvage du HBV a permis le développement d'un premier clone cellulaire nommé CHO-S et producteur de la protéine S sauvage. Ce clone a ensuite été sur-transduit par un lentivirus (LV) contenant le gène de la GFP (*gfp*) ainsi que le gène codant pour une des deux protéines de fusion E1-Sd ou E2-Sd. Cette seconde transduction a permis le développement de deux autres clones cellulaires nommés CHO-S/E1-Sd et -S/E2-Sd.

La **Figure 9** montre une analyse par Western-blot de la production intracellulaire la protéine S sauvage et les protéines de fusion de l'invention dans les différents clones stables CHO. Elle montre que les protéines intracellulaires des clones CHO-S, CHO-S/E1-Sd et CHO-S/E2-Sd

sont révélés à l'aide d'anticorps anti-E1, anti-E2 et anti-S. Les protéines de fusion recherchées sont indiquées par des cadres noirs. M : marqueur de poids moléculaire (kD) ; pistes β -gal, E1E2 et S : lysats cellulaires témoins issus de transfections de cellules BHK-21 par les ARN SFV correspondants.

5

La **Figure 10** représente un histogramme de quantification de la protéine S sauvage par ELISA dans les fractions collectées à partir du gradient de CsCl. L'abscisse montre les différentes fractions collectées, l'ordonnée indique la densité optique à 290 nm de chacune d'elle. A partir des surnageants de culture des clones CHO-S, CHO-S/E1-Sd et CHO-S/E2-Sd, les particules sous-virales S et chimériques sont purifiées par ultracentrifugation en CsCl. Des fractions sont collectées à partir du sommet du gradient (fraction 1) et la quantité de protéine S sauvage a été évaluée par ELISA. L'histogramme noir représente la répartition de la protéine S sauvage dans les fractions du clone CHO-S, l'histogramme gris clair représente la répartition de la protéine S sauvage dans les fractions du clone CHO-S/E1-Sd et l'histogramme gris foncé représente la répartition de la protéine S sauvage dans les fractions du clone CHO-S/E2-Sd.

La **Figure 11A** montre que le contenu protéique des particules purifiées par CsCl a été analysé par Western-blot à l'aide d'anticorps anti-E1, anti-E2 et anti-S. La protéine S sauvage est détectée sous ses deux états de glycosylation (24 et 27 kD) dans les trois types de particules sous-virales. Les protéines de fusion E1-Sd ou E2-Sd sont détectées aux tailles correspondant à la taille théorique respectivement de 50 et 85 kD dans leur particule respective. M : marqueur de poids moléculaire (kD).

La **Figure 11B** montre l'analyse en coloration négative par microscopie électronique à transmission de la purification, à partir du surnageant du clone CHO-S, de particules sous virales résultant de l'auto-assemblage de la protéine S sauvage de type sphériques d'environ 20 nm de diamètre. Barre : 20 nm.

La **Figure 11C** montre l'analyse en coloration négative par microscopie électronique à transmission de la purification, à partir du surnageant du clone CHO-S/E1-Sd, de particules sous virales chimère résultant de l'assemblage de la protéine de fusion E1-Sd en présence de la protéine S sauvage. Ces particules de type sphériques font environ 20 nm de diamètre. Barre : 20 nm.

La **Figure 11D** montre l'analyse en coloration négative par microscopie électronique à transmission de la purification, à partir du surnageant du clone CHO-S/E2-Sd, de particules

sous virales chimère résultant de l'assemblage de la protéine de fusion E1-Sd en présence de la protéine S sauvage. Ces particules de type sphériques font d'environ 20 nm de diamètre. Barre : 20 nm.

5

A titre d'exemple non limitatif, on présente ci-après un mode de réalisation particulier de l'invention, pour d'obtention de particules sous-virales d'enveloppe du virus de l'hépatite C (HCV) en système Semliki (cf figures 4 à 7).

10 Ce mode de réalisation repose sur l'obtention de protéines de fusion immunogènes de l'invention et en particulier des protéines de fusion E1-Sd ou E2-Sd, comprenant d'une part la protéine d'enveloppe S déletée en N-terminal de son domaine transmembranaire (Sd), du virus de l'hépatite B (HBV) et d'autre part la quasi intégralité de l'une des protéines d'enveloppe E1 ou E2 du HCV. Ce mode de réalisation transitoire démontre la capacité d'assemblage de ladite protéine S déletée (Sd), en présence de la protéine S
15 sauvage, permet d'obtenir des particules sous-virales chimères susmentionnées, grâce notamment au haut niveau d'expression du vecteur basé sur les propriétés de réplication du virus de la forêt de Semliki (vecteur pSFV), avant de procéder à l'obtention de clones stables et producteurs desdites particules en utilisant des vecteurs lentiviraux.

20 **Exemple I : Obtention de particules sous-virales chimère d'enveloppe du virus de l'hépatite C en système Semliki (pSFV)**

I.1) Construction des plasmides pSFV1-E1-Sd et pSFV1-E2-Sd.

Le vecteur pSFV1 (Invitrogen) possédant une structure bicistronique de 11033 pb est
25 utilisé pour les constructions suivantes. Ce vecteur est doté d'une séquence promotrice de la SP6-ARN-polymérase, insérée en 5' du premier cistron, afin de pouvoir initier la synthèse d'un ARN complet de polarité positive (ARN nommé 42S(+)) par transcription *in vitro*. Après transfection dans des cellules de mammifère, ces ARN recombinants coiffés *in vitro* s'auto-répliquent en présence de la réplicase nsP1-4 du SFV et servent à la production
30 de protéines d'intérêt par l'intermédiaire d'un ARNm secondaire nommé 26S(+).

L'obtention de l'ADN complémentaire (ADNc) sauvage ou d'une molécule d'acides nucléiques hybride codant pour une protéine de fusion de l'invention s'effectue en réalisant plusieurs séries d'amplifications par réactions de polymérisation en chaîne (PCR). A partir du plasmide pSFV1-E1E2 (consistant en un vecteur SFV contenant la séquence codant

pour les deux protéines E1 et E2 du HCV), une première PCR, nommée PCR A, a permis l'amplification des séquences codant pour les protéines d'enveloppe E1 ou E2 du HCV avec leur domaine transmembranaire et précédées des séquences codant pour leur peptide d'initiation de transfert respectif d'adressage au réticulum endoplasmique. A partir du plasmide pHBV1.5 décrit antérieurement [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51], une seconde PCR, nommée PCR B a permis l'amplification de la séquence codant pour la protéine S déletée du HBV. Les parties « HCV » des séquences codant pour les protéines de fusion selon l'invention ont été nommées « A » et les parties « HBV » ont été nommées « B » (figure 5). Les produits des PCR A et B ont été quantifiés et purifiés sur gel pour être ensuite inclus à part égale dans des PCR finales. L'utilisation d'amorces bivalentes HCV-HBV a permis la synthèse de produits de PCR A et B possédant des domaines chevauchants à leur extrémités permettant, en final, d'obtenir les séquences d'ADNc complètes codant pour les protéines de fusion de l'invention.

I.1.1) Amplification des séquences d'ADNc codant pour les protéines de fusion de l'invention (notamment E1-Sd et E2-Sd) :

Les amplifications par PCR s'effectuent dans un milieu réactionnel de 50 μ L contenant 50 ng d'ADN, 15 pmol de chaque couple d'amorces (Proligo), 200 μ M de chacun des désoxyribonucléotides dNTP (Invitrogen) et 10 unités de Taq-ADN-polymérase (Takara) comportant une activité correctrice de façon à minimiser les erreurs liées aux amplifications successives (figure 5). A l'aide des logiciels « Vector NTI Advance 10TM » (Invitrogen) et « Primer premierTM » (Biosoft International), les amorces « sens » des séquences A et les amorces « anti-sens » des séquences B ont été définies de manière à générer un site BamHI aux extrémités respectives 5' et 3' des fragments d'ADN amplifiés.

Le tableau 2 « Oligonucléotides utilisés pour l'amplification génique des séquences A et B constitutives des séquences chimères » ci-dessous indique les séquences d'amorces utilisées.

Les séquences correspondant au HCV y sont représentées en écriture noire, celles correspondant au HBV en écriture noire soulignée, celles correspondant au site de restriction BamHI en écriture italique soulignée, celles correspondant au codon ATG

d'initiation de la traduction en écriture grasse, celles correspondant au codon ATT de terminaison de la traduction en écriture grasse.

Le tableau 2 « Oligonucléotides utilisés pour l'amplification génique des séquences A et B constitutives des séquences chimères »

fragment d'ADNc amplifié	couple d'amorce	séquence de l'amorce
e1-sd A	sens anti-sens	5' - ATAGGATCCATGACAGGGAACCTTCCTGGTTGC - 3' 3' - AACGACAAGCGGTCGTGTTCTTAGGAGT - 5'
e1-sd B	sens anti-sens	5' - GCTGTTCGCCAGCACAAGAATCCTC - 3' 3' - TAAAAGAAAACAGAGACCCATATGTAAATTCCTAGGATA - 5'
e2-sd A	sens anti-sens	5' - ATAGGATCCATGGGGAACTGGGCGAAGGT - 3' 3' - ACGATGAGTATAGGGTTTGTTCCTTAGGAGTGTTATGG - 5'
e2-sd B	sens anti-sens	5' - GCTACTCATATCCCAAACAAGAATCCTCACAATACC - 3' 3' - TAAAAGAAAACAGAGACCCATATGTAAATTCCTAGGATA - 5'

Ces réactions d'amplification effectuées en thermocycleur « iCycler™ » (Biorad) ont consisté en une dénaturation initiale de 5 minutes à 95 °C, suivie de 25 cycles comprenant une dénaturation de 1 minute à 95 °C, une hybridation de 1 minute à 60 °C et une élongation de 1 minute à 69 °C. Les 25 cycles sont suivis d'une élongation finale de 10 minutes à 69 °C. Les fragments amplifiés par les PCR A et B sont purifiés sur gel d'agarose 1 % à l'aide du système « Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System™ » (Promega) selon les recommandations du fabricant. Les fragments purifiés des PCR A et B sont ensuite hybridés par une PCR nommée PCRHYB en absence d'amorces pendant 10 cycles puis sont amplifiés par une PCR finale nommée PCRFIN pendant 25 cycles en présence des amorces « sens » des séquences A et les amorces « anti-sens » des séquences B. Les programmes des cycles de ces deux dernières PCR sont similaires à ceux utilisés pour les PCR A et B. Les fragments amplifiés de molécules d'acides nucléiques hybrides de l'invention ainsi obtenus sont purifiés sur gel comme ci-dessus.

1.1.2) clonage des séquences d'ADNc hybrides dans le vecteur pSFV1

Les produits de PCRFIN purifiés sont clonés dans le vecteur pGEM-T® (« pGEM-T Easy Vector System », Promega) selon les recommandations du fabricant. Les fragments de molécules d'acides nucléiques hybrides de l'invention sont libérés du pGEM-T® par

restriction avec l'enzyme BamHI (Biolabs) puis clonés au niveau du site BamHI du plasmide pSFV1. Les différents plasmides comprenant les protéines de fusion de l'invention (notamment les plaamides pSFV1-E1-Sd et pSFV1-E2-Sd) sont amplifiés par transformation bactérienne puis purifiés par maxipréparation d'ADN au phénol/chloroforme. L'orientation de l'insert est vérifiée par restriction enzymatique et l'ensemble des constructions est vérifiée par séquençage.

I-2) Obtention de lignée cellulaire transfectées transitoirement par les ARN des différentes constructions SFV

10

Les procédures de culture des cellules de rein de hamster nouveau-né (BHK-21) ainsi que les protocoles de transcription in vitro des plasmides matrices SFV et de transfection des ARN recombinants auto-réplicatifs étaient identiques à ceux décrits antérieurement [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51]. La construction pSFV-S, exprimant la protéine S sauvage du HBV et antérieurement décrite dans l'article précédent, a été utilisée comme contrôle.

15

I-3) Analyse de la production intracellulaire des protéines d'enveloppe sauvages et chimériques

20

Les procédures d'analyses biochimiques des protéines d'intérêt (notamment S, Sd, E1, E2, E1-Sd, E2-Sd etc..) par immunofluorescence en microscopie confocale et par Western Blot, les procédures d'analyses ultra-structurales des cellules transfectées en microscopie électronique à transmission ainsi que les procédures de quantification (ELISA) / purification (gradient de sucrose puis chromatographie d'affinité) des particules sous-virales d'enveloppe chimériques HCV-HBV sont celles décrites antérieurement [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51].

25

30

La détection des protéines sauvages E1 et E2 de HCV et des protéines de fusion de l'invention est réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal murin anti-E1 (A4, fourni par le Dr Harry Greenberg, Université de Stanford, Californie) [Dubuisson, J., Hsu, H. H., Cheung, R. C., Greenberg, H. B., Russell, D. G., and Rice, C. M. (1994). Formation and intracellular

localization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia and Sindbis viruses. J Virol 68(10), 6147-60]] ou anti-E2 (H52, fourni par le Dr Jean Dubuisson, Institut Pasteur de Lille) [Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y. S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997). Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. J Virol 71(1), 697-704].

I-4) Analyse du surnageant de culture.

Après transfection, le surnageant de culture d'environ 10^7 cellules transfectées est nettoyé par une centrifugation de 10 minutes à 1500 g puis est ultracentrifugé à 4 °C pendant 16 heures à 35.000 rpm à l'aide d'un rotor SW41 (L70 Ultracentrifuge™, Beckman). Le culot a est avec 50 µL du tampon de lyse puis analysé par Western-blot.

I.5) Production de protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd de l'invention

15

Seize heures après la transfection par les plasmides pSFV1 comprenant les molécules d'acides nucléiques hybrides de l'invention, pit1-e1-sd, pit2-e2-sd, les cellules BHK-21 ont été lysées puis analysées par Western-blot à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-E1 et anti-E2. Après production transitoire en cellule BHK-21, la taille des protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd sont d'environ 50 kD pour la protéine E1-Sd et d'environ 85 kD pour la protéine E2-Sd. Ces résultats, corrélés à l'intense immunofluorescence obtenue par la détection desdites protéines de fusion de l'invention avec des anticorps anti-E1, anti-E2 et anti-S, montrent qu'elles sont correctement produites, correctement glycosylées, et donc disposées selon la topologie transmembranaire souhaitée (figure 6A à 6D).

25

De façon à restaurer la capacité de sécrétion des différentes protéines de fusion de l'invention, des co-transfections sont réalisées en apportant en *trans* la forme sauvage de la protéine S du HBV à chacune des protéines de fusion de l'invention (figure 7A). Seize heures après la transfection les cellules co-transfectées sont broyées et les particules sous-virales intracellulaires ont été purifiées par gradient de sucrose puis chromatographie d'affinité comme décrit antérieurement [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51]. Dans tous les cas, les particules sous-virales sont étudiées par microscopie électronique à transmission et par Western-blot en utilisant les

30

anticorps anti-S, anti-E1 ou anti-E2 décrits précédemment dans l'exemple I.3 (figures 7B à 7G).

Les images de microscopie électronique à transmission montrent que dans toutes ces expériences de co-production de la protéine S sauvage avec une des protéines de fusion de l'invention, il est possible de produire une quantité importante des particules sous-virales, sphériques et filamenteuses. Les analyses en Western-blot montrent que ces particules sous-virales plus ou moins filamenteuses sont riches en protéines de fusion de l'invention.

La mise en œuvre selon l'exemple 1 de la présente invention en système « Semliki » montre que les protéines de fusion de l'invention contenant la quasi-intégralité des protéines E1 ou E2 du HCV (leur domaine transmembranaire se substituant à celui situé en N-terminal de la protéine S du HBV) s'assemblent en particules sous-virales chimères de même nature que les particules sous-virales utilisées dans la production de vaccins contre l'hépatite B, facilitant ainsi la purification desdites particules sous-virales chimères de l'invention, et potentiellement, le développement d'une application industrielle d'un vaccin contre le HCV, calquée sur celle du vaccin contre le HBV.

La mise en œuvre selon l'exemple 1 de la présente invention montre également la production de protéines de fusion comprenant les protéines E1 et/ou E2 non tronquées de HCV. Cette caractéristique peut s'avérer déterminante pour induire une réponse immunitaire neutralisante et cellulaire optimale.

Cependant, en système « Semliki », les particules sous-virales chimères sont produites par transfection transitoire des cellules. En effet, la forte cytotoxicité de ces vecteurs ne permet pas d'obtenir une sécrétion efficace sur le long terme des particules sous-virales chimères. Par ailleurs, la purification desdites particules à partir du broyat des cellules co-transfectées nécessite une mise en œuvre relativement lourde, mal adaptée à une production industrielle.

A titre d'exemple non limitatif, on présente, en relation avec les figures 8 à 11, un mode de réalisation d'obtention de particules sous-virales d'enveloppe du virus de l'hépatite C à partir de lignées de type CHO exprimant de manière stable la protéine sauvage S du HBV ainsi que la protéine de fusion E1-Sd ou la protéine de fusion E2-Sd. L'obtention de ces clones stables de CHO est rendue possible par l'utilisation de vecteurs intégratifs de type lentiviral. Un des atouts de ce système est que la production de protéines

recombinantes, telles que les protéines de fusion de l'invention, n'a pas d'effets cytotoxiques majeurs à courts termes tels que ceux rencontrés avec le système SFV.

Un des objectifs de ce mode de réalisation est également d'obtenir un système cellulaire de production de particules sous-virales chimères de l'invention proche de celui
5 utilisé pour la fabrication industrielle du vaccin contre l'hépatite B.

Exemple II : Obtention de particules sous-virales d'enveloppe du virus de l'hépatite C en système lentiviral

10 L'utilisation de vecteurs lentiviraux a permis de développer des clones cellulaires produisant de façon stable la protéine S sauvage du HBV associée à une des protéines de fusion E1-Sd et/ou E2-Sd.

II-1) Vecteurs plasmidiques lentiviraux pLENTI.

15 Le plasmide pLENTI^{hph} de 9955 pb, comportant le gène de sélection *hph*, et codant pour une protéine de résistance à l'hygromycine comme marqueur de sélection a été utilisé pour les constructions suivantes [Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of
20 nondividing cells by a lentiviral vector. Science 272(5259), 263-7].

Dans un premier temps, la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine S sauvage est libérée de pSFV1-S décrit antérieurement [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51] par restriction
25 avec l'enzyme *Bam*HI (Biolabs) puis purifié sur gel d'agarose 1% à l'aide du système « Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega) selon les recommandations du fabricant. Ce fragment purifié a ensuite été cloné au niveau du site *Bam*HI compris dans le site de clonage multiple du plasmide pLENTI^{hph} à l'aide d'une T4-ADN-ligase (Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Le plasmide pLENTI^{hph}-S a enfin été amplifié par
30 transformation bactérienne puis purifié par maxipréparation d'ADN à l'aide du système « Nucleobond PC 500 Kit™ » (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. L'orientation de l'insert a été vérifiée par restriction enzymatique.

De la même façon, les différentes molécules d'acides nucléiques hybrides de l'invention d'ADNc codant pour les protéines de fusion de l'invention (notamment E1-Sd et E2-Sd) sont clonées au niveau du site *Bam*HI du plasmide pLENTI^{gfp}. Les plasmides ainsi obtenus (notamment pLENTI^{gfp}-E1-Sd et E2-Sd) sont ensuite amplifiés, purifiés et séquencés (cf. II-1).

5

II-2) Production de lentivirus recombinants.

Vingt-quatre heures avant la transfection des plasmides lentiviraux, des cellules HEK 293T ont étéensemencées à raison de 3.10^6 cellules par flasque de 75 cm² (Falcon) en milieux DMEM-glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de vœux fœtal décomplémenté (ATGC), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Ces cellules ont été cultivées sous 5 % de CO₂ et le milieu de culture a été changé 4 heures avant la transfection. Une pmole de chaque plasmide p8.74, pVSV-G et pLENTI (pLENTI^{hph}-S, pLENTI^{gfp}-E1-Sd, E2-Sd) a été transfectée simultanément dans les cellules HEK 293T à l'aide du système « Calcium Phosphate Transfection KitTM » (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le milieu de culture est changé 24 heures après la transfection et collecté 48 heures et 72 heures après la transfection. Les milieux collectés sont filtrés à 0,45 µm puis concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20 % à 4°C pendant 90 minutes à 100.000 g. Le culot contenant les lentivirus recombinants est repris dans 500 µL de tampon phosphate (PBS) et conservé à -80 °C. Des lots de vecteurs lentiviraux recombinants de l'invention sont générés dont notamment les vecteurs lentiviraux LV^{hph}-S, LV^{gfp}-E1-Sd, LV^{gfp}-E2-Sd. La titration des unités lentivirales de transduction (TU) de chaque lot est déterminée à partir du dosage de la protéine p24 et à l'aide du système « Innostest HIV KitTM » (Innogenetics) selon les recommandations du fabricant.

25

II-3) Culture cellulaire et transduction.

La lignée utilisée pour la production stable et constitutive des particules sous-virales chimériques HCV-HBV est une lignée d'ovaire de hamster chinois nommée CHO. Cette lignée a déjà été parfaitement validée pour la production de protéines recombinantes d'intérêt médical, et notamment pour le vaccin contre l'hépatite B « GenHevac B Pasteur® » (Sanofi Pasteur MSD). Ces cellules CHO sont cultivées sous 5 % de CO₂ en milieux DMEM-F12 (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de vœux fœtal décomplémenté (ATGC), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Vingt-quatre heures avant la

30

transduction, les cellules CHO sontensemencées dans une plaque 6-puits (Falcon) à raison de 105 cellules par puit. Elles sont ensuite transduites dans du milieu neuf avec une multiplicité d'infection de 2,5 (soit un ratio d'unités de transduction (TU) par cellule de 2,5) en présence de 4 µg/mL de polybrène (Sigma-Aldrich) puis cultivées pendant 24 heures. Le jour suivant, le milieu de transduction est retiré, les cellules obtenues selon la mise en œuvre de la présente invention sont rincées en tampon PBS puis sont maintenues normalement en culture pendant encore 2 jours.

II-3.1) Génération d'un clone CHO stable producteur de la protéine S sauvage.

La lignée CHO utilisée est transduite avec le lentivirus LV^{hph}-S selon le protocole décrit ci-dessus, et schématisé à la Figure 8. L'efficacité de transduction est vérifiée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine S sauvage selon un protocole décrit antérieurement [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51]. Trois jours après la transduction, les cellules sont trypsinées, ré-ensemencées dans une boîte de culture de 10 cm de diamètre (Falcon) en présence de 1 mg/mL d'hygromycine (Euromedex) et maintenue en culture pendant trois semaines. Les clones cellulaires émergents sont récupérés par cylindre de clonage (Invitrogen) puis amplifiés en plaque 24-puits (Falcon). Le clone CHO utilisé par la suite est sélectionné après quantification dans le surnageant de culture de la protéine S sauvage par ELISA [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51] Ce clone cellulaire a été nommé CHO-S.

II-3.2) Génération de clones CHO stables producteurs de la protéine S sauvage du virus HBV et des protéines de fusion de l'invention E1-Sd et E2-Sd.

Le clone cellulaire CHO-S est par la suite sur-transduit avec le lentivirus recombinant LV^{gfp} codant pour la protéine GFP comme marqueur de sélection, et comprenant une molécule d'acides nucléiques hybride de l'invention, notamment le vecteur lentivirus LV^{gfp}-PIT1-E1-Sd ou LV^{gfp}-PIT2-E2-Sd selon le protocole décrit ci-dessus au §II-3.1. (Figure 8). De part la présence de la protéine GFP, l'efficacité de transduction est vérifiée à l'aide d'un

cytomètre en flux FACScalibur™ (Becton-Dickinson). Trois jours après la transduction, les cellules sont trypsinées, ré-ensemencées en dilution limite dans une plaque 96-puits (Falcon) à raison de 1 cellule par puit et elles sont maintenues en culture pendant trois semaines. Les clones cellulaires émergents GFP+ sont récupérés puis amplifiés en grande quantité. Les clones cellulaires ainsi obtenus sont notamment nommés CHO-E1-Sd ou CHO-E2-Sd.

II-4) Analyse de la production intracellulaire des protéines d'enveloppe sauvage et chimériques du HBV et du HCV.

Les procédures d'analyses biochimiques par immunofluorescence et par Western Blot des protéines d'intérêt S, E1-Sd ou E2-Sd de chaque clone cellulaire ont déjà été décrites précédemment pour l'exemple I au § I-4.

II-5) Purification et analyse des particules sous-virales chimères issues du surnageant de culture.

Environ 200 mL de surnageant de culture pour chaque clone sélectionné est clarifié par centrifugation à 4 °C pendant 10 minutes à 1500 g. Les protéines sont précipitées par ajout d'une solution de (NH₄)₂SO₄ (pH 7,5 ; 45 % final) puis centrifugation à 4 °C pendant 15 minutes à 10.000 g. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon TNE (10 mM Tris/HCl pH 7,5 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA). Après une série de dialyses en tampon TNE, du CsCl est ajouté jusqu'à obtenir une densité d'environ 1,22 g/cm³ puis deux ultracentrifugations isopycniques successives est réalisées à 15 °C pendant 48 heures à 40.000 rpm à l'aide d'un rotor 45Ti (L70 Ultracentrifuge, Beckman). Des fractions sont collectées à partir du sommet du gradient et la protéine S sauvage, est quantifiée par ELISA [Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingeard, P., (2007) Hepatitis B Virus Subviral Envelope Particle Morphogenesis and Intracellular Trafficking J Virol, 81(8), 3842-51]. Les fractions positives ont été mélangées et dialysées à 4 °C en tampon TNE.

Les préparations purifiées ont enfin été analysées par Western Blot et par microscopie électronique à transmission comme décrit précédemment l'exemple I au § I-4.

II-6) Production intracellulaire de la protéine S et des protéines de fusion.

Suite à leur expansion, les clones cellulaires CHO-S, CHO-E1-Sd et CHO-E2-Sd ont été analysés par immunofluorescence puis Western-blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines Sd, E1 ou E2 (cf : exemple I au § I-4 et figure 9). Comme attendu, l'ensemble des clones permet une production intense de la protéine S sauvage du HBV sous ses deux états de glycosylation (p24 et gp27). De même, les clones CHO-E1-Sd et CHO-E2-Sd permettent une production intense et cytoplasmique des protéines de fusion de l'invention de tailles attendues. Ces résultats montrent donc que toutes les protéines de fusion de l'invention sont correctement produites dans la lignée CHO.

II-7) Purification des particules

Un premier essai de purification est réalisé à partir de 200 mL de surnageant de culture du clone CHO-S, CHO-E1-Sd ou CHO-E2-Sd. Ces surnageants, dont la concentration en protéine S sauvage est évaluée par ELISA à environ 100 ng/mL pour les trois clones, sont ultracentrifugés sur un gradient isopycnique de CsCl. Les fractions de chaque gradient formé sont ensuite analysées par une quantification de la protéine S sauvage (figure 10). Pour les trois types de particules sous-virales chimères purifiées (S, E1-Sd et E2-Sd), le pic de concentration de protéine S sauvage a pu être observé dans la fraction n° 9, correspondant à une densité comprise entre 1,17 et 1,18. Les fractions n° 8, 9 et 10 de chaque préparation sont alors rassemblées pour être dialysées puis analysées par Western-blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines S sauvage, E1 ou E2 (cf : exemple I au § I-4 et (figure 11A) et par microscopie électronique à transmission en coloration négative (figures 11B à 11D).

Un dépôt correspondant à un µg de protéine S sauvage pour chaque purification est réalisé pour l'analyse en gel d'acrylamide. Ceci permet de montrer que les protéines de fusion de l'invention E1-Sd et E2-Sd sont détectées à la taille attendue et en quantité respectable dans leur préparation respective par les anticorps anti-E1 ou anti-E2. De même, les deux formes de glycosylation attendues de la protéine S sauvage sont détectées dans chaque préparation. L'analyse par coloration négative en microscopie électronique à transmission a permis de confirmer la présence de particules sous-virales d'enveloppe sphériques d'environ 20 nm de diamètre dans les trois préparations étudiées.

Exemple III : Obtention de particules sous-virales d'enveloppe comprenant les deux protéines de fusion E1-Sd et E2-Sd.

Un nouveau plasmide pLENTI^{gluc} comportant le gène de sélection *gluc* de *Gaussia princeps*, au lieu et place du gène *gfp*, est réalisé et code pour une luciférase (GLuc) sécrétée comme marqueur de sélection. Le fragment d'ADNc codant pour la protéine de fusion E1-Sd est cloné au niveau du site *Bam*HI du plasmide pLENTI^{gluc}. Le plasmide pLENTI^{gluc}-E1-Sd ainsi obtenu est amplifié, purifié et séquencé (cf. II-1).

III.1. Production de lentivirus recombinants.

Vingt-quatre heures avant la transfection des plasmides lentiviraux, des cellules HEK 293T ont été ensemencées à raison de 3.10^6 cellules par flasque de 75 cm² (Falcon) en milieux DMEM-glutamax (Invitrogen) supplémenté par 10 % de sérum de vœux fœtal décomplémenté (ATGC), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Ces cellules sont cultivées sous 5 % de CO₂ et le milieu de culture est changé 4 heures avant la transfection. Une pmole de chaque plasmide p8.74, pVSV-G et pLENTI^{gluc}-E1-Sd est transfectée simultanément dans les cellules HEK 293T à l'aide du système « Calcium Phosphate Transfection Kit » (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le milieu de culture est changé 24 heures après la transfection et collecté 48 heures et 72 heures après la transfection. Les milieux collectés sont filtrés à 0,45 µm puis concentrés par ultracentrifugation sur coussin de sucrose 20 % à 4°C pendant 90 minutes à 100.000 g. Le culot contenant les lentivirus recombinants est repris dans 500 µL de tampon phosphate (PBS) et conservé à -80 °C. Un nouveau lot de lentivirus recombinants est ainsi généré : LV^{gluc}-E1-Sd. La titration des unités lentivirales de transduction (TU) de ce lot est déterminée à partir du dosage de la protéine p24 et à l'aide du système « Innotest HIV Kit » (Innogenetics) selon les recommandations du fabricant.

III.2. Génération d'un clone CHO stable producteur de la protéine S sauvage du virus HBV, des protéine de fusion de l'invention E2-Sd et E1-Sd.

La culture des cellules CHO et la méthode de transduction exposée et utilisée pour l'exemple II est adapté à cet exemple. Après une première transduction avec le lentivirus LV^{hph}-S, permettant l'obtention du clone cellulaire CHO-S, une seconde transduction est effectuée avec le lentivirus LV^{gfp}-E2-Sd selon le protocole décrit pour l'exemple II, permettant l'obtention du clone cellulaire CHO-E2-Sd.

Ce dernier est à nouveau transduit avec le lentivirus LV^{gluc}- E1-Sd selon le protocole décrit ci-dessus. Trois jours après la transduction, les cellules sont trypsinées et réensemencées en dilution limite dans une plaque 96-puits (Falcon) à raison de 1 cellule par puit. Les cellules sont maintenues en culture pendant trois semaines au bout desquelles le surnageant des clones cellulaires émergents est récolté. Dans ces surnageants, la présence de la luciférase est détectée par la mesure de son activité enzymatique à l'aide du système « *Gaussia Luciferase Assay Kit*TM » (Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La mesure de la lumière émise par la réaction enzymatique est réalisée à l'aide d'un luminomètre Centro LB 960TM (Berthold Technologies). Les clones cellulaires correspondant aux surnageants GLuc⁺ sont récupérés puis amplifiés en grande quantité. Le clone ainsi obtenu est nommé CHO-S/E2-Sd/E1-Sd.

Exemple IV : Analyse *in vivo* de l'activité immunologique des particules sous-virales chimériques

15

5 à 10 milligrammes de particules sous-virales chimériques pour chaque type de particule (S+E1-Sd, S+E2-Sd, S seule du HBV) sont purifiées à partir du surnageant de culture cellulaire selon la méthode décrite ci-dessus.

Quatre groupes de souris et de lapins sont mis en œuvre pour une série d'immunisation.

20

L'immunisation est effectuée par trois injections de 10 microgrammes de l'immunogène selon la méthode classique.

Le premier groupe est immunisé par les particules S+E1-Sd.

Le deuxième groupe est immunisé par les particules S+E2-Sd.

Le troisième groupe est immunisé par les particules HBV S seule.

25

Le quatrième groupe est immunisé par le mélange de particules sous-virales chimériques S+E1-Sd et de particules sous-virales chimériques S+E2-Sd.

La réponse humorale globale produite chez ces animaux est détectée par l'analyse ELISA et Western blots. Pour les anticorps anti-S, des ELISA commerciaux (Abbott, Roche) permettent de déterminer le nombre d'unités internationales (UI) d'anticorps anti-S, qui sont connus pour avoir des propriétés neutralisantes contre le VHB. Une concentration au moins égales à 10 UI est considérée comme protectrice contre le VHB (Jilg W, et al. Hepatitis B vaccination: Strategy for booster doses in high risk population groups. Progress in Hepatitis B Immunization. Eds. P. Coursaget et al. Colloque Inserm. 1990; 190: 419-427.) Pour les

anticorps anti-E1 et anti-E2, le Western blot est utilisé pour évaluer si une réponse anticorps anti-E1 et anti-E2 est générée. Si c'est le cas, cette analyse est complétée d'une analyse de la présence d'anticorps anti-E1 et anti-E2 neutralisant le virus. L'analyse de la neutralisation de HCV par ces anticorps est mise en œuvre dans le système JFH-1 (Wakita et al, Nat Med 5 2005) qui permet de propager une souche de HCV de génotype 2 in vitro, ou par l'utilisation des souches virales chimériques comprenant les protéines structurales du HCV de génotype 1 ou 3.

REVENDEICATIONS

1. Protéine de fusion immunogène comprenant au moins les deux peptides suivants :

a)- du côté C-terminal, un premier peptide constitué :

5 - de la séquence d'acides aminés de la protéine S d'un isolat du virus humain de l'hépatite B (HBV), laquelle protéine S est déletée de son domaine transmembranaire situé à son extrémité N-terminale, ou

 - d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S déletée en N-terminal, sous réserve que
10 ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV, ou

 - de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite séquence d'acides aminés de ladite protéine S déletée, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des
15 particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV ; et

b)- du côté N-terminal, un second peptide constitué :

 - de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'au moins une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C (HCV), ou

 - d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75 %
20 avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV, ou

 - de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou
25 d'un variant synthétique dérivée de ladite séquence d'acides aminés, de ladite protéine d'enveloppe soit E1 ou E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV,

 ladite protéine d'enveloppe d'un isolat du HCV étant la protéine E1, la protéine E2 ou un
30 peptide de fusion comprenant la protéine E1 et la protéine E2.

2. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 1, dans laquelle le second peptide situé du côté N-terminal, est constitué :

- de la totalité de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine E1, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

3. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 1, dans laquelle le second peptide situé du côté N-terminal, est constitué :

- de la totalité de la séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine E2, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78%, avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine de la protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

4. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la séquence d'acides aminés du premier peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 93% avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S déletée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

5. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la séquence d'acides aminés du premier peptide présente un pourcentage

d'identité d'au moins 95% avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S déléetée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

5 6. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la séquence d'acides aminés du premier peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 97% avec ladite séquence d'acides aminés de la protéine S déléetée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

10

 7. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de
15 l'hépatite C, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

 8. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage
20 d'identité d'au moins 85% avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'enveloppe d'un isolat du virus de l'hépatite C, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

25 9. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence d'acides aminés du domaine transmembranaire et de l'ectodomaine d'une protéine d'enveloppe d'un isolat du HCV, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-
30 virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

 10. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle le premier et le second peptide constituant la protéine de fusion immunogène

sont contigus, et l'extrémité C-terminale du second peptide est liée de façon covalente à l'extrémité N-terminale du premier peptide.

11. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle le premier peptide en position C-terminale est constitué :

- d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés dans la région comprise de l'acide aminé en position 23 à celui en position 226 dans la séquence de la protéine S délétée en N-terminal, de HBV, ou
- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 91%, avec ladite séquence d'acides aminés contigus de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV, ou
- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HBV, ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides aminés de ladite protéine S délétée en N-terminal; sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

12. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 11, dans laquelle HBV est l'isolat HBVadw.

13. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 11 ou 12, dans laquelle la séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés dans la région comprise de l'acide aminé en position 23 à celui en position 226 dans la séquence de la protéine S délétée en N-terminal est représentée par la SEQ ID NO: 2.

14. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, dans laquelle la séquence d'acides aminés du premier peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 93% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

15 **15.** La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, dans laquelle la séquence d'acides aminés du premier peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité
5 à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

10 **16.** La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, dans laquelle la séquence d'acides aminés du premier peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 97% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de la protéine S délétée en N-terminal, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité
à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV.

15 **17.** La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans laquelle le second peptide en position N-terminale est constitué :

- d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés dans la région comprise de l'acide aminé en position 192 à celui en position 383 dans la séquence de la protéine E1 de HCV, ou
- 20 - d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 75% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV, ou
- 25 - de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV, ou d'un variant synthétique dérivée de ladite séquence d'acides aminés contigus de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

30 **18.** La protéine de fusion immunogène selon la revendication 17, dans laquelle HCV est l'isolat HCV-1a.

19. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 17, dans laquelle le second peptide en position N-terminale est constitué d'une séquence d'acides aminés

délimitée par les acides aminés contigus situés dans la région comprise de l'acide aminé en position 192 à celui en position 380 dans la séquence de la protéine E1 de HCV.

20. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 17 ou 18, dans laquelle la
5 séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés dans la région comprise de l'acide aminé en position 192 à celui en position 383 dans la séquence de la protéine E1 de HCV est représentée par la SEQ ID NO: 4.

21. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 17 à
10 20, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

15 22. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 17, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de ladite protéine E1, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

20

23. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 17, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de ladite protéine E1, sous réserve que
25 ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

24. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 11 à 23, dans laquelle le premier et le second peptide sont contigus, ladite protéine de fusion étant constituée par :

30 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88%, avec la SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV, ou

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique dérivée de ladite SEQ ID NO : 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

5

25. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 24, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 89% avec SEQ ID NO : 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

26. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 24, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 92% avec SEQ ID NO : 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

27. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 24, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec SEQ ID NO : 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

28. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans laquelle le second peptide en position N-terminale est constitué :

- d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés de l'acide aminé en position 384 à celui en position 746 dans la séquence de la protéine E2 de HCV, ou

- d'une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV, ou

- de la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

5

29. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 28, dans laquelle HCV est l'isolat HCV-1a.

30. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 28, dans laquelle le
10 second peptide en position N-terminale est constitué d'une séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés de l'acide aminé en position 384 à celui en position 743 dans la séquence de la protéine E2 de HCV.

31. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 28, dans laquelle la
15 séquence d'acides aminés délimitée par les acides aminés contigus situés de l'acide aminé en position 384 à celui en position 746 dans la séquence de la protéine E2 de HCV est représentée par la SEQ ID NO: 6.

32. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 28, dans laquelle la
20 séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

33. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 28, dans laquelle la
25 séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

30

34. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 28, dans laquelle la séquence d'acides aminés du second peptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence d'acides aminés contigus de protéine E2, sous réserve que ladite

séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HCV.

35. La protéine de fusion immunogène selon l'une quelconque des revendications 28 à 5 34, dans laquelle le premier et le second peptide sont contigus, ladite protéine de fusion étant constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à 10 former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique dérivée de ladite SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et 15 vis-à-vis du HCV.

36. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 35, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 89% avec SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve 20 la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

37. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 35, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion présente un pourcentage d'identité d'au 25 moins 92% avec SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

38. La protéine de fusion immunogène selon la revendication 35, dans laquelle la 30 séquence d'acides aminés de la protéine de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec SEQ ID NO : 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

39. Molécule d'acides nucléiques hybride codant la protéine de fusion telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 38.

5 **40.** La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 39, constituée d'une première et d'une seconde séquences d'acides nucléiques contigües, dans laquelle molécule l'extrémité 5' de la première séquence d'acides nucléiques est liée de façon covalente à l'extrémité 3' de la seconde séquence d'acides nucléiques.

10 **41.** La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 39 ou 40, codant pour la protéine de fusion, laquelle comprend un peptide d'initiation de transfert situé du côté N-terminal, ladite molécule d'acides nucléiques hybride étant représentée par :

- la SEQ ID NO : 11, ou
- une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins
- 15 78% avec ladite SEQ ID NO : 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et de HBV, ou
- la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID NO : 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve
- 20 la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et de HBV.

42. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 41, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite

25 SEQ ID NO : 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et de HBV.

43. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 41, dans laquelle la

30 séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite SEQ ID NO : 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et de HBV.

44. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 41, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et de HBV.

45. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 39 ou 40, codant pour une protéine de fusion comprenant un peptide d'initiation de transfert situé du côté N-terminal, ladite molécule d'acides nucléiques hybride étant représentée par :

- la SEQ ID NO: 13, ou
- une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et de HBV, ou
- la séquence d'acides nucléiques dérivée d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et de HBV.

46. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 45, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et de HBV.

47. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 45, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et de HBV.

48. La molécule d'acides nucléiques hybride selon la revendication 45, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec ladite

SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques, conserve la capacité à former des particules sous-virales non infectieuses et les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus HCV et de HBV.

5 **49.** Vecteur comprenant la molécule d'acides nucléiques hybride telle que définie dans l'une quelconque des revendications 39 à 48, ainsi que les moyens nécessaires pour son expression.

50. Le vecteur selon la revendication 49, comprenant en outre, un vecteur lentiviral.

10

51. Le vecteur selon la revendication 50, dans lequel le vecteur lentiviral est le vecteur pLenti.

52. Le vecteur selon l'une quelconque des revendications 49 à 51, dans lequel la
15 molécule d'acides nucléiques hybride est constituée:

- de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 11, ou
- d'une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques est une protéine de fusion formant des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV, ou
- de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique dérivé de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques est une protéine de fusion formant des particules sous-virales, non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

25

53. Le vecteur selon la revendication 52, dans lequel la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques est une protéine de fusion formant des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

30

54. Le vecteur selon la revendication 52, dans lequel la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques est une protéine de

fusion formant des particules sous-virales, non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

5 **55.** Le vecteur selon la revendication 52, dans lequel la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques est une protéine de fusion formant des particules sous-virales, non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

10 **56.** Le vecteur selon la revendication 52, dans lequel le vecteur est représenté par la SEQ ID NO: 15.

57. Le vecteur selon l'une quelconque des revendications 49 à 51, dans lequel la molécule d'acides nucléiques hybride est constituée :

- 15 - de la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 13, ou
- d'une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide formant des particules sous-virales, non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et HCV, ou
- 20 - de la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques est un peptide formant des particules sous-virales, non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et HCV.

25 **58.** Le vecteur selon la revendication 57, dans lequel la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide formant des particules sous-virales non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et HCV.

30

59. Le vecteur selon la revendication 57, dans lequel la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide formant des

particules sous-virales non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et HCV.

5 **60.** Le vecteur selon la revendication 57, dans lequel la séquence d'acides nucléiques présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que ladite séquence d'acides nucléiques code pour un peptide formant des particules sous-virales non infectieuses et ayant les propriétés immunogènes vis-à-vis du virus de HBV et HCV.

10 **61.** Le vecteur selon l'une quelconque des revendications 49 à 60 comprenant la séquence d'acide nucléique définie par la séquence SEQ ID NO : 16.

62. Particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, comprenant les protéines suivantes :

- 15 - une protéine constituée de la protéine S sauvage de l'antigène de surface d'un isolat du HBV, et
- au moins la protéine de fusion immunogène telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 38.

20 **63.** Particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, comprenant les protéines suivantes :

- une protéine constituée de la protéine S sauvage de l'antigène de surface d'un isolat du HBV et au moins une protéine de fusion immunogène, dans laquelle la au moins une protéine de fusion immunogène, est constituée par :
- 25 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV, ou
- 30 - la séquence d'acides aminés d'un variant naturel issue d'un isolat du virus HCV et/ou du virus HBV ou d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

64. Particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, comprenant les protéines suivantes :

- une protéine constituée de la protéine S sauvage de l'antigène de surface d'un isolat du HBV et au moins une protéine de fusion immunogène, dans laquelle la au moins une protéine de fusion immunogène est constituée par :
 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou
 - une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
 - la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

65. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 62, comprenant deux protéines de fusion soit :

- * l'une constituée par :
 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou
 - une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite SEQ ID NO: 8 code pour une protéine qui conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
 - la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite SEQ ID NO: 8 code pour une protéine qui conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV ; et
- * l'autre constituée par :
 - la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou
 - une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86% avec ladite SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve

la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

66. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 63 ou 65, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la au moins une protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

67. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 63 ou 65, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la au moins une protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 92% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

68. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 63 ou 65, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la au moins une protéine de fusion ou de de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

69. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 64 ou 65, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la au moins une protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

70. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 64 ou 65, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la au moins une protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 92% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

71. La particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse selon la revendication 64 ou 65, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la au moins une protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

72. Composition immunogène comprenant comme substance active au moins:

- la protéine de fusion telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 38,
- la molécule d'acides nucléiques hybride telle que définie dans l'une quelconque des revendications 39 à 48,
- le vecteur tel que défini dans l'une quelconque des revendications 49 à 61, comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride, ou
- la particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse telle que définie dans l'une quelconque des revendications 62 à 71 ;

et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

73. La composition immunogène selon la revendication 72, dans laquelle la substance active est:

a)- la protéine de fusion, celle-ci étant constituée par :

- * la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou
- * une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

- * la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
- 5 b)- la molécule d'acides nucléiques hybride, celle-ci étant constituée par :
 - * la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 11, ou
 - * une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
 - 10 * la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
- 15 c)- le vecteur, celui-ci comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride de b); ou
- d)- la particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, celle-ci comprenant ladite protéine de fusion immunogène de a).

74. La composition immunogène selon la revendication 72, dans laquelle la substance
20 active est:

- a)- la protéine de fusion, celle-ci étant constituée par :
 - * la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou
 - * une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
 - 25 * la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou
 - 30 du HCV, ou
- b)- la molécule d'acides nucléiques hybride, celle-ci étant constituée par :
 - * la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 13, ou
 - * une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence

d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

* la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

c)- le vecteur, celui-ci comprenant ladite molécule d'acides nucléiques hybride de b) ; ou

d)- la particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, celle-ci comprenant ladite protéine de fusion immunogène de a).

10

75. La composition immunogène selon la revendication 72, dans laquelle la substance active est la particule sous-virale, chimère, immunogène et non infectieuse, comprenant au moins deux protéines de fusion immunogènes soit :

* l'une constituée par :

15

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

20

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV ; et

* l'autre constituée par :

25

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

30

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV.

76. La composition immunogène selon la revendication 72, dans laquelle la substance active est constituée d'un mélange comprenant :

(A) - au moins deux protéines de fusion soit :

5 * l'une constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV ; et

15 * l'autre constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou

- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV, ou

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis du HBV et vis-à-vis du HCV; ou

25 (B) - au moins deux molécules d'acides nucléiques hybrides suivantes :

* l'une constituée par :

- la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 11, ou

- une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 78% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV, ou

- la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivé de ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques

conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV, ou

un vecteur comprenant ladite première molécule d'acides nucléiques hybride ; et

* l'autre constituée par :

- 5 - la séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 13, ou
- une séquence d'acides nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV, ou

- 10 - la séquence d'acides nucléiques d'un variant synthétique, dérivé de ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV,
- ou un vecteur comprenant ladite seconde molécule d'acides nucléiques hybride ; ou

- 15 (C) - au moins deux particules sous-virales chimères, soit:

* l'une comprenant la protéine de fusion immunogène constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 8, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la
- 20 capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV, ou

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis
- 25 de HBV; et

* l'autre comprenant la protéine de fusion immunogène constituée par :

- la séquence d'acides aminés représentée par la SEQ ID NO: 10, ou
- une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 86%, avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à
- 30 former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV, ou

- la séquence d'acides aminés d'un variant synthétique, dérivée de la SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules

sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

77. La composition immunogène selon l'une quelconque des revendication 73, 75 et 76, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

10

78. La composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 73, 75 et 76, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 92% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

15

79. La composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 73, 75 et 76, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec ladite SEQ ID NO: 8, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

20

80. La composition immunogène selon la revendication 73 ou 76, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride ou de l'une des molécules d'acides nucléiques hybrides présente un pourcentage d'identité d'au moins 80% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

25

30

81. La composition immunogène selon la revendication 73 ou 76, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride ou de l'une des molécules d'acides nucléiques hybrides présente un pourcentage d'identité d'au moins 85%

avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

5 **82.** La composition immunogène selon la revendication 73 ou 76, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride ou de l'une des molécules d'acides nucléiques hybrides présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence SEQ ID NO: 11, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses
10 et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

83. La composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 74, 75 et 76, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 88% avec SEQ ID NO: 10,
15 sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

84. La composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 74, 75 et
20 76, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

25

85. La composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 74, 75 et 76, dans laquelle la séquence d'acides aminés de la protéine de fusion ou de l'une des protéines de fusion présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec SEQ ID NO: 10, sous réserve que ladite séquence d'acides aminés conserve la capacité à former des particules
30 sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et vis-à-vis de HBV.

86. La composition immunogène selon la revendication 74 ou 76, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride ou de l'une des molécules d'acides nucléiques hybrides présente un pourcentage d'identité d'au moins 85% avec ladite séquence SEQ ID NO: 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

87. La composition immunogène selon la revendication 74 ou 76, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride ou de l'une des molécules d'acides nucléiques hybrides présente un pourcentage d'identité d'au moins 90% avec ladite séquence SEQ ID NO : 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

88. La composition immunogène selon la revendication 74 ou 76, dans laquelle la séquence d'acides nucléiques de la molécule d'acides nucléiques hybride ou de l'une des molécules d'acides nucléiques hybrides présente un pourcentage d'identité d'au moins 95% avec ladite séquence SEQ ID NO : 13, sous réserve que la protéine codée par ladite séquence d'acides nucléiques conserve la capacité à former des particules sous-virales, non infectieuses et a les propriétés immunogènes vis-à-vis de HCV et HBV.

89. Utilisation de la composition immunogène telle que définie dans l'une quelconque des revendications 72 à 88, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement et/ou la prévention de l'hépatite C.

90. Utilisation de la composition immunogène telle que définie dans l'une quelconque des revendications 72 à 88, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement et/ou la prévention de l'hépatite B.

91. Utilisation de la composition immunogène telle que définie dans l'une quelconque des revendications 72 à 88, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement et/ou la prévention de l'hépatite B et de l'hépatite C.

92. Lignée cellulaire qui exprime les particules sous virales chimères, immunogènes non infectieuses telles que définies dans l'une quelconque des revendications 62 à 71.

93. La lignée cellulaire selon la revendication 92, laquelle est la lignée d'ovaire de
5 hamster chinois CHO.

94. La lignée cellulaire selon la revendication 92, laquelle est une levure.

95. La lignée cellulaire selon la revendication 94, dans laquelle la levure est
10 *Saccharomyces Cerevisiae*.

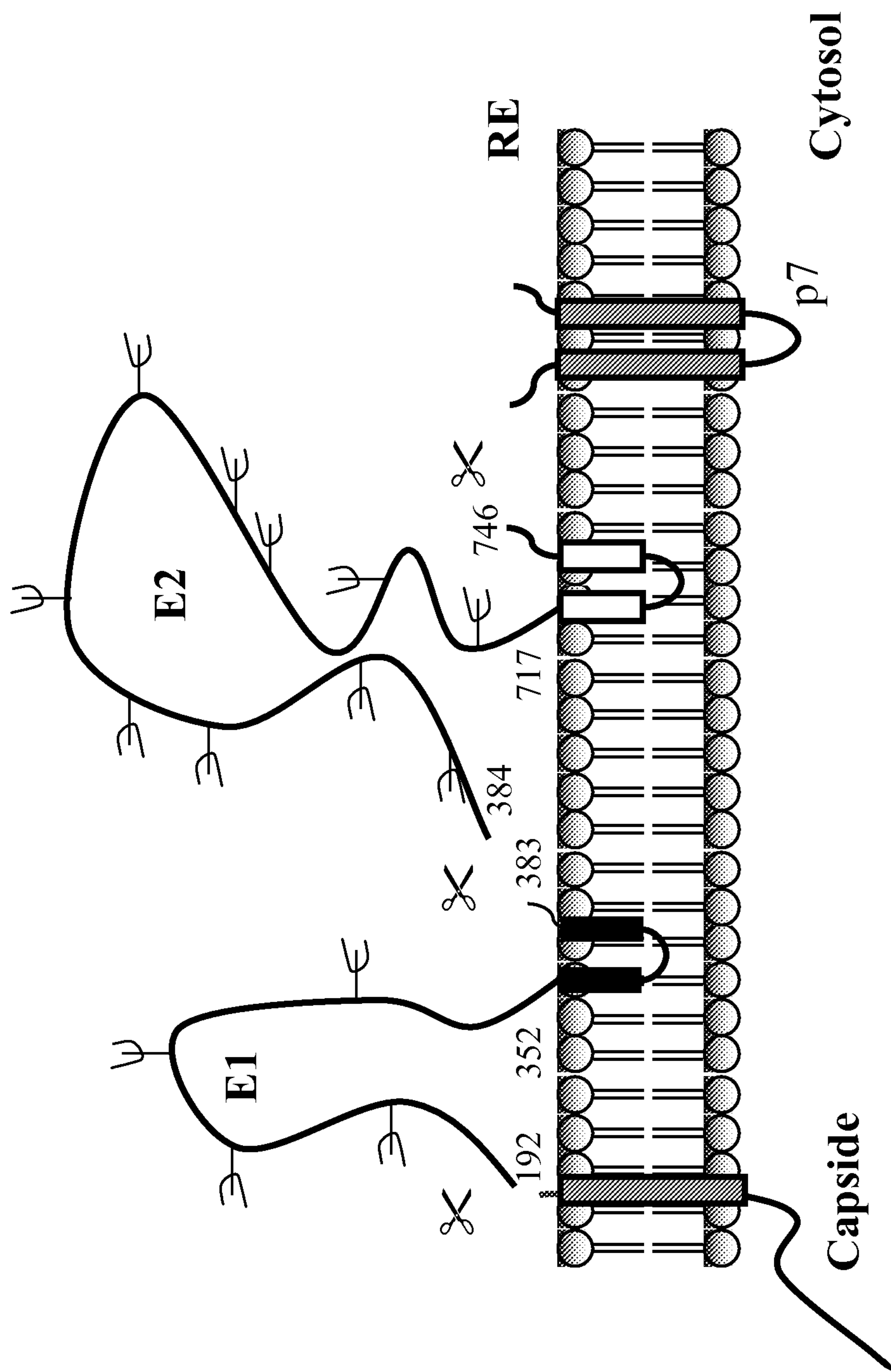
FIGURE 1

FIGURE 2B

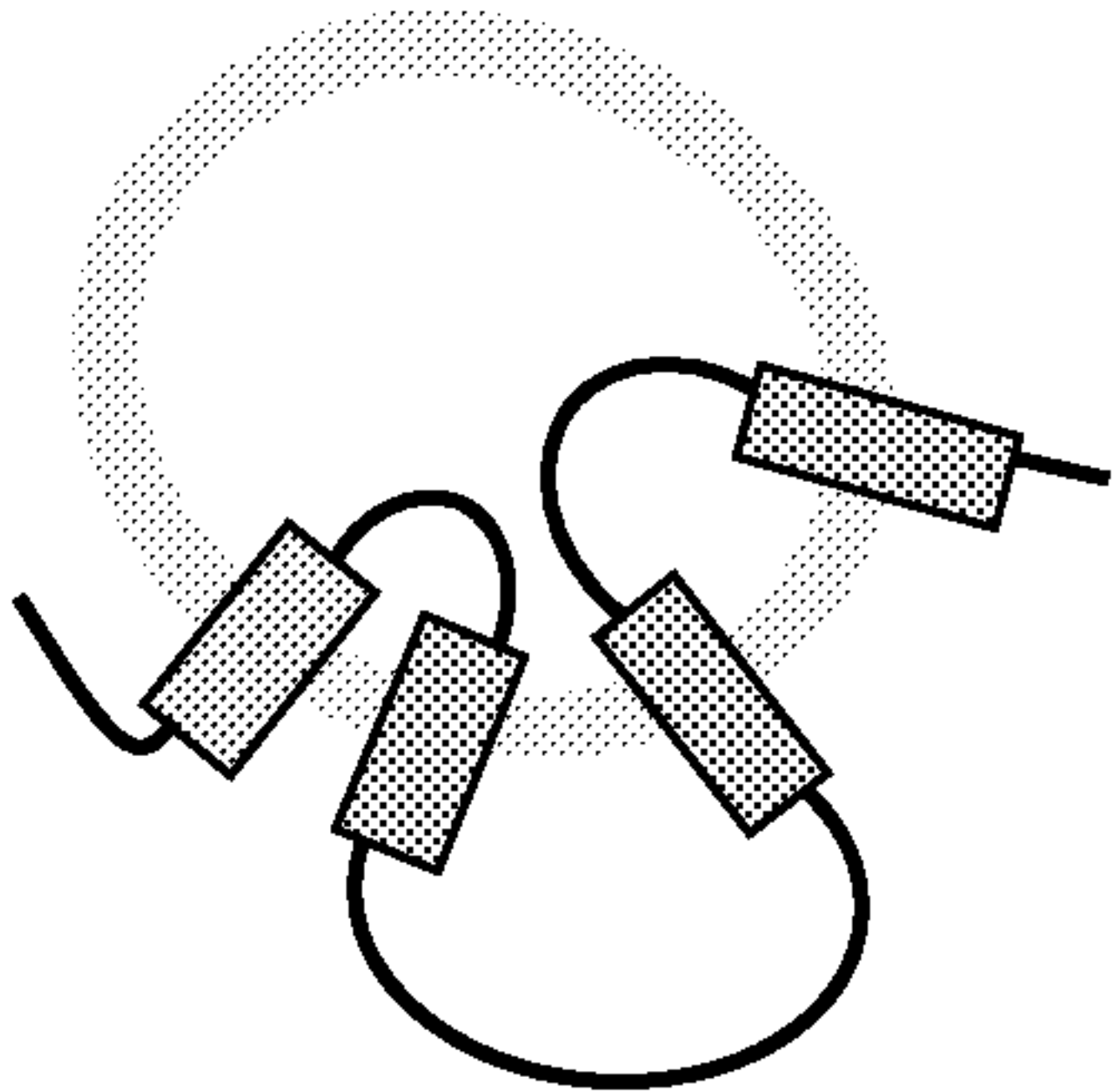


FIGURE 2A

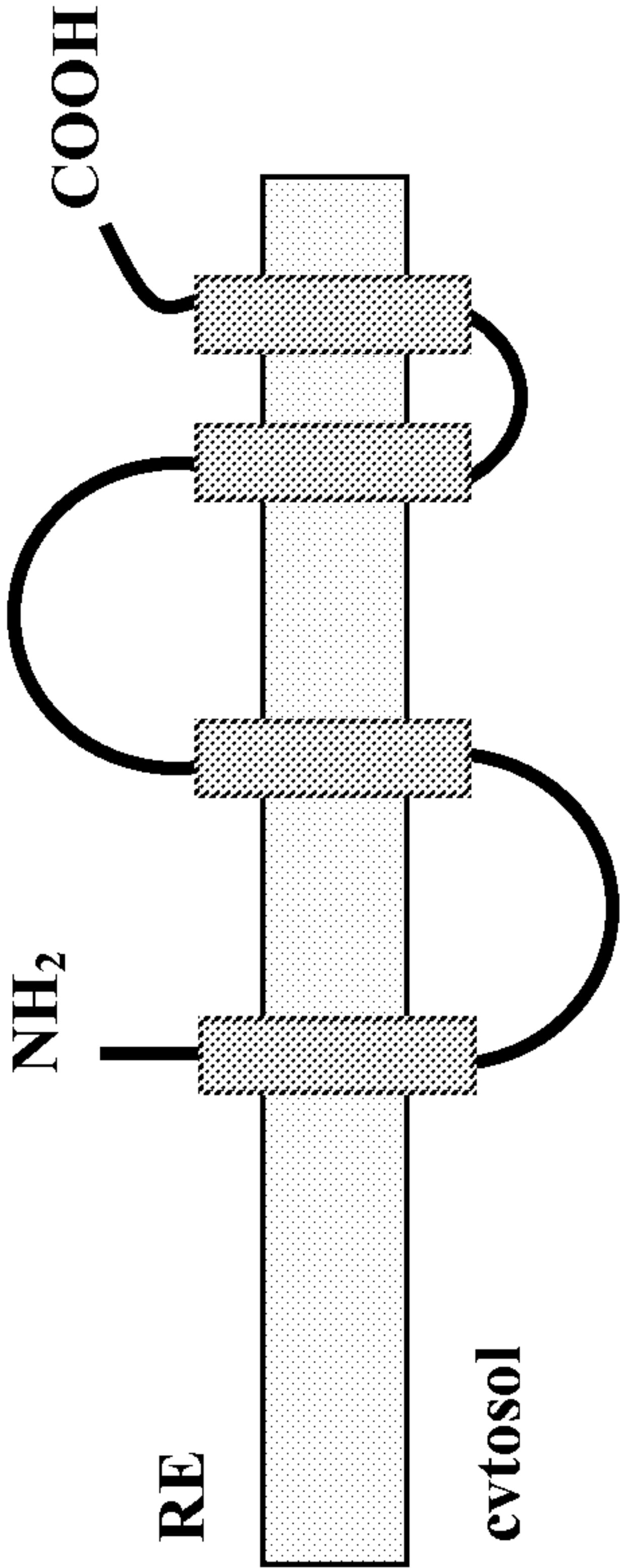


FIGURE 3A

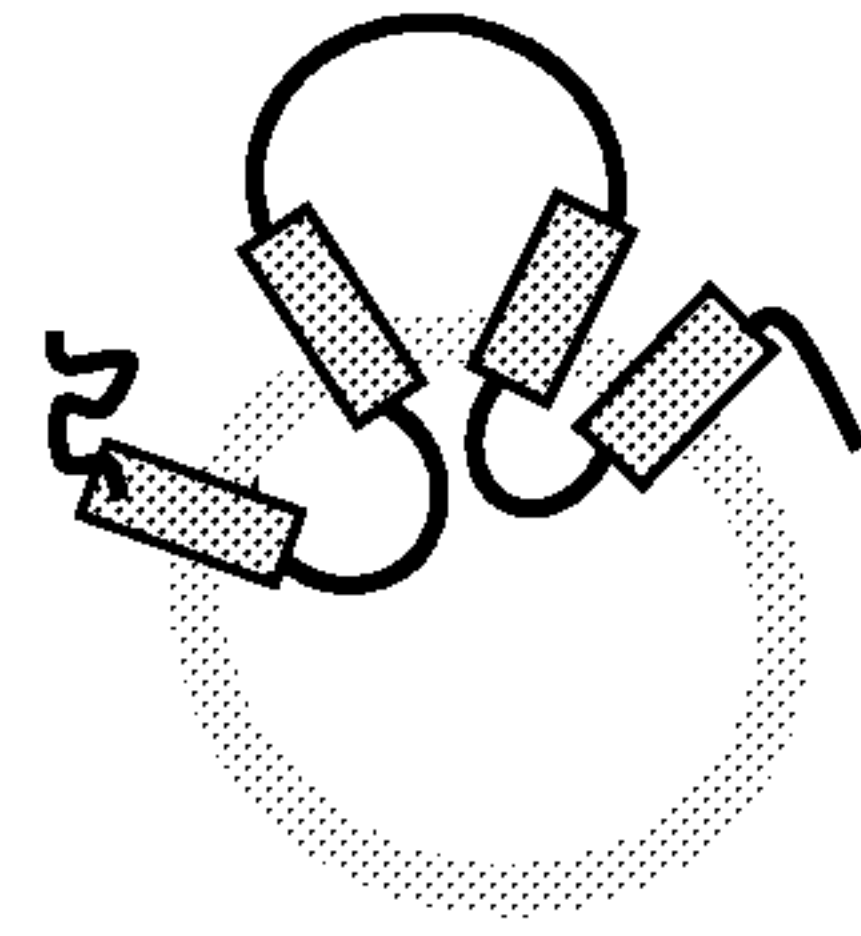
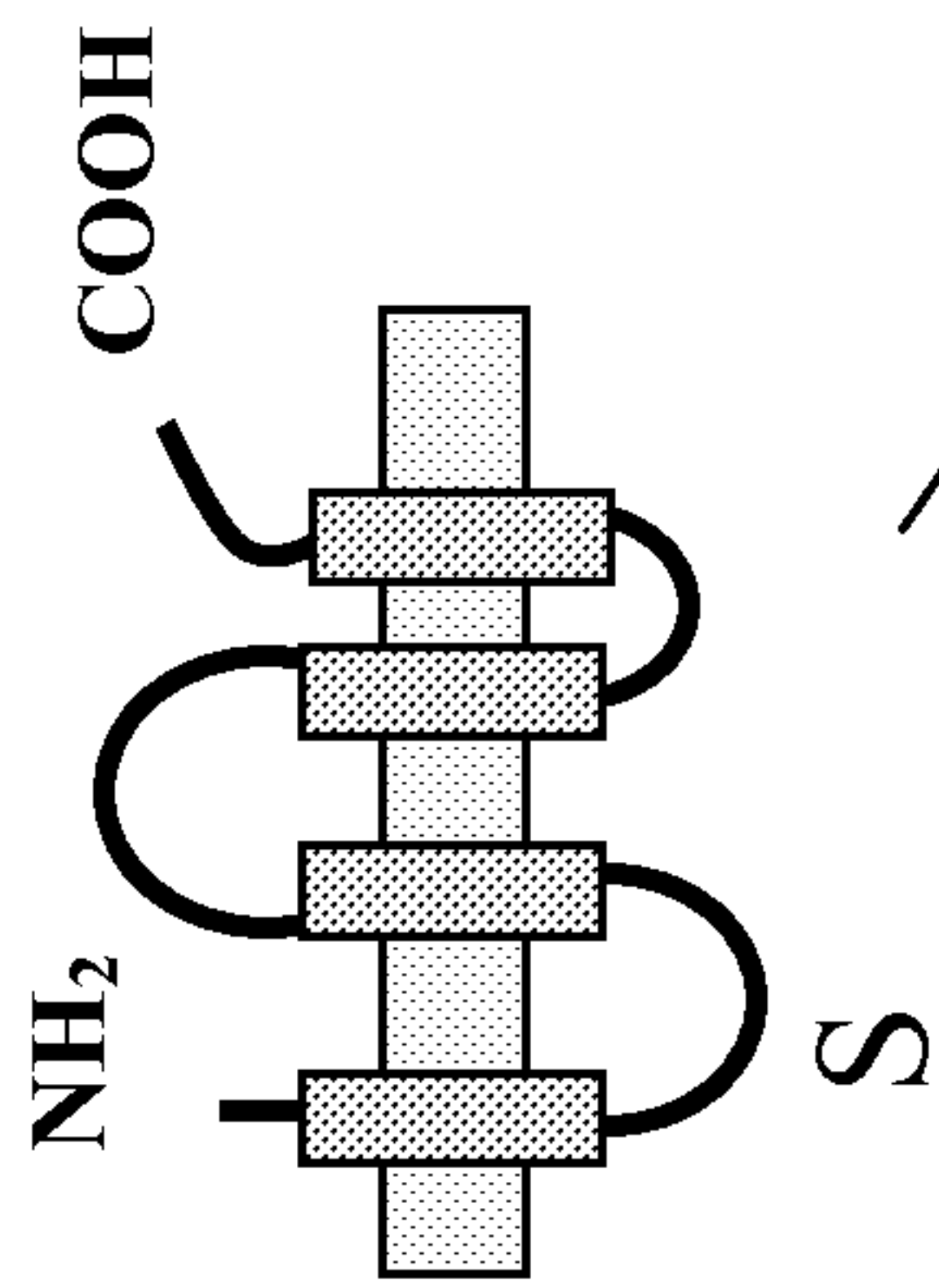


FIGURE 3B

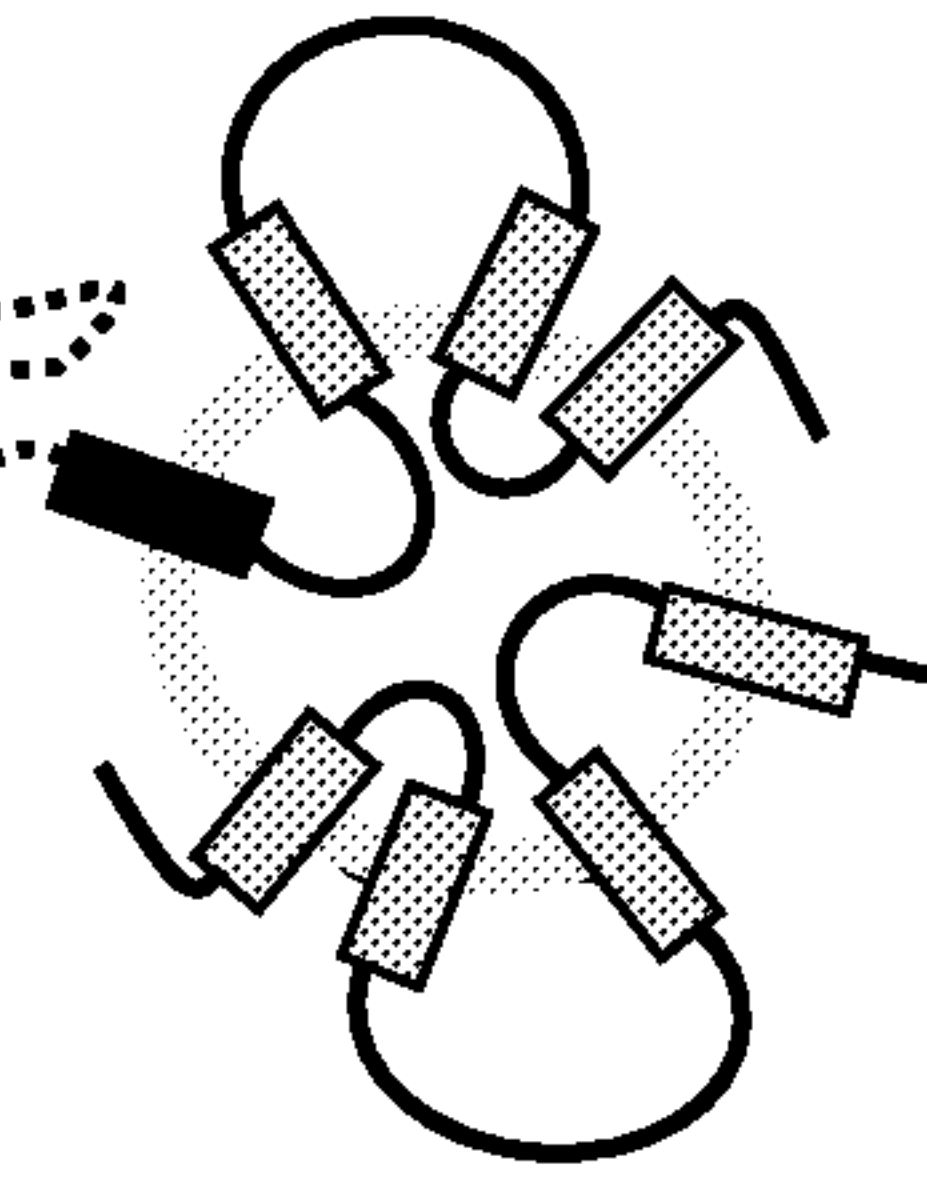
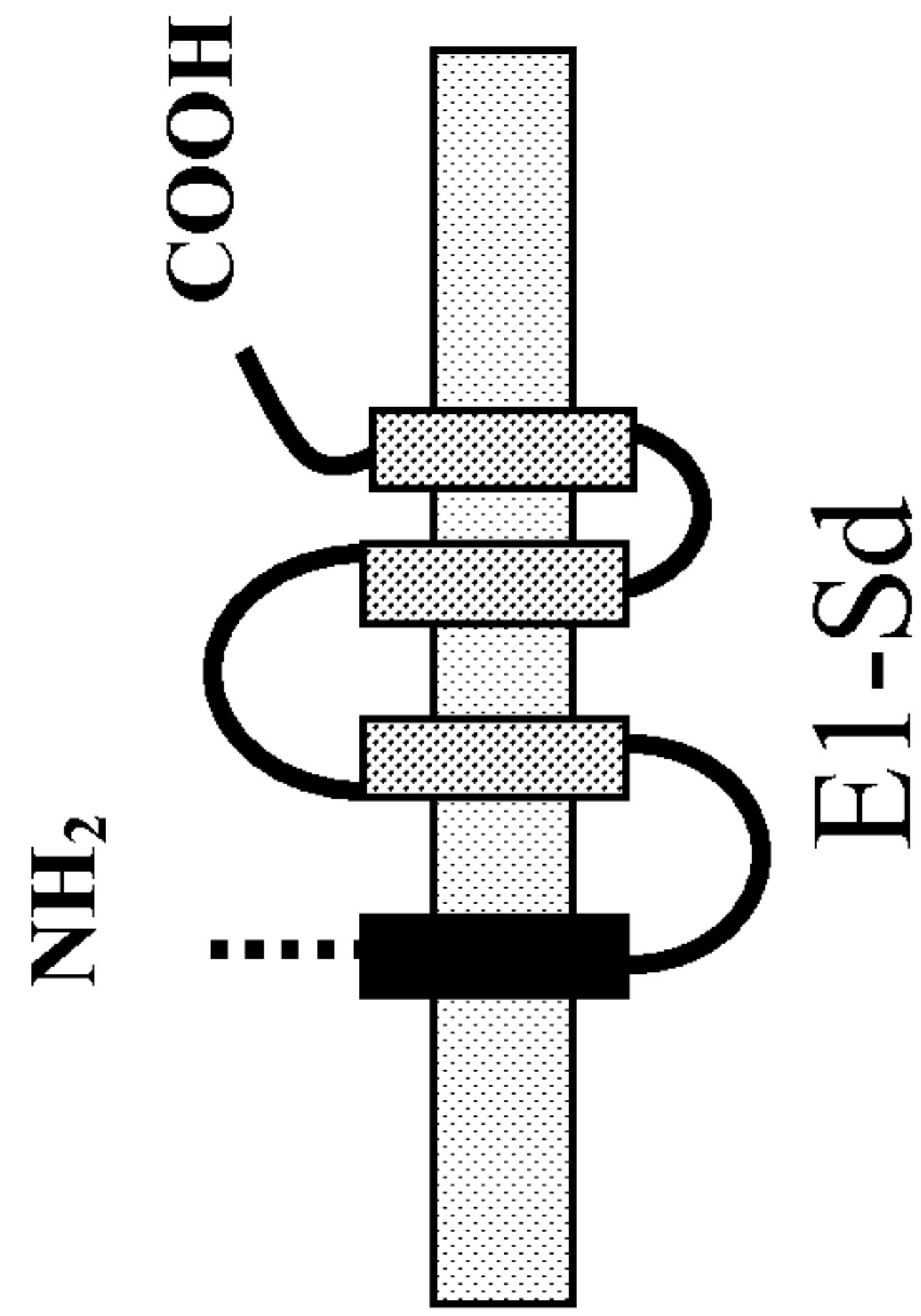


FIGURE 3C

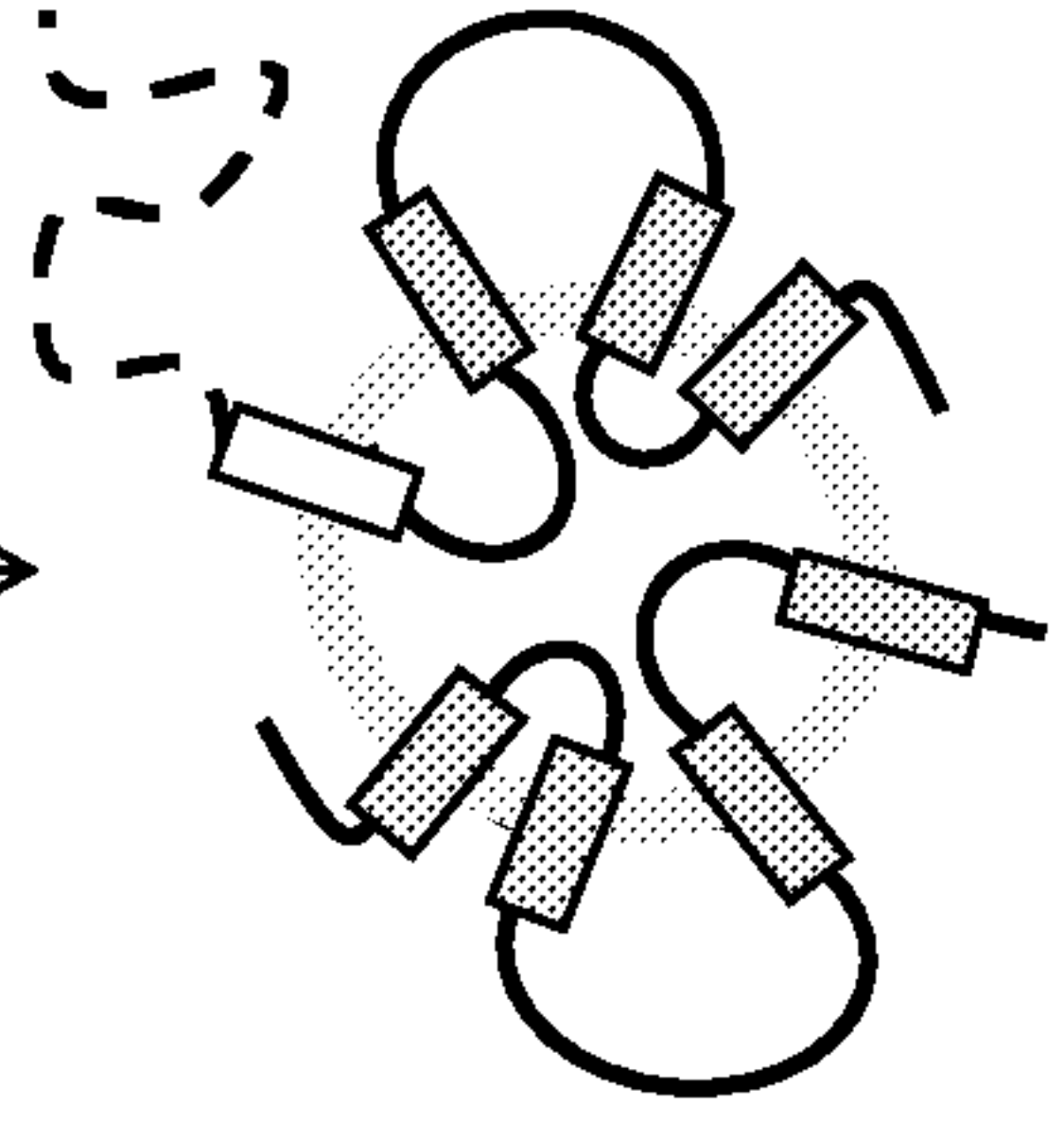
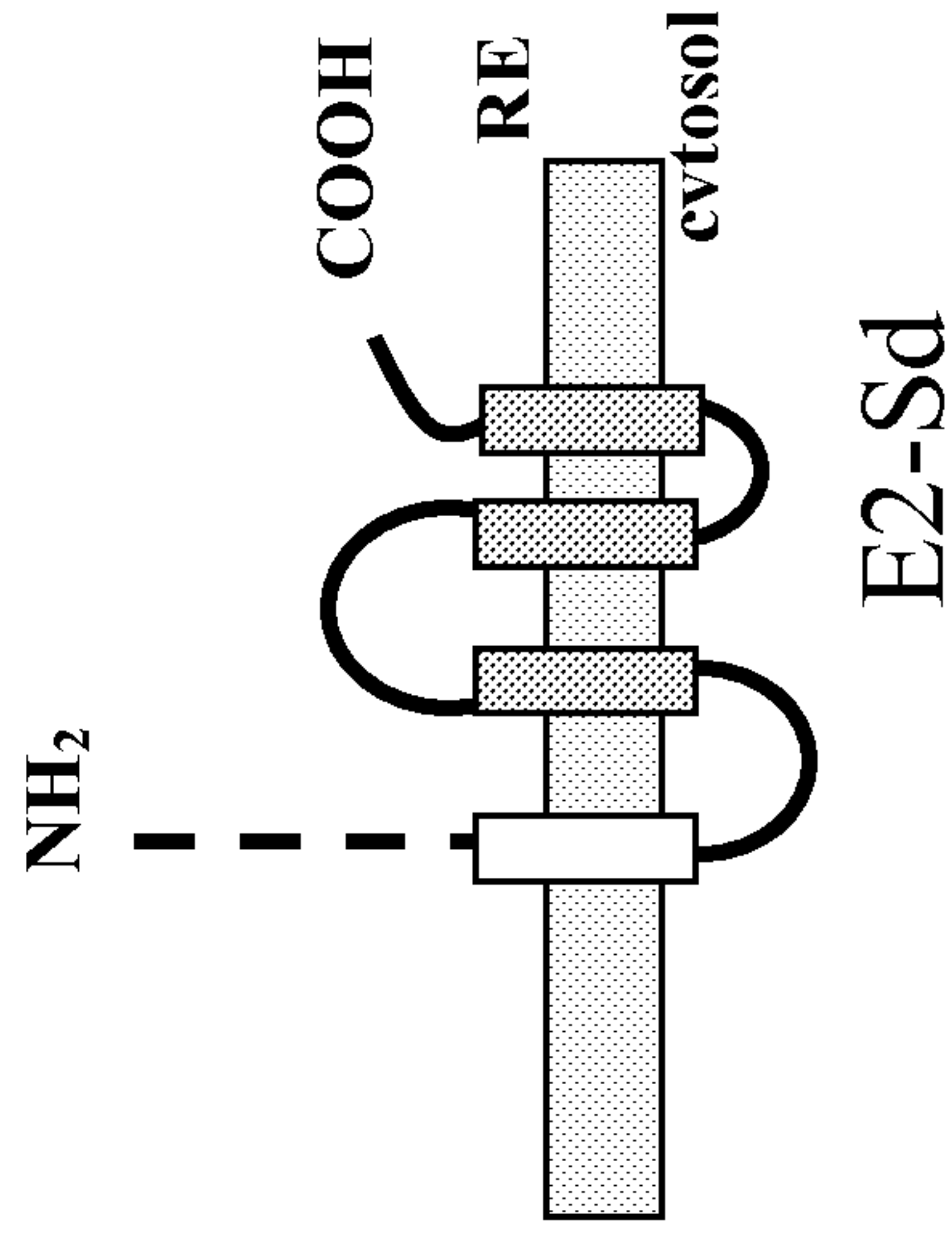
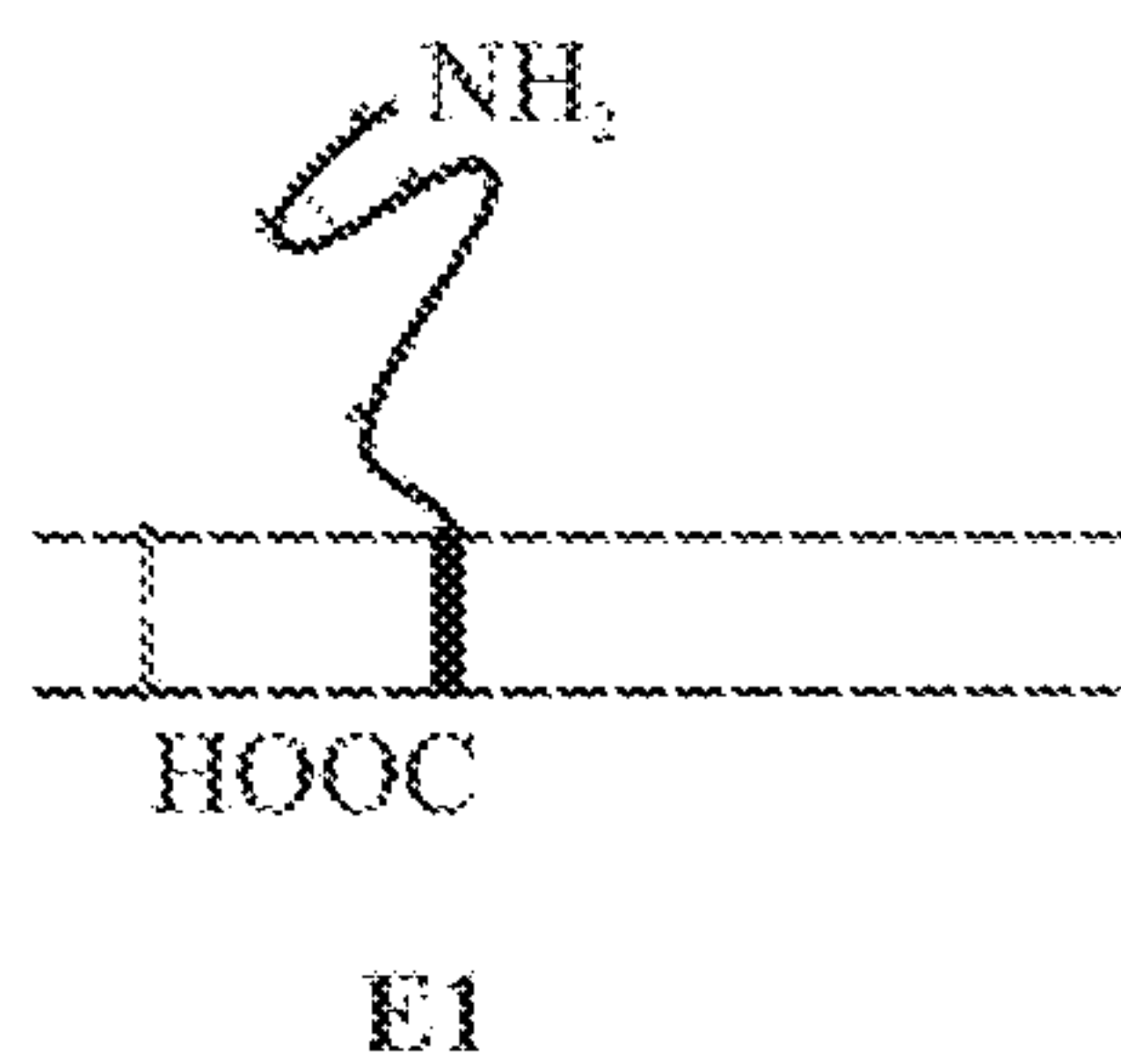
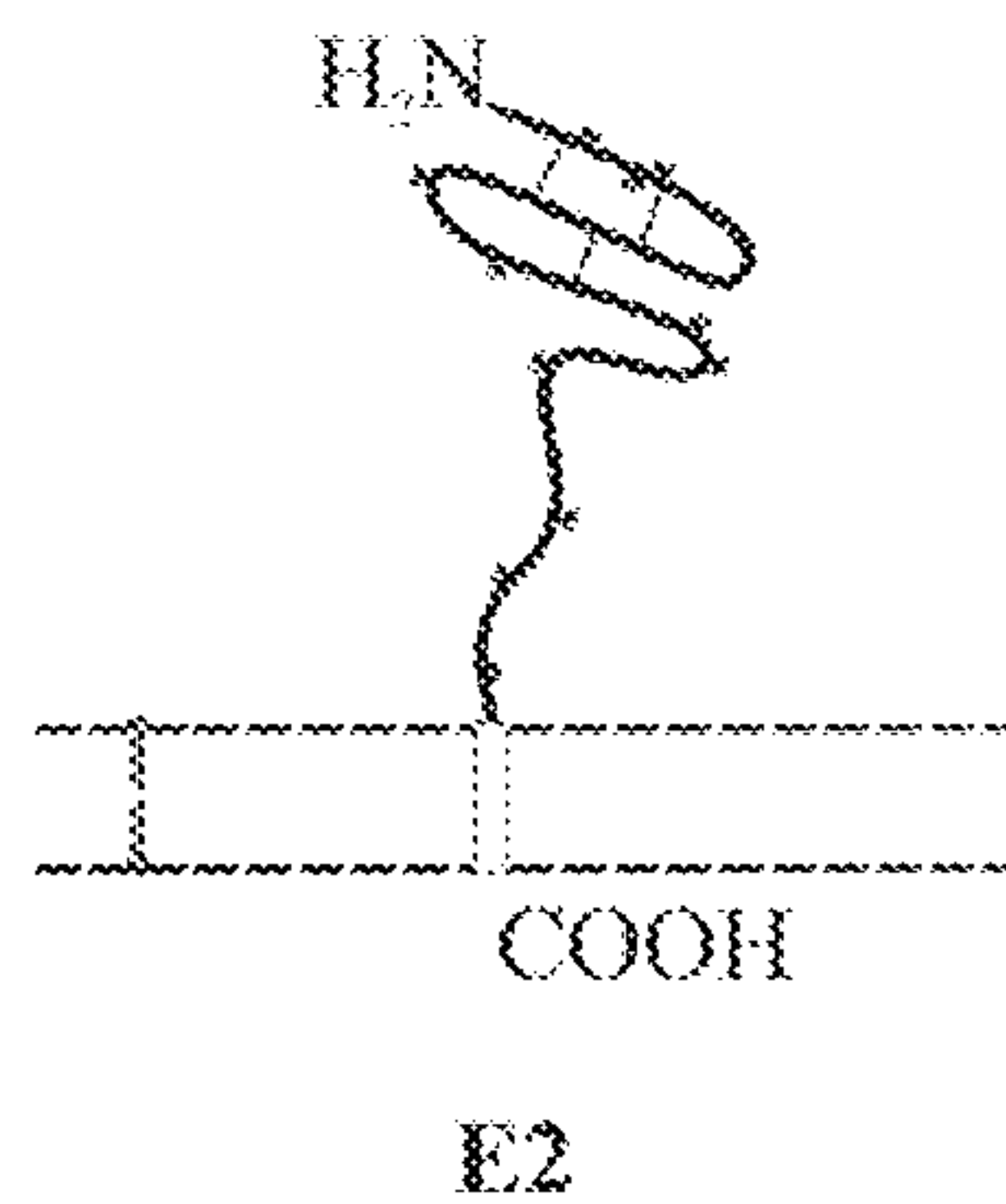
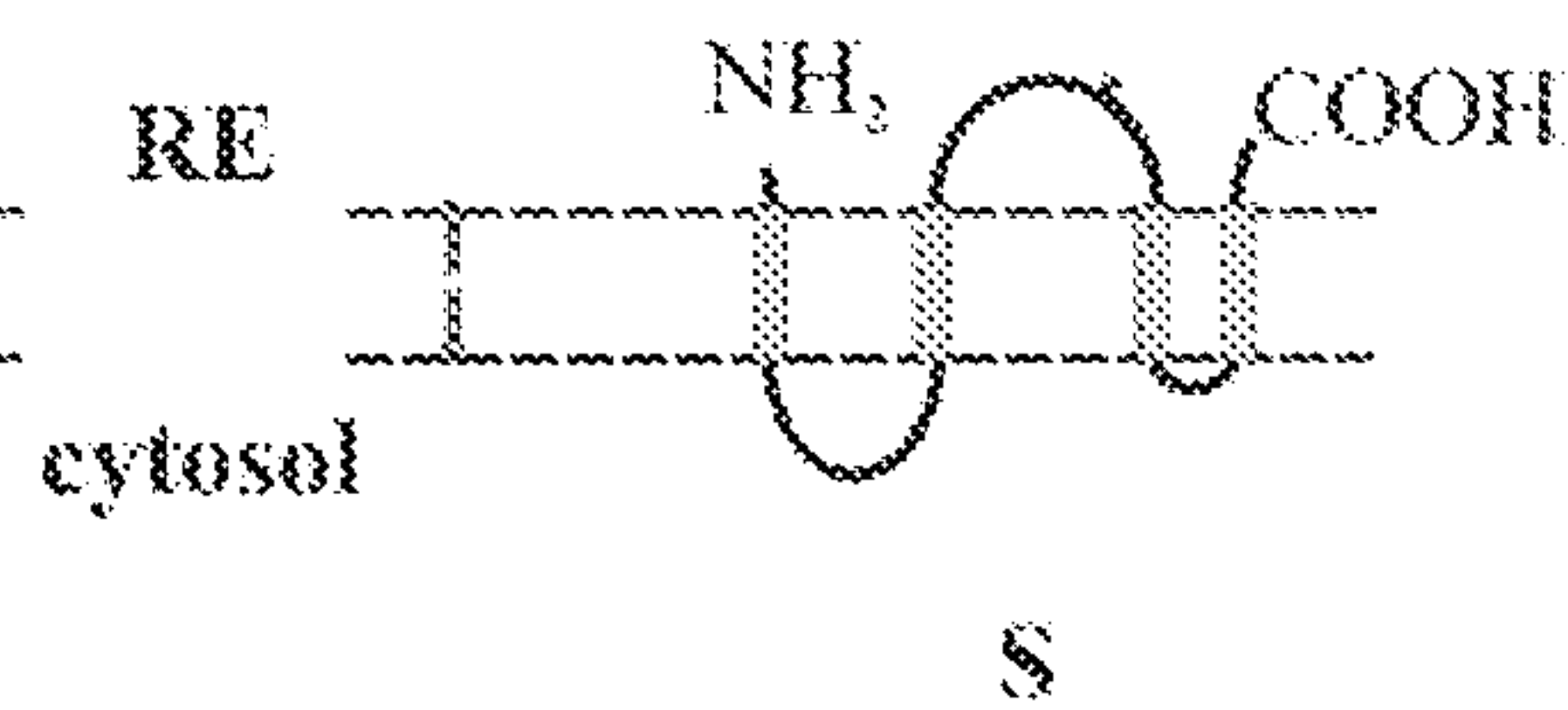
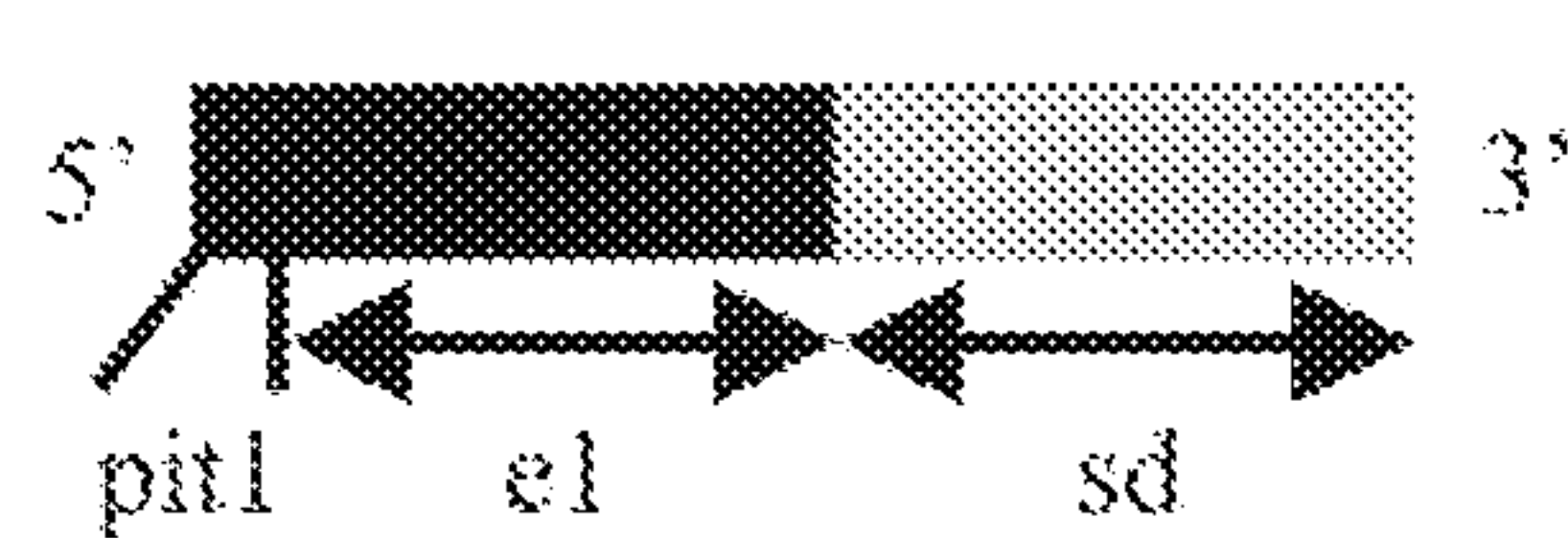
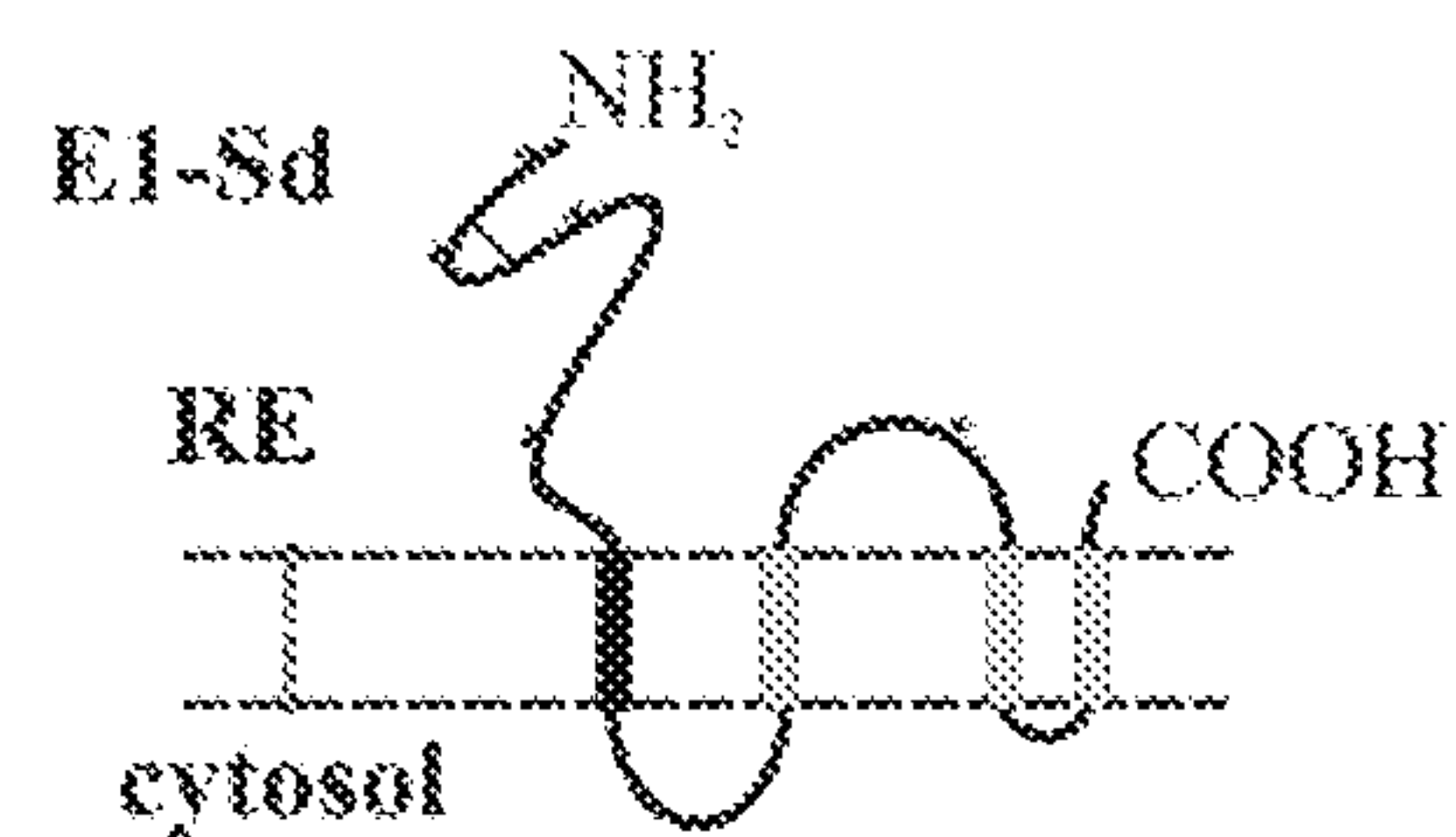


FIGURE 4A**FIGURE 4B****FIGURE 4C****FIGURE 4D**

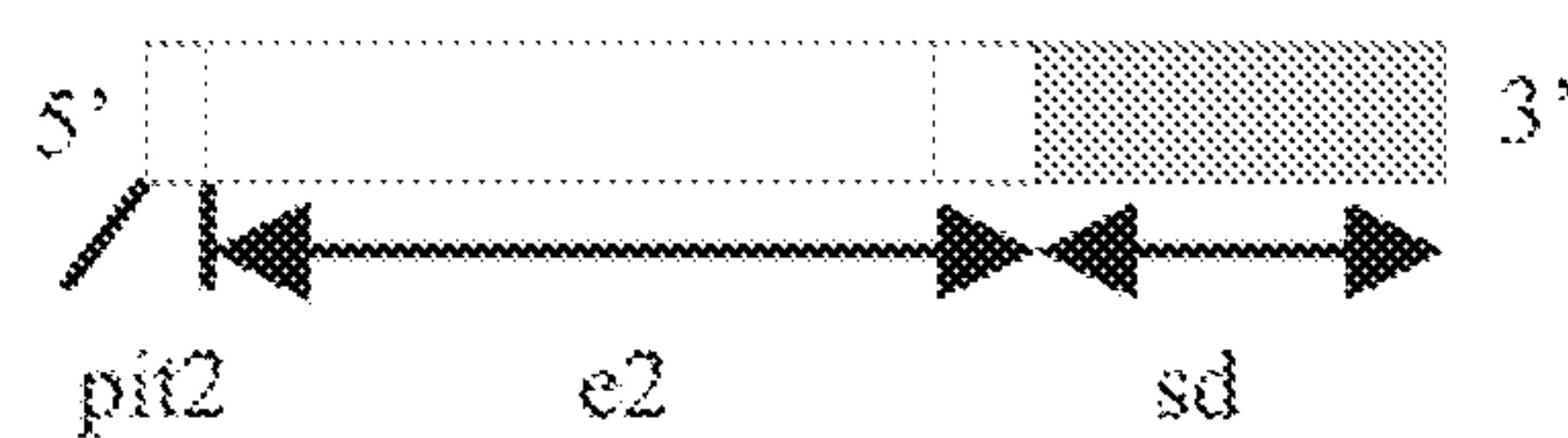
ADNe pit1-e1-sd



production

**FIGURE 4E**

ADNe pit2-e2-sd



production

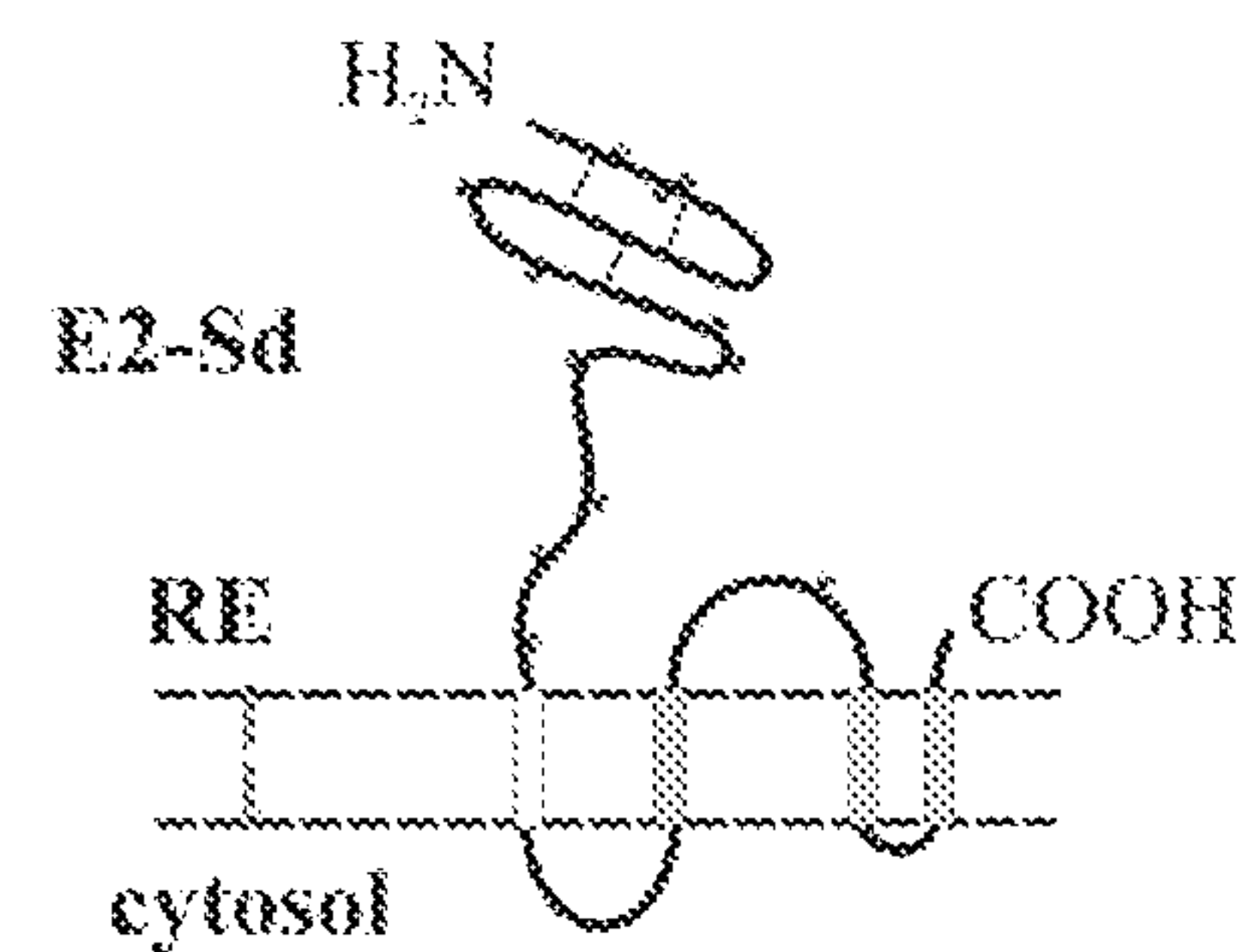


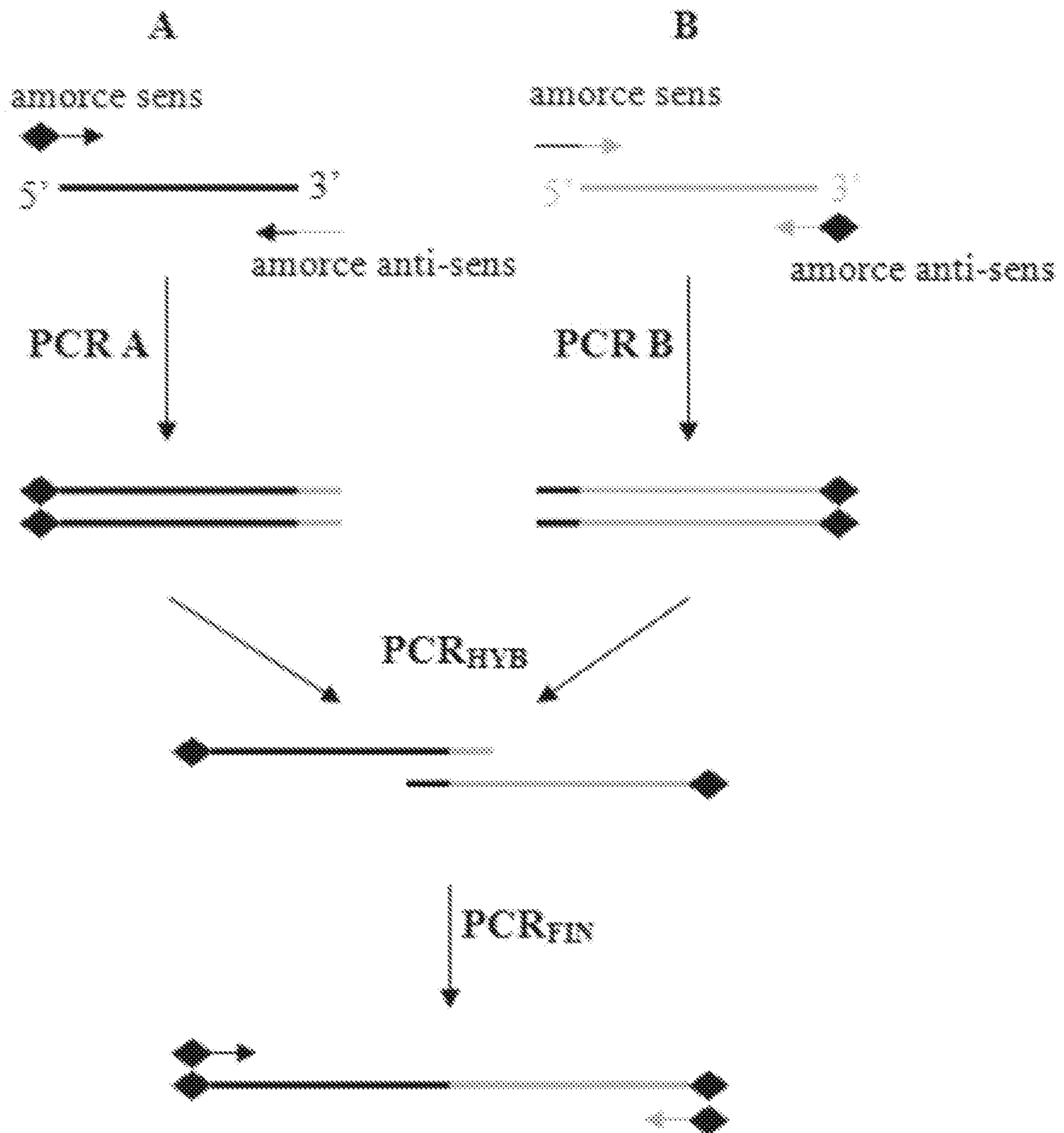
FIGURE 5

FIGURE 6A

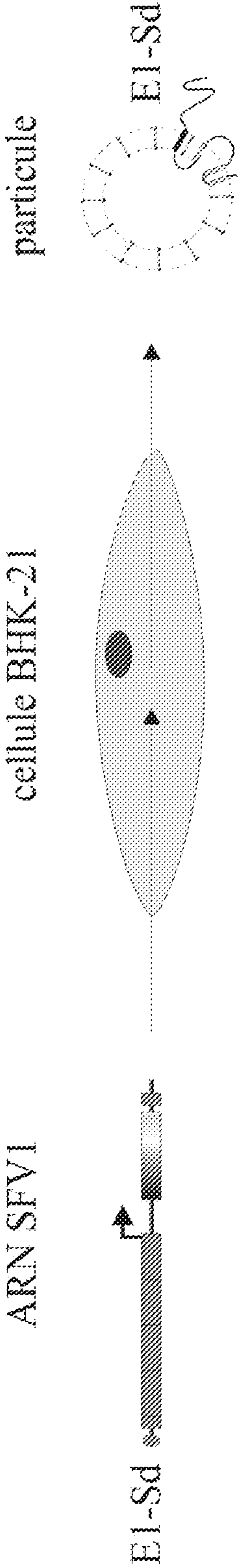


FIGURE 6B

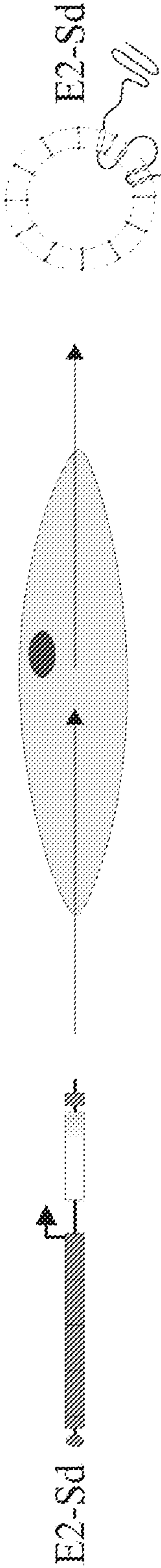


FIGURE 6D

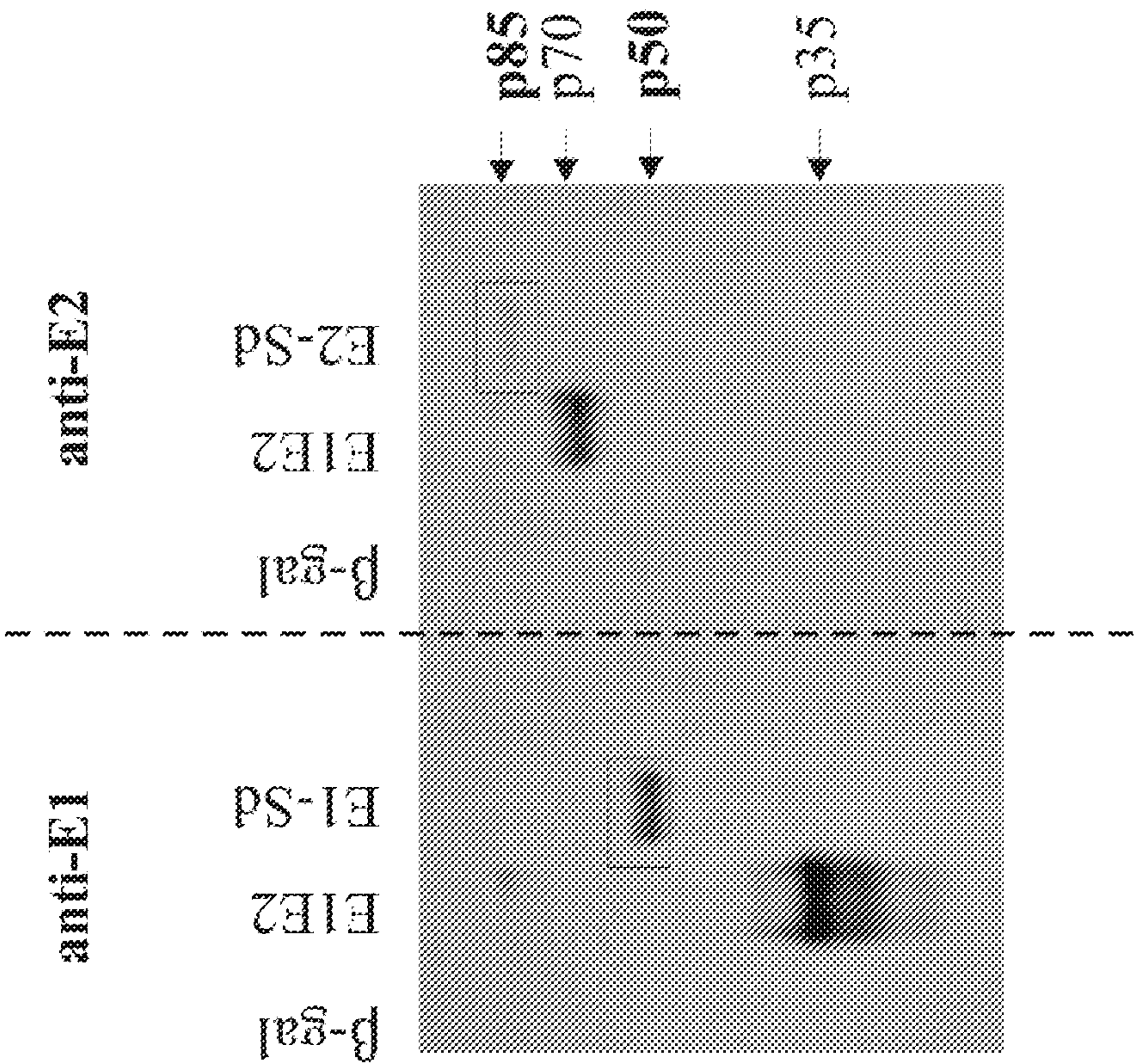


FIGURE 6C

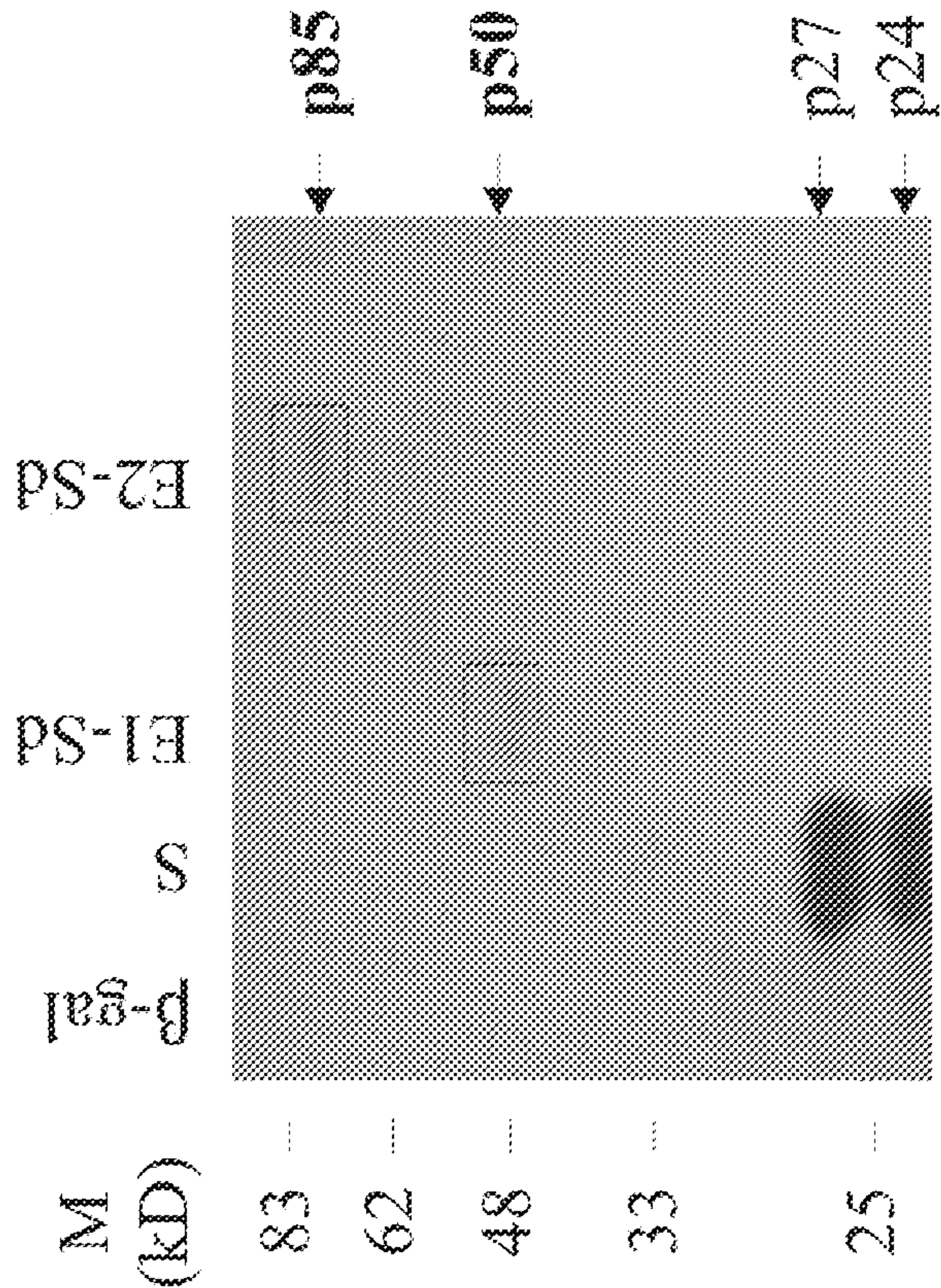


FIGURE 7A

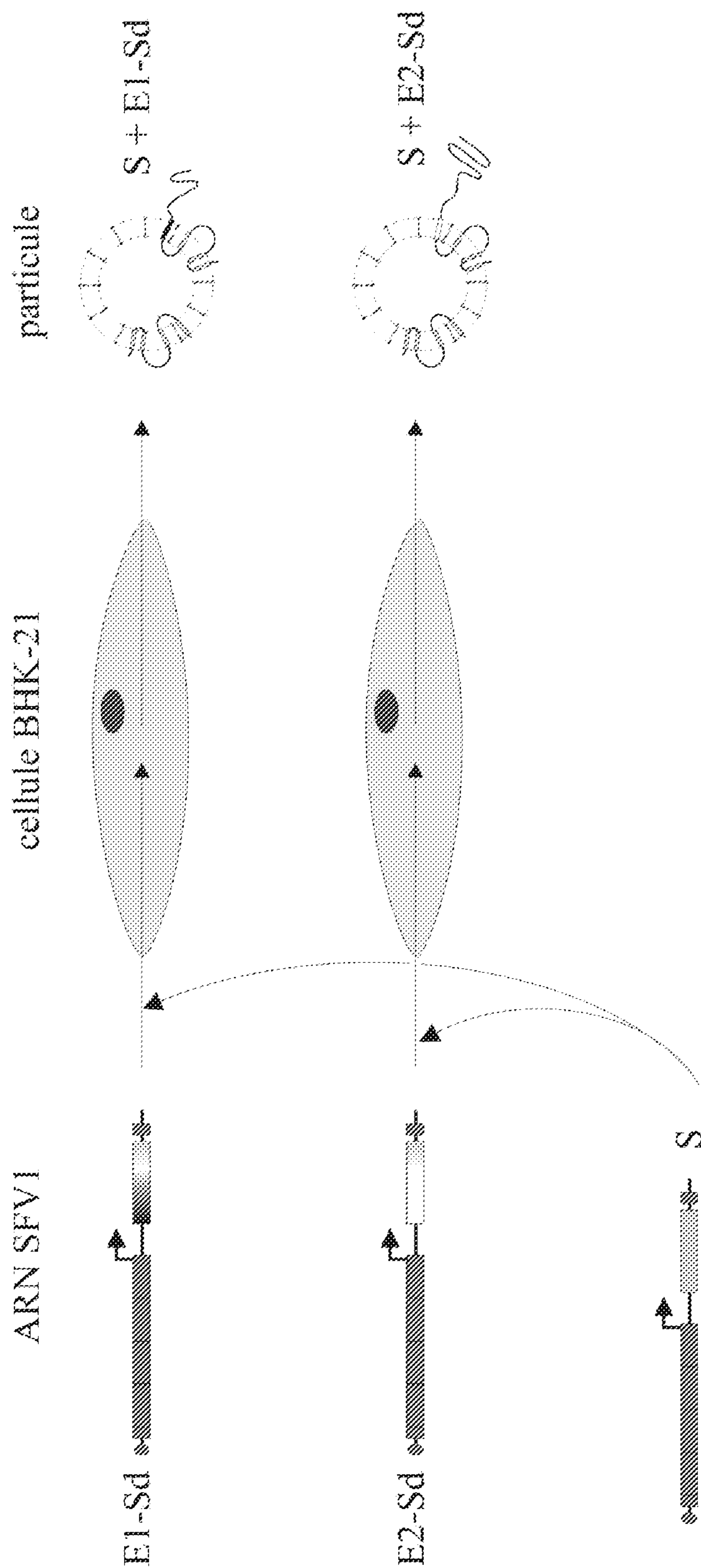


FIGURE 7B

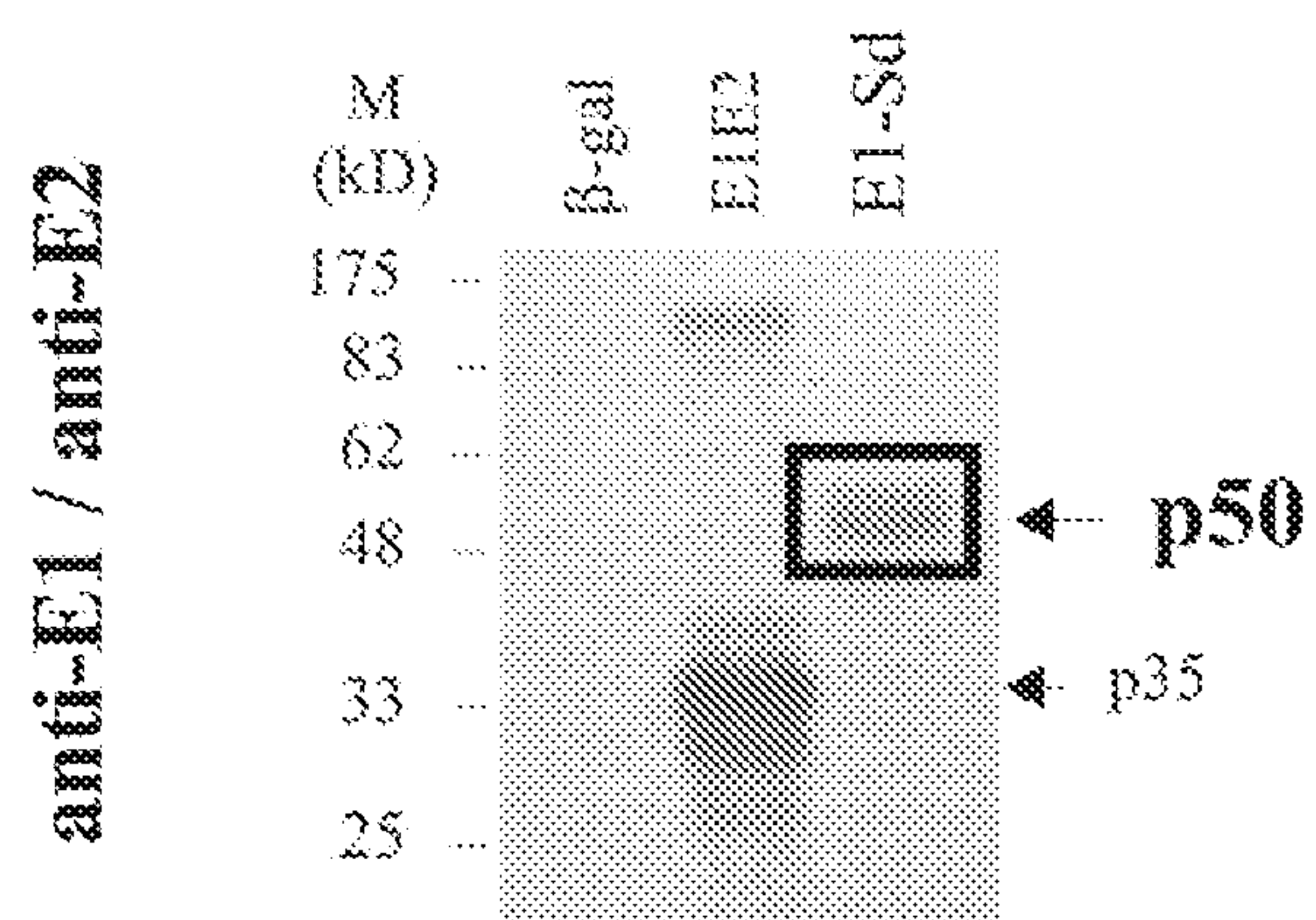


FIGURE 7E

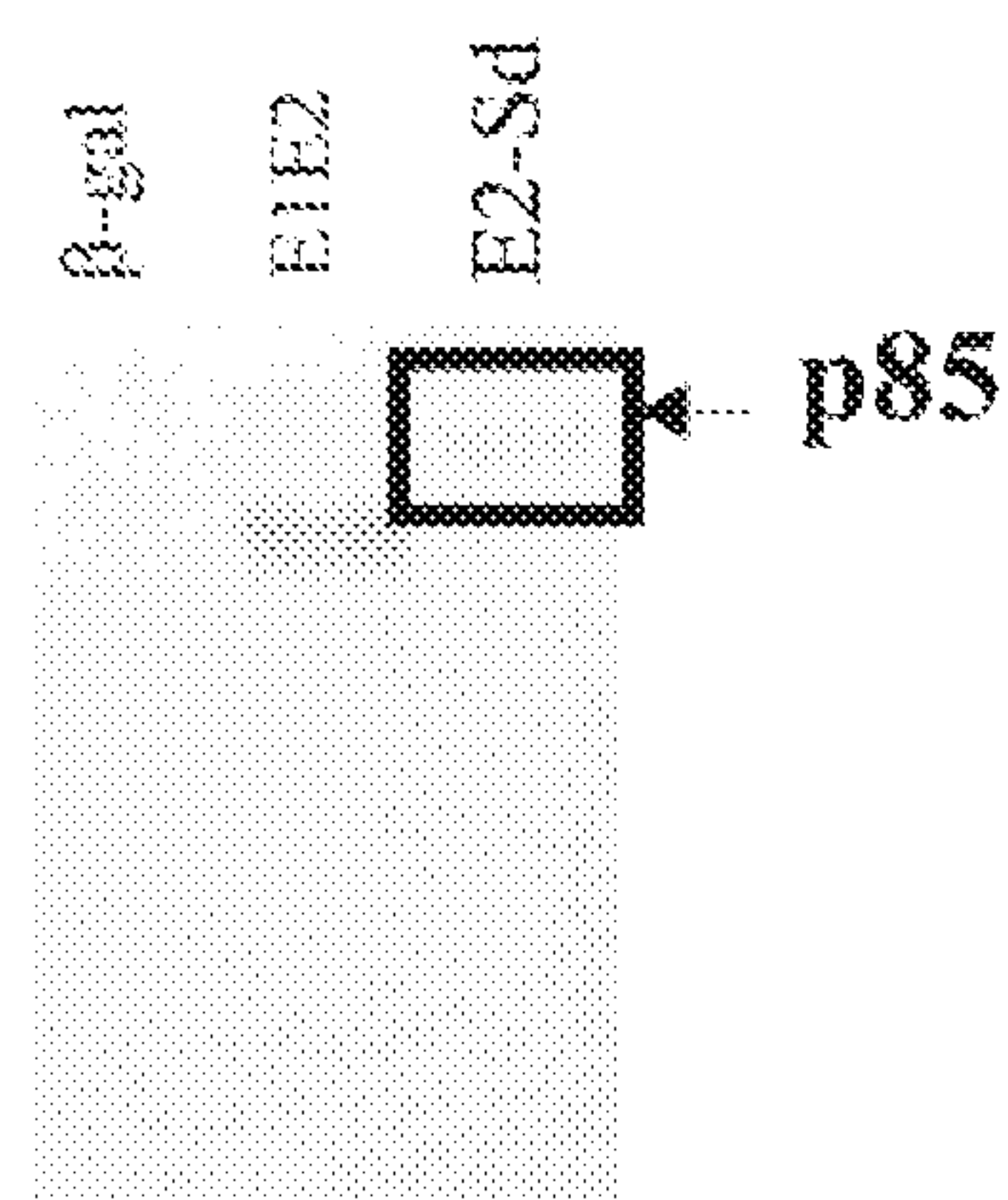


FIGURE 7C

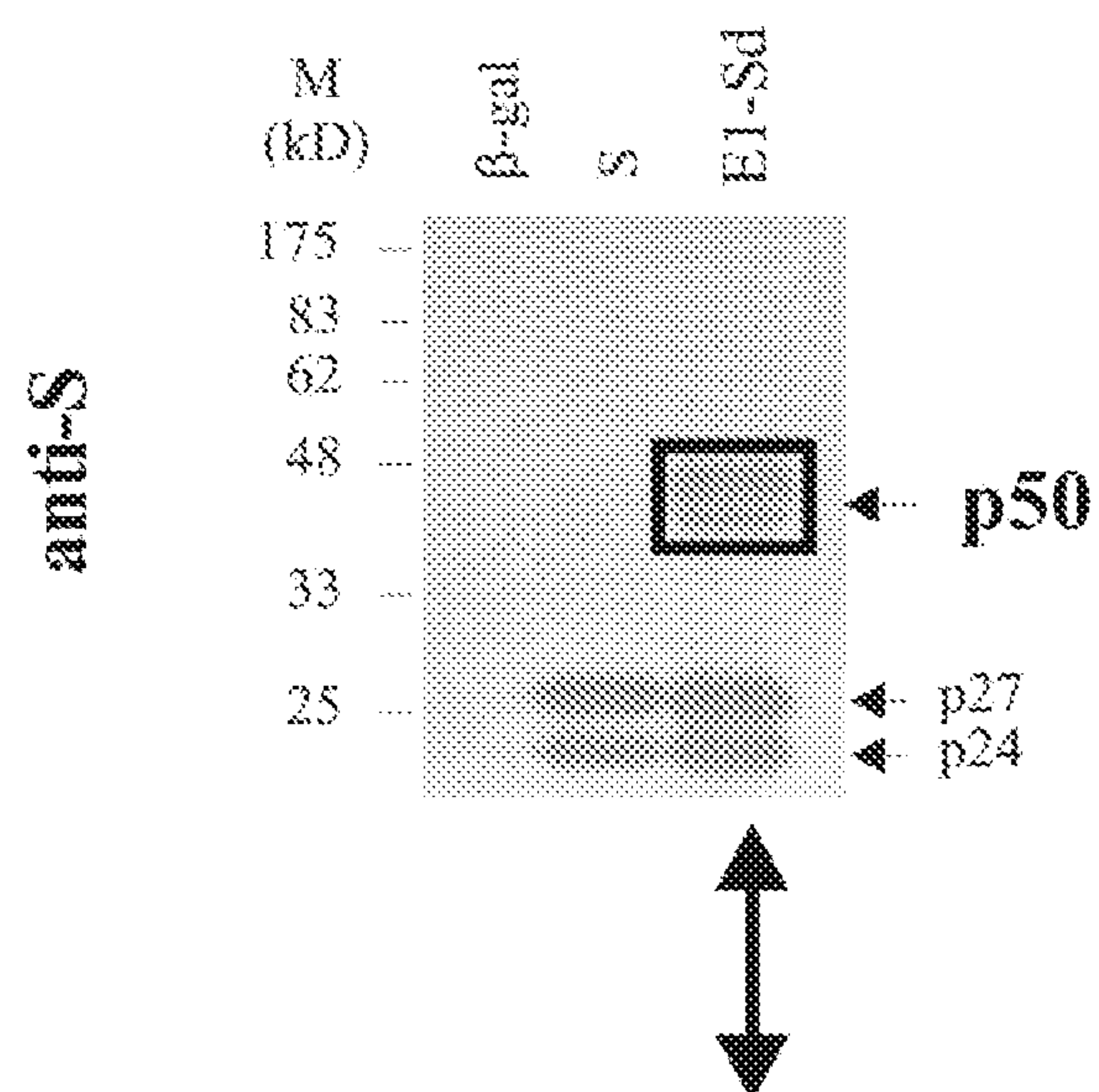


FIGURE 7F

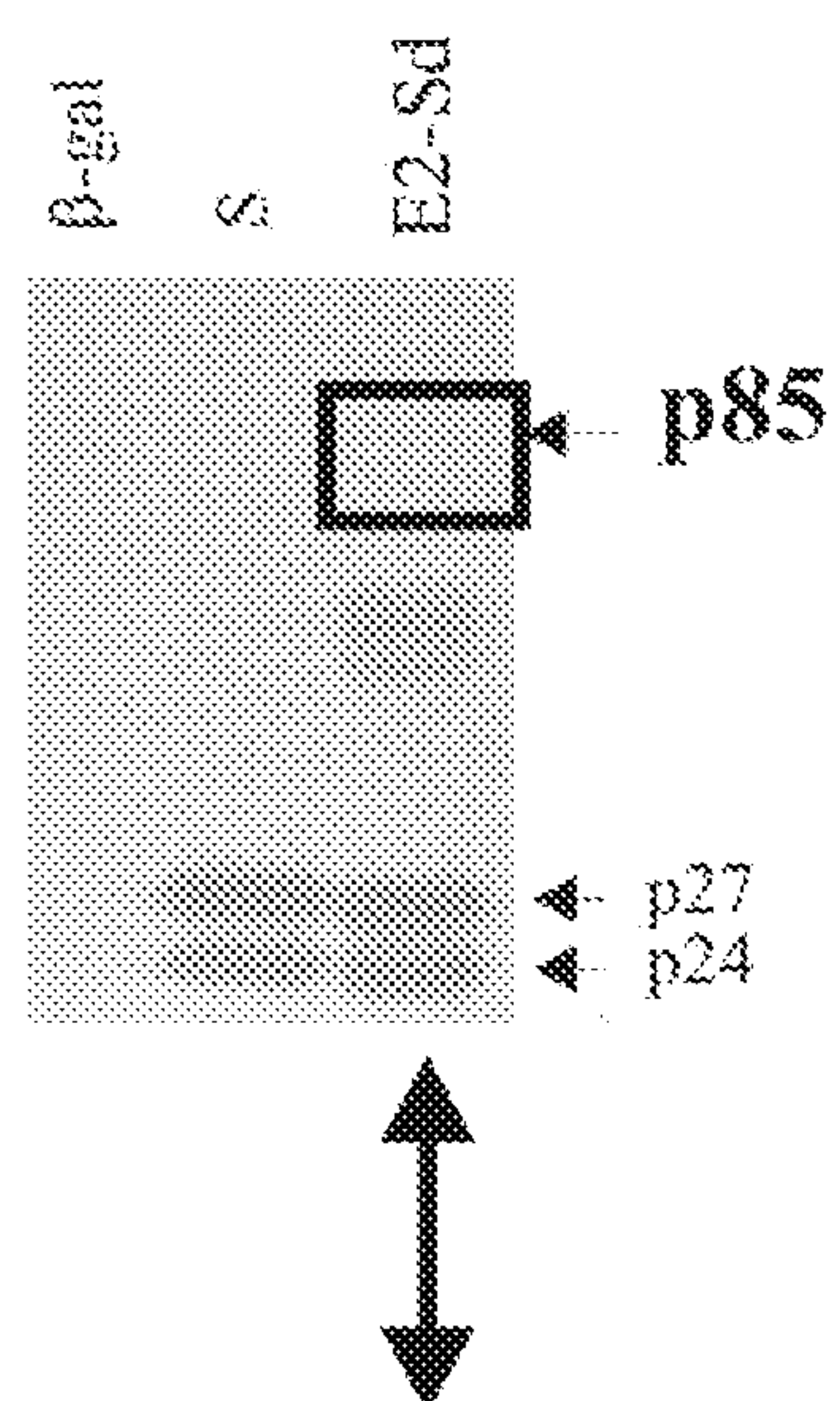


FIGURE 7D

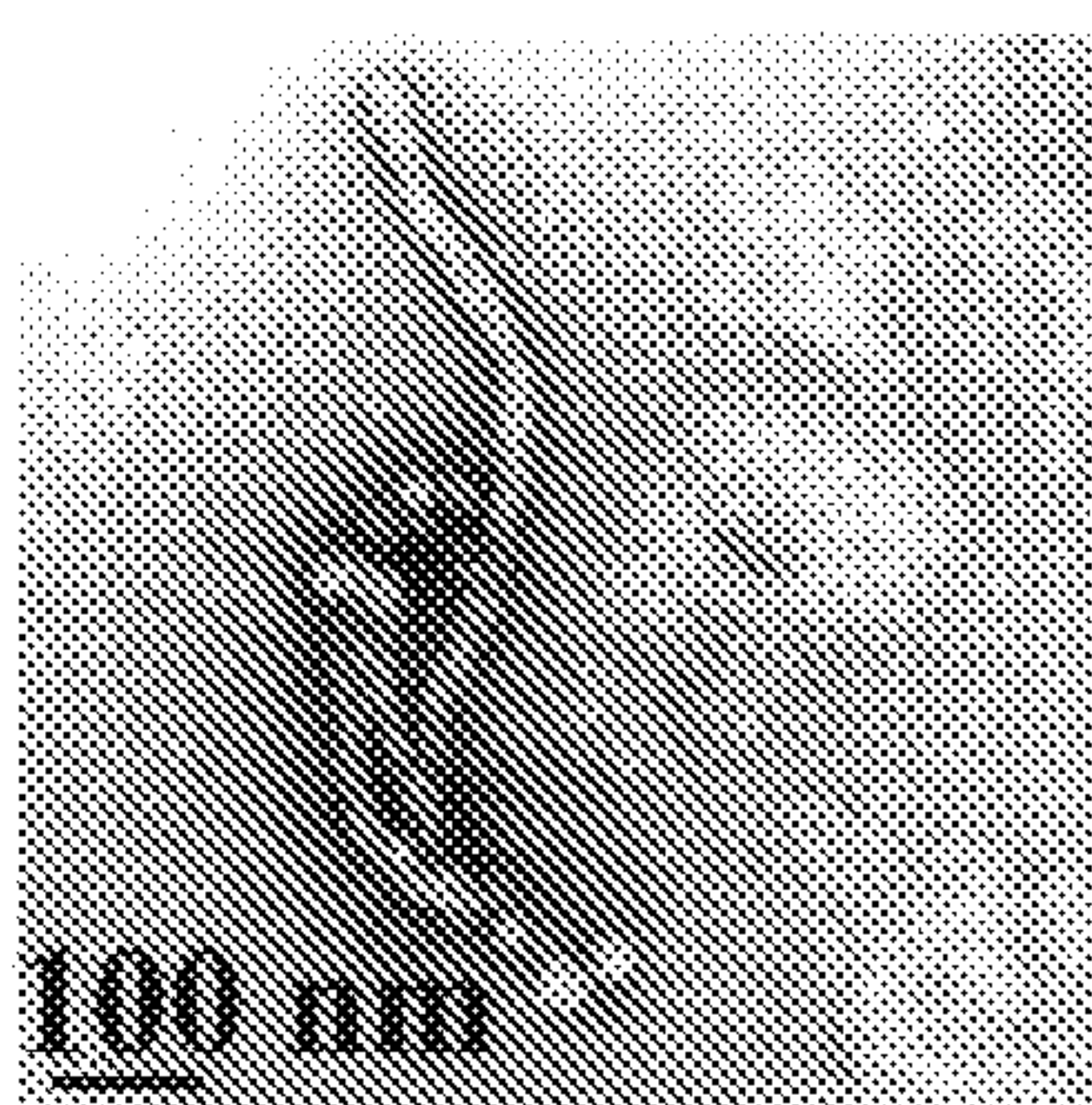


FIGURE 7G

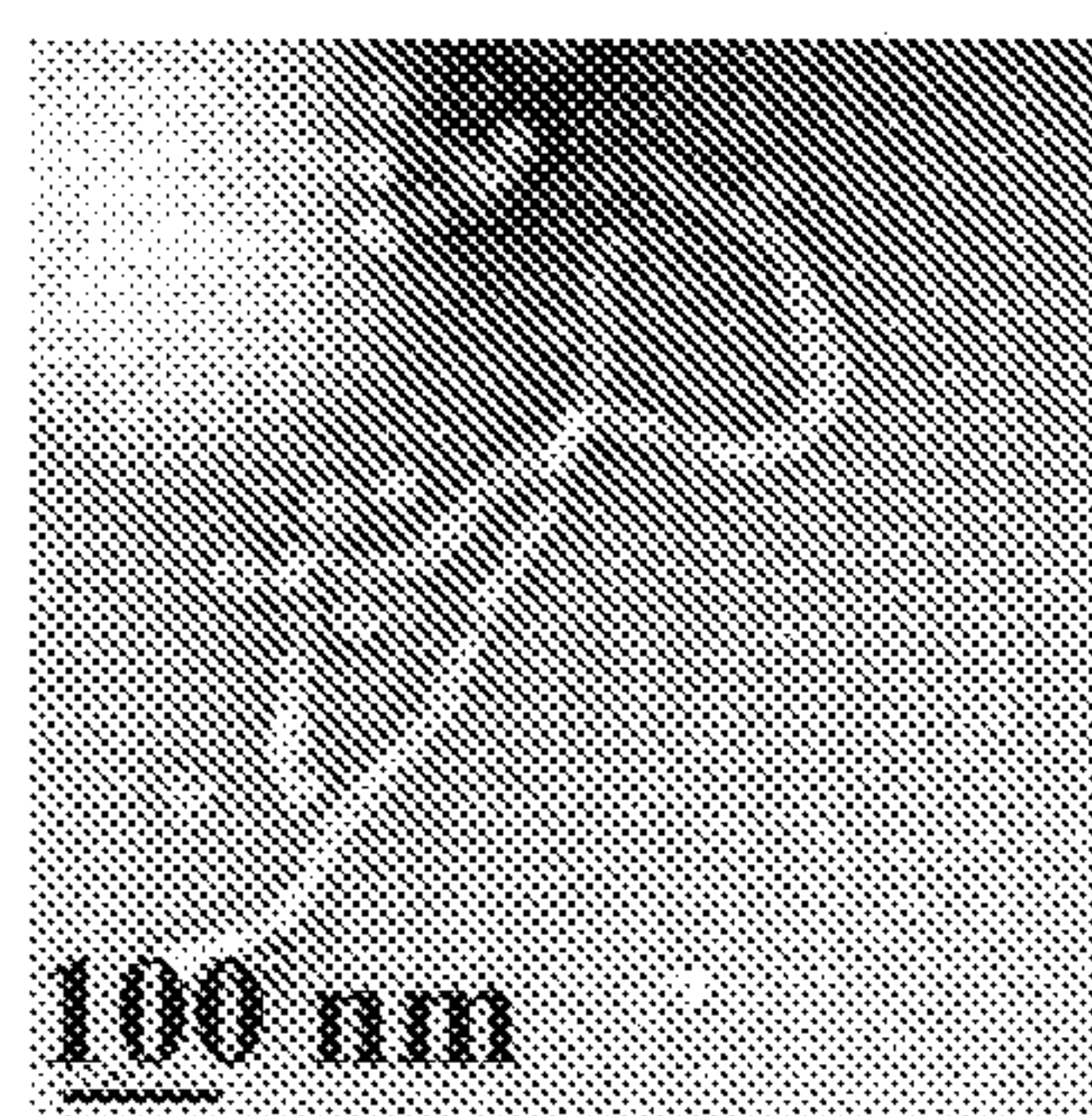


FIGURE 8

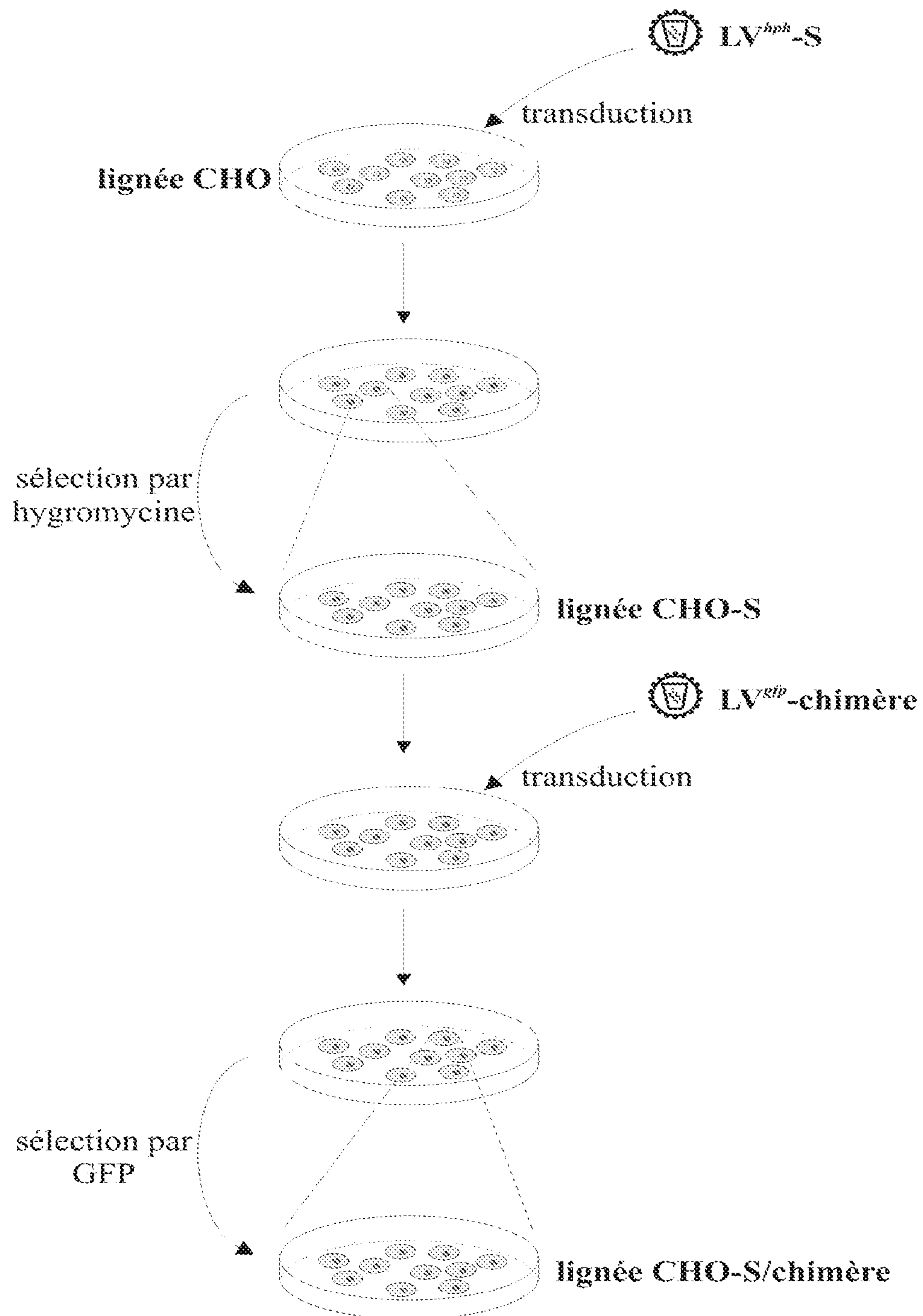


FIGURE 9

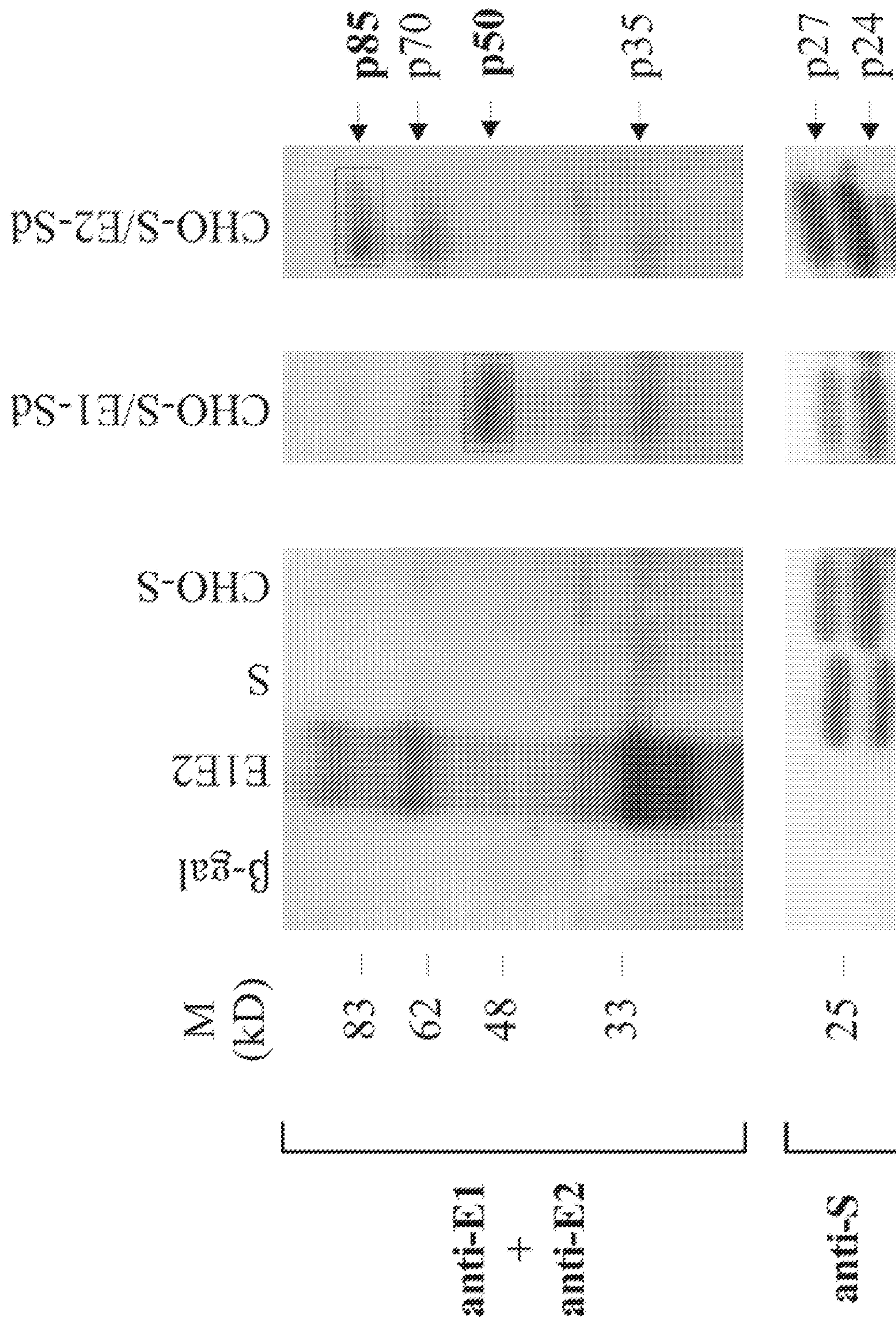


FIGURE 10

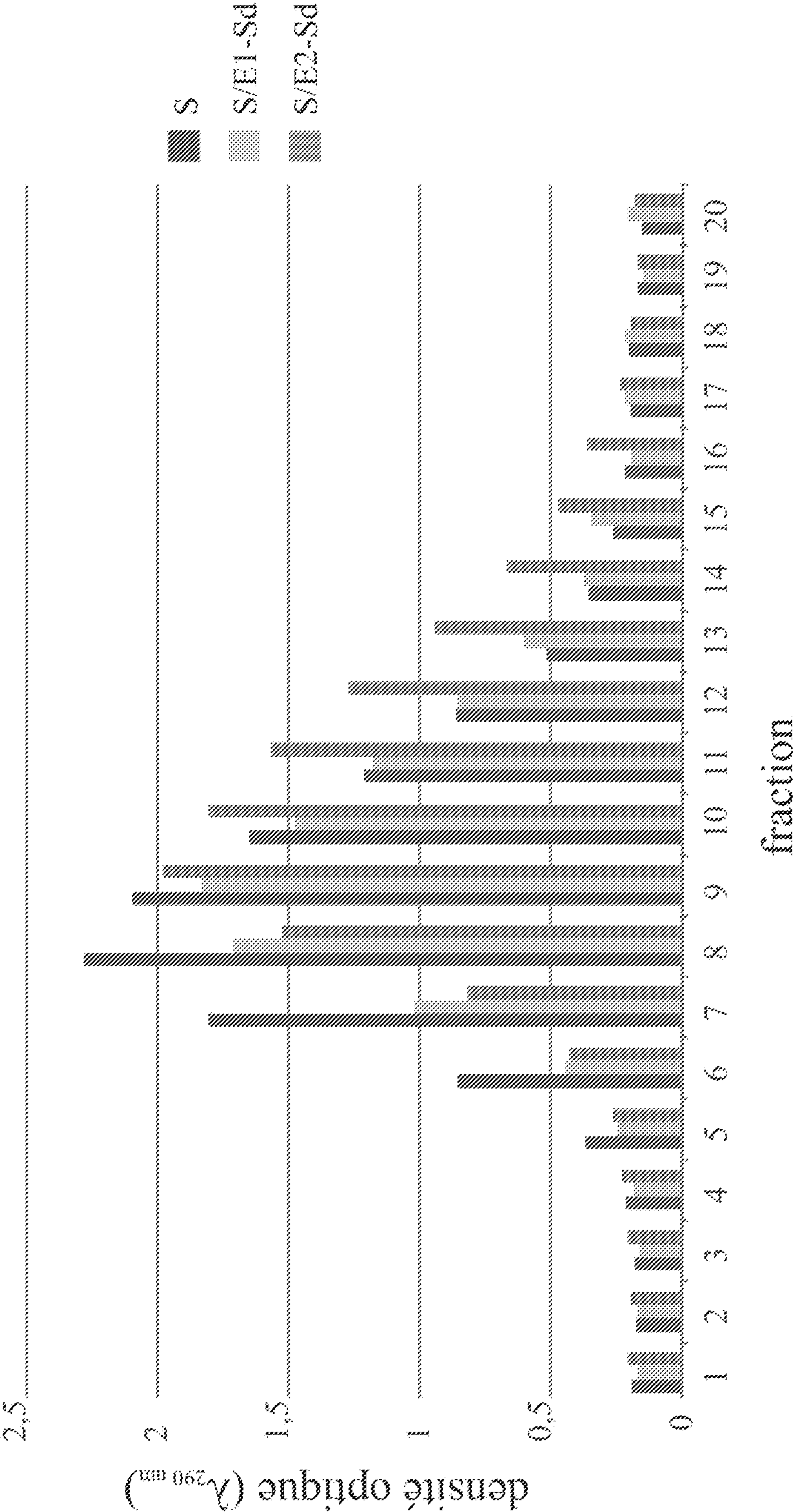
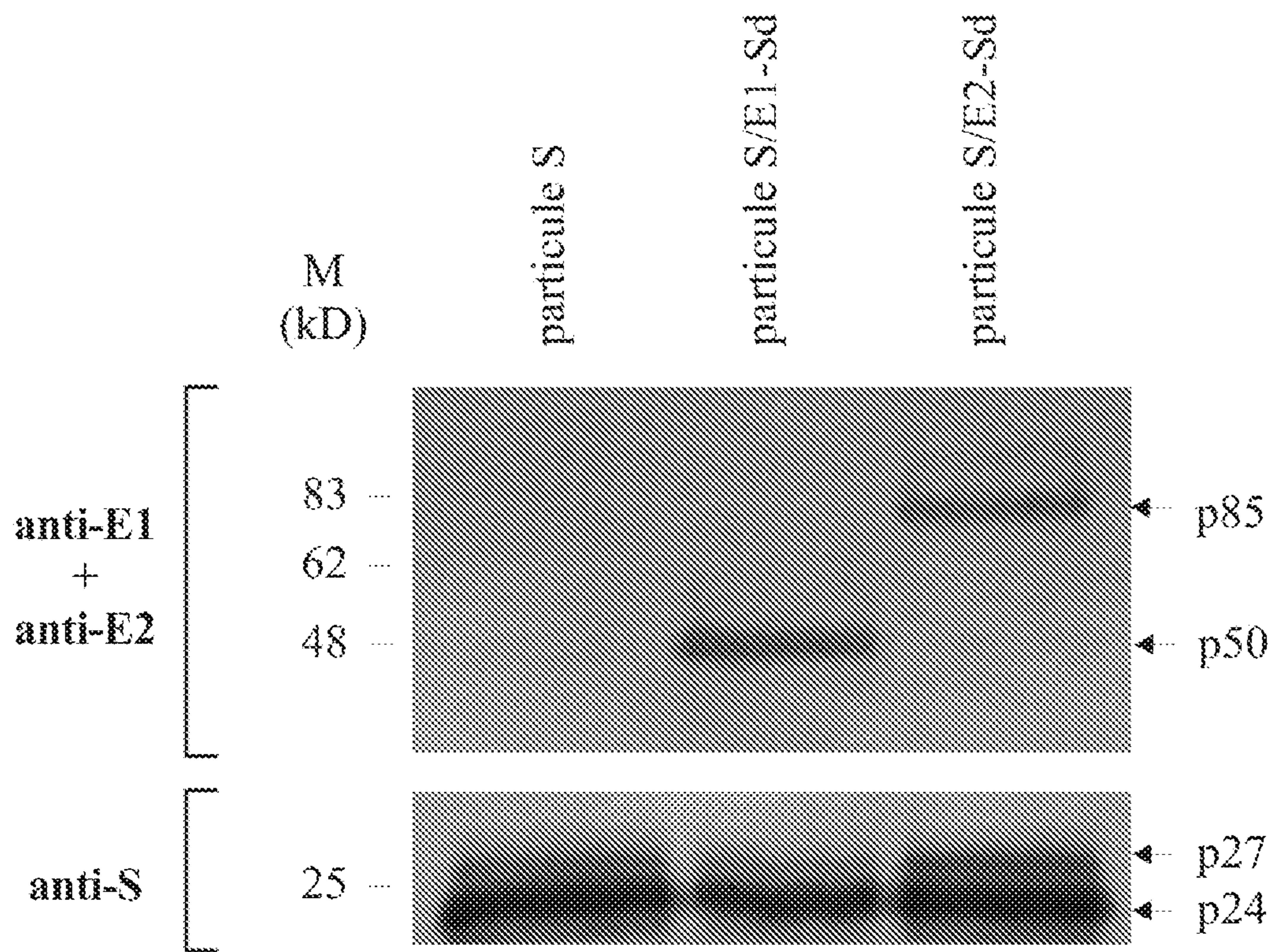
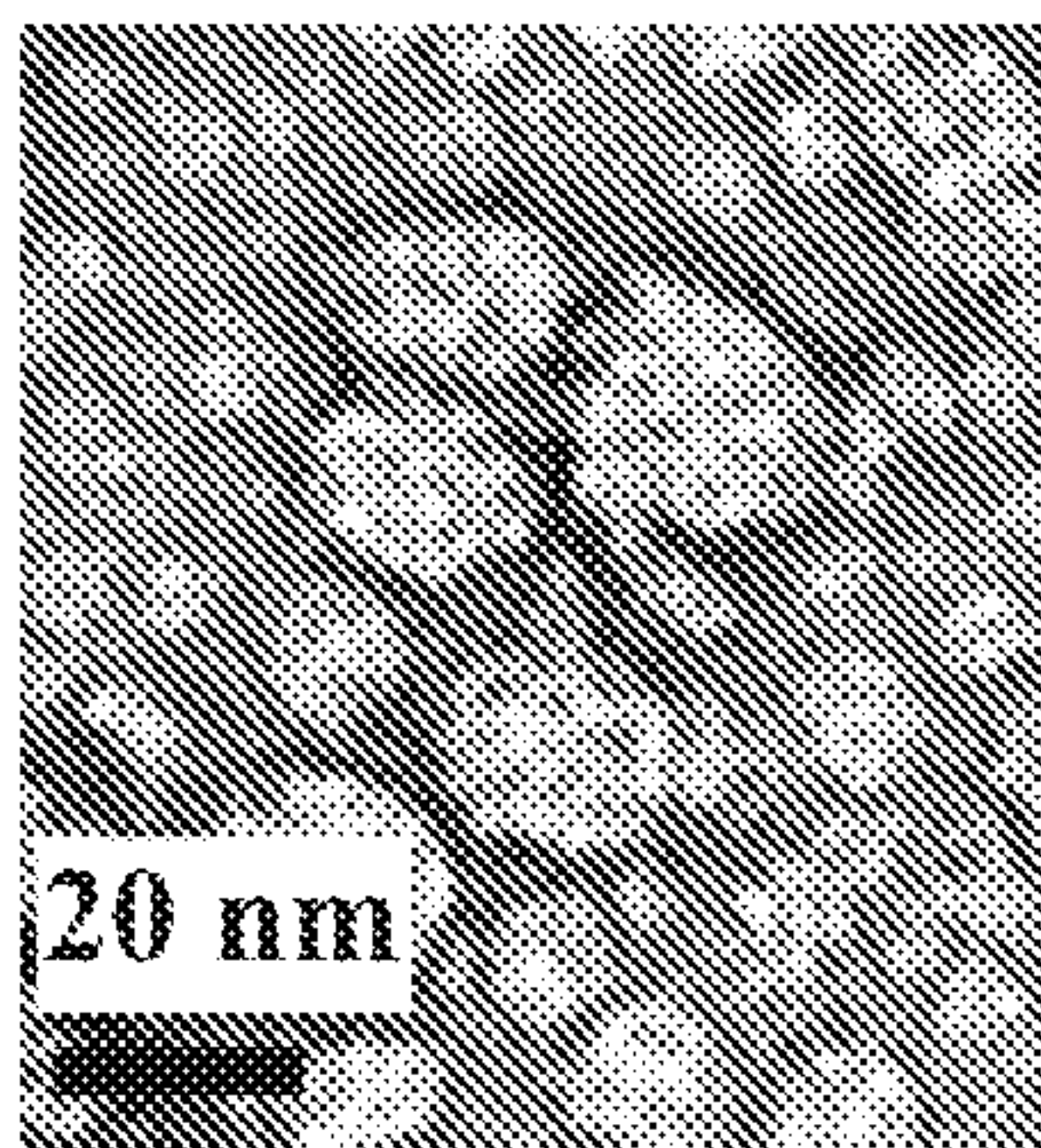
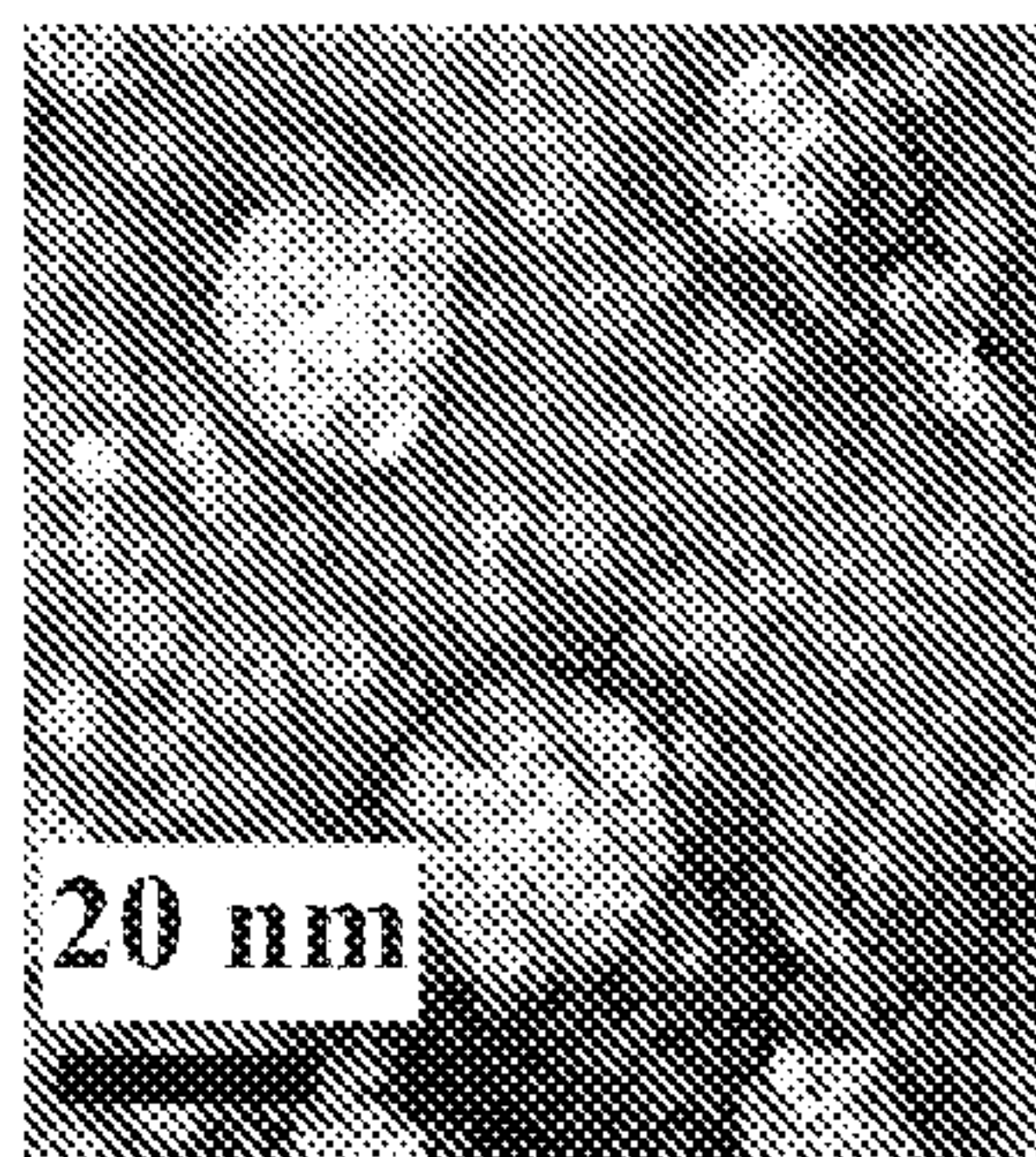


FIGURE 11A**FIGURE 11B****FIGURE 11C****FIGURE 11D**