



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

1022355 B1

Date de délivrance : 24/03/2016

## **BREVET D'INVENTION**

Date de priorité : 02/04/2014

Classification internationale : A61K 39/002, A61K 39/015, A61K 39/29, A61K 39/39

Numéro de dépôt : BE2015/5209

Date de dépôt : 02/04/2015

Titulaire :

GlaxoSmithKline Biologicals S.A.  
1330, Rixensart  
Belgique

Inventeur :

BALLOU JR, William Ripley  
1330 RIXENSART  
Belgique

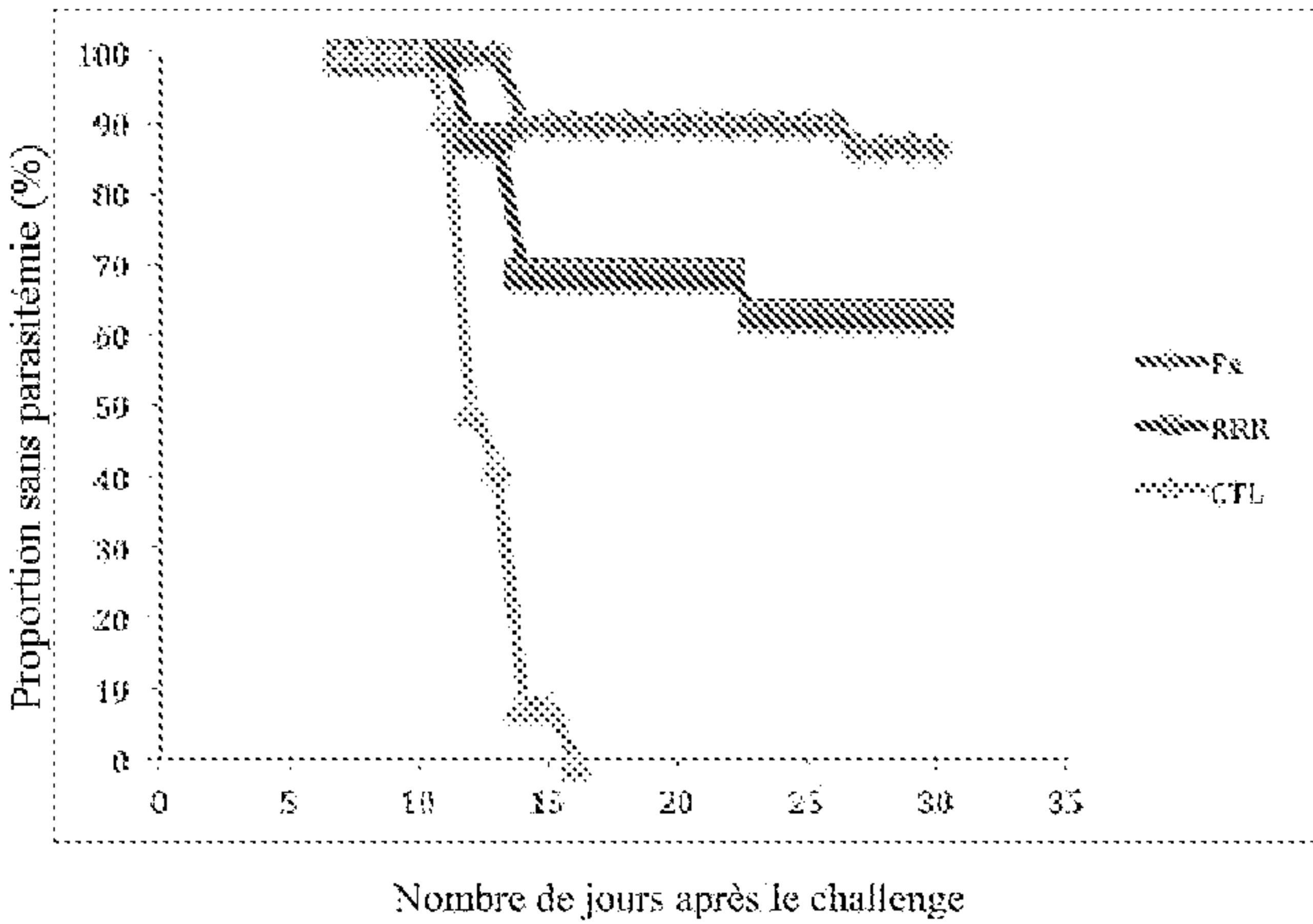
DIDIERLAURENT Arnaud Michel  
1330 RIXENSART  
Belgique

VAN DER MOST Robbert Gerrit  
1330 RIXENSART  
Belgique

**NOUVELLES MÉTHODES D'INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE**

Des méthodes et des utilisations permettant d'induire une réponse immunitaire consistant à réaliser au moins deux administrations d'une composition immunogène, la seconde administration étant donnée avec une dose plus faible que celle de la première administration, et la seconde administration pouvant ne pas comprendre d'adjuvant.

Figure 1



## NOUVELLES MÉTHODES D'INDUCTION D'UNE RÉPONSE IMMUNITAIRE

### Domaine technique

La présente invention concerne des méthodes permettant  
5 d'induire une réponse immunitaire, en particulier des méthodes  
d'immunisation consistant à administrer au moins deux fois une  
composition immunogène contenant des adjuvants, la dose  
administrée la deuxième fois étant plus faible que la  
première.

10

### Contexte de l'invention

La vaccination est l'une des méthodes les plus efficaces pour  
prévenir les maladies infectieuses. Cependant,  
l'administration unique d'un antigène est souvent insuffisante  
15 pour conférer une immunité complète et/ou induire une réponse  
durable. Certaines approches consistent à ajouter des  
adjuvants au vaccin et/ou à administrer des doses de  
rappel (en d'autres termes, il s'agit de restimuler la réponse  
immunitaire en administrant une ou plusieurs autres doses de  
20 l'antigène) pour instaurer une immunité forte et durable vis-  
à-vis du pathogène spécifique. Le vaccin administré en rappel  
et le vaccin administré en primovaccination peuvent être les  
mêmes (rappel homologue) ou être différents (rappel  
hétérologue). L'approche la plus fréquente pour le rappel  
25 homologue consiste non seulement à administrer le même vaccin,  
mais également à l'administrer à la même dose à chaque fois.

Le paludisme est l'une des maladies pour lesquelles la  
vaccination nécessite plusieurs injections. Le paludisme est  
l'un des problèmes de santé majeurs à l'échelle planétaire. En  
30 2010, l'Organisation mondiale de la santé a estimé à  
219 millions le nombre de cas de paludisme dans le monde. Le  
paludisme est provoqué par le parasite protozoaire du  
genre *Plasmodium*.

Le cycle de vie du parasite est complexe et nécessite  
35 deux hôtes, l'homme et le moustique, pour pouvoir être  
complet. L'infection de l'homme résulte de l'inoculation de  
sporozoïtes par l'intermédiaire de la salive du moustique

infecté. Le stade du sporozoïte a été identifié comme une cible potentielle pour un vaccin antipaludique. La principale protéine de surface du sporozoïte est connue sous le nom de protéine circumsporozoïte (protéine CS). Le RTS,S, antigène  
5 basé sur la protéine CS de *Plasmodium* est à l'étude depuis plus de 25 ans et constitue actuellement le candidat le plus évolué pour un vaccin antipaludique.

Au tout début du projet, le RTS,S a été étudié dans un essai clinique de taille modeste, en association avec un  
10 adjuvant composé de la QS21 et du 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau (Stoute et al. 1997 *NEJM* 336:86). Cette étude prévoyait un calendrier d'administration de trois doses complètes, mais à cause d'une réactogénicité excessive, la troisième injection a été réduite à 1/5<sup>e</sup> de la dose  
15 complète et a été administrée plus tard que la date initialement prévue. Au final, cette étude a permis de protéger six des sept sujets participants. Dans les travaux qui ont suivi, un calendrier d'immunisation de trois doses complètes a été utilisé et, dans des études plus récentes,  
20 employant aussi ce même calendrier, le RTS,S a été complété d'une préparation liposomale comprenant la QS21 et le 3D-MPL. Cet adjuvant est désigné sous le nom de AS01 et est décrit, notamment, dans les documents WO 96/33739 et WO2007/068907). Les données récentes provenant d'un essai clinique de  
25 Phase III de grande envergure, où le vaccin RTS,S/AS01 a été administré en trois doses identiques à 1 mois d'intervalle ont montré que sur 18 mois de suivi, le vaccin RTS,S/AS01 réduisait presque de moitié le nombre de cas de paludisme chez les jeunes enfants (5 à 17 mois au moment de la première  
30 vaccination) et réduisait de près d'un quart le nombre de cas de paludisme chez les nourrissons (6 à 12 semaines au moment de la première vaccination) sur une période de suivi de 18 mois.

Si des progrès significatifs ont été faits dans le  
35 domaine de la recherche et de la mise au point des vaccins, il n'en demeure pas moins que les efforts doivent être poursuivis pour développer de nouvelles compositions immunogènes et de



nouvelles méthodes d'immunisation contre certaines maladies, notamment le paludisme, qui soient extrêmement efficaces, sans danger, rentables, durables et qui induisent un large spectre de réponses immunitaires à réactivité croisée.

5

### **Résumé de l'invention**

Il a été trouvé de manière surprenante, qu'avec une méthode d'immunisation à plusieurs doses utilisant un vaccin antipaludique à adjuvant, l'immunisation est plus efficace  
10 quand la dose de rappel est moins forte que la dose de primovaccination (dose d'amorce) que lorsque les doses sont les mêmes. L'adjuvant utilisé comprend un agoniste de TLR4, le 3D-MPL et la QS21, une fraction de saponine immunologiquement active.

15

Dans un premier aspect, l'invention concerne donc une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et  
20 un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et  
25 ayant au moins l'un de ces deux composants en commun et

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que la  
30 première composition,

à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.

35

Dans un autre aspect, l'invention concerne une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition

immunogène comprenant le RTS,S et un adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant le RTS,S, l'adjuvant comportant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active, et la seconde composition immunogène  
 5 ne contenant pas d'adjuvant.

### **Brève description des figures**

Figure 1 : Pourcentage des sujets vaccinés qui n'ont pas développé de parasitémie après le « challenge » sur une  
 10 période de suivi de 28 jours. Fx désigne le groupe « **Fraction de dose administrée ultérieurement** », RRR le groupe « 0, 1, 2 mois », et CTL le groupe témoin

Figure 2 : Séquence de RTS

Figure 3 : Séquence de l'antigène de VZV

15

### **Description détaillée**

Comme décrit précédemment, l'invention concerne, dans un premier aspect, une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet  
 20 une première composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant  
 25 comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux composants en commun,

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- 30 • l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que la première composition,

à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.  
 35

L'invention concerne également une première composition immunogène utilisée dans une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant un ou  
5 plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine  
10 immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux composants en commun,

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde  
15 composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que la première composition,

à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.

20

L'invention concerne également une seconde composition immunogène utilisée dans une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant un ou  
25 plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine  
30 immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux composants en commun,

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde  
35 composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que la première composition,



à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.

5 L'invention concerne, dans un autre aspect, l'utilisation d'une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant dans la fabrication d'un médicament permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme, ledit sujet ayant déjà reçu une première  
10 composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un premier adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux  
15 composants en commun,

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que  
20 la première composition,

à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.

25 L'invention concerne, dans un autre aspect, une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant le RTS,S et un adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant le RTS,S, l'adjuvant  
30 comportant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active, et la seconde composition immunogène ne contenant pas d'adjuvant. Dans un mode de réalisation de cette méthode, la première et la seconde composition comprennent toutes les deux 25 microgrammes de RTS,S ou  
35 50 microgrammes de RTS,S.



D'une manière générale, la méthode de l'invention cherche à induire une réponse immunitaire protectrice, autrement dit à immuniser ou à vacciner le sujet contre le pathogène dont provient l'antigène. Dans un mode de réalisation, l'efficacité vaccinale de la méthode de l'invention est améliorée par rapport à un schéma thérapeutique dans lequel la première composition et la seconde composition sont identiques. Par exemple, l'efficacité vaccinale, d'après l'exemple inclus ici, peut être améliorée d'au moins 10 %, par exemple de 25 %. Dans un mode de réalisation, l'efficacité vaccinale obtenue est supérieure à 80 %, par exemple supérieure à 90 %, d'après l'exemple inclus ici. La méthode peut donc être utilisée pour prévenir les maladies infectieuses (autrement dit en prophylaxie). La méthode peut par ailleurs être utilisée en immunothérapie, autrement dit pour traiter une maladie, par exemple le cancer, en induisant ou en stimulant une réponse immunitaire.

#### Adjuvants utilisés dans la méthode de l'invention

Comme décrit précédemment, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et ont au moins l'un de ces deux composants en commun.

Dans un mode de réalisation, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent donc tous les deux un agoniste de TLR. Dans un autre mode de réalisation, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent tous les deux une saponine immunologiquement active. Dans un autre mode de réalisation encore, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent tous les deux un agoniste de TLR et une saponine immunologiquement active.

Dans un mode de réalisation, le premier adjuvant et le second adjuvant sont constitués des mêmes composants. Dans ce mode de réalisation, les composants des deux adjuvants sont donc les mêmes, mais ne sont pas nécessairement présents dans les mêmes proportions relatives. Par exemple, le premier adjuvant et le second adjuvant peuvent tous les deux être

constitués d'un agoniste de TLR et d'une saponine dans une préparation liposomale, mais le rapport agoniste de TLR sur saponine peut être de 5:1 dans le premier adjuvant et de 1:1 dans le second adjuvant.

5 Dans un autre mode de réalisation, le premier adjuvant et le second adjuvant sont constitués des même composants et les proportions relatives sont les mêmes. Mais dans ce mode de réalisation-là, si les proportions relatives des composants de l'adjuvant sont les mêmes, leurs quantités absolues peuvent  
10 être différentes. Par exemple les quantités absolues de tous les composants présents dans le second adjuvant peuvent, par exemple, valoir un cinquième des quantités absolues de tous les composants présents dans le premier adjuvant.

Comme décrit précédemment, dans un mode de réalisation,  
15 le second adjuvant contient une quantité du composant en commun plus faible (c'est-à-dire une quantité de l'agoniste de TLR plus faible ou une quantité de la saponine plus faible ou une quantité plus faible des deux) que le premier adjuvant.

Dans un mode de réalisation, la quantité dans le second  
20 adjuvant est au moins 10 % plus faible, par exemple au moins 25 % plus faible, par exemple au moins deux fois plus faible, par exemple au moins trois fois plus faible, par exemple au moins quatre fois plus faible, par exemple au moins cinq fois plus faible, par exemple au moins six fois plus faible, par  
25 exemple au moins sept fois plus faible, par exemple au moins huit fois plus faible, par exemple au moins neuf fois plus faible, par exemple au moins dix fois plus faible, par exemple au moins 15 fois plus faible, par exemple au moins 20 fois plus faible que dans le premier adjuvant.

30 Dans un autre mode de réalisation, la quantité dans le second adjuvant est entre 2 et 50 fois plus faible, par exemple entre 2 et 20 fois plus faible, par exemple entre 2 et 15 fois plus faible, par exemple entre 2 et 10 fois plus faible, par exemple entre 3 et 7 fois plus faible, par exemple  
35 entre 4 et 6 fois plus faible que dans le premier adjuvant.

Comme décrit précédemment, dans un mode de réalisation, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent un



agoniste de TLR (Toll-like receptor, récepteur de type Toll). L'utilisation d'agonistes des TLR dans les adjuvants est bien connue de l'Etat de l'art et a été revue par exemple par Lahiri et al. (2008), *Vaccine* 26:6777. Parmi les TLR qui  
5 peuvent être stimulés pour obtenir un effet adjuvant figurent TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 et TLR9. Les agonistes de TLR2, TLR4, TLR7 et TLR8, et en particulier les agonistes de TLR4, sont préférés.

Parmi les agonistes de TLR4 appropriés figurent les  
10 lipopolysaccharides, par exemple le lipide monophosphorique A (MPL) et lipide monophosphorique A 3-O-désacylé (3D-MPL). Le brevet US 4 436 727 décrit le MPL et sa fabrication. Le brevet US 4 912 094 et le certificat de réexamen B1 4 912 094 décrivent le 3D-MPL et une méthode  
15 permettant de le fabriquer. L'adjuvant lipidique à base de glucopyranosyle (GLA, glucopyranosyl lipide adjuvant) est un autre agoniste de TLR4 ; il s'agit d'une molécule synthétique semblable au lipide A (voir, par exemple, Fox et al. (2012) *Clin. Vaccine Immunol* 19:1633). Dans un autre mode  
20 de réalisation encore, l'agoniste de TLR4 peut être un agoniste de TLR4 synthétique, par exemple une molécule de disaccharide synthétique, de structure similaire à MPL et à 3D-MPL, ou il peut s'agir de molécules de monosaccharides synthétiques, par exemple les composés aminoalkyle  
25 glucosaminide phosphate (AGP) décrits, par exemple, dans les documents WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO3065806, WO04062599, WO06016997, WO0612425, WO03066065 et WO0190129. Ces molécules ont également été décrites dans la littérature scientifique et celle des brevets sous forme de « lipide A  
30 mimétiques ». Les « lipide A mimétiques » partagent de manière appropriée une partie de l'activité fonctionnelle et/ou structurelle avec le lipide A, et dans un aspect ils sont reconnus par les récepteurs TLR4. Les AGP tels qu'ils sont décrits ici sont parfois désignés « lipide A mimétiques » dans  
35 l'Etat de l'art. Dans un mode de réalisation préféré, l'agoniste de TLR4 est le 3D-MPL. Les agonistes de TLR4, par exemple le lipide monophosphorique A 3-O-désacylé (3D-MPL), et



leur utilisation comme adjuvants dans les vaccins ont, par exemple, été décrits dans les documents WO 96/33739 et WO2007/068907 et ont été revus par Alving et al. (2012) *Curr Opin in Immunol* 24:310.

5 Dans un autre mode de réalisation de la méthode de l'invention, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent une saponine immunologiquement active, par exemple une fraction de saponine immunologiquement active, par exemple la QS21.

10 Les adjuvants comprenant des saponines ont été décrits dans l'Etat de l'art. Les saponines sont décrites par Lacaille-Dubois et Wagner (1996) A review of the biological et pharmacological activities of saponines. *Phytomedicine* vol 2:363. Les saponines sont connues pour être utilisées comme  
15 adjuvants dans les vaccins. Par exemple, la saponine Quil-A® (dérivée de l'écorce de *Quillaja saponaria* Molina, arbre originaire d'Amérique du Sud), a été décrite par Dalsgaard et al. en 1974 ("Saponin adjuvants", *Archiv. fur die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, 243) pour  
20 avoir une activité adjuvante. Des fractions purifiées de Quil-A® ont été isolées par HPLC qui conservent l'activité adjuvante de Quil-A® sans la toxicité associée (Kensil et al. (1991) *J. Immunol.* 146: 431. Des fractions de Quil-A® aussi décrites dans le brevet US 5 057 540 et l'article "Saponines  
25 as vaccine adjuvants", Kensil, C. R. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55.

Les deux fractions QS7 et QS21 (également connues sous le nom de QA-7 et QA-21), sont les deux fractions appropriées pour être utilisées dans la présente invention, la QS21 étant  
30 une fraction de saponine immunologiquement active préférée. La QS21 a été revue par Kensil (2000) dans O'Hagan, *Vaccine Adjuvants: preparation methods and research protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, chapitre 15. Des systèmes d'adjuvant sous forme de particules comprenant des fractions  
35 de Quil-A®, par exemple QS21 et QS7, sont notamment décrits dans les documents WO 96/33739, WO 96/11711 et WO2007/068907.

Outre d'autres composants, l'adjuvant comprend de préférence un stérol. La présence d'un stérol peut par ailleurs réduire la réactogénicité des compositions comprenant des saponines, voir par exemple le document EP0822831. Le  
5 bêta-sitostérol, le stigmastérol, l'ergostérol, l'ergocalciférol et le cholestérol figurent parmi les stérols appropriés. Le cholestérol est particulièrement approprié. De manière appropriée, la fraction de saponine immunologiquement active est la QS21 et le rapport QS21:stérol va de 1:100 à 1:1  
10 p/p, par exemple de 1:10 à 1:1 p/p, par exemple de 1:5 à 1:1 p/p.

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

15 Dans certains modes de réalisation, l'adjuvant se présente sous la forme d'une émulsion huile dans l'eau, comprenant par exemple du squalène, l'alpha-tocophérol et un tensioactif (voir par exemple le document W095/17210) ou sous la forme d'un liposome, la présentation liposomale étant la  
20 forme préférée.

Le terme « liposome » utilisé ici fait référence à des structures lipidiques uni- ou multilamellaires (en particulier 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 lamelles selon le nombre de membranes lipidiques formées) entourant un milieu aqueux. Les  
25 liposomes et les préparations de liposomes sont bien connus de l'Etat de l'art. Les présentations liposomales sont décrites, par exemple, dans les documents WO 96/33739 et WO2007/068907. Les lipides qui sont capables de former des liposomes incluent toutes les substances ayant des propriétés lipidiques ou de  
30 type lipidique. Les lipides pouvant constituer les lipides des liposomes peuvent être sélectionnés dans le groupe comprenant les glycérides, les glycérophospholipides, les glycérophosphinolipides, les glycérophosphonolipides, les sulfolipides, les sphingolipides, les phospholipides, les  
35 isoprénolides, les stéroïdes, les stéarines, les stérols, les archéolipides, les lipides cationiques synthétiques et les hydrates de carbone contenant des lipides. Dans un mode de



réalisation particulier de l'invention, les liposomes comprennent un phospholipide. Parmi les phospholipides appropriés figurent (sans s'y limiter) : la phosphocholine (PC) qui est un intermédiaire dans la synthèse de la phosphatidylcholine ; les dérivés naturels de phospholipides : la phosphocholine d'œuf, la phosphocholine de soja, la phosphocholine de soja hydrogénée, la sphingomyéline comme phospholipides naturels ; et les dérivés synthétiques de phospholipides : la phosphocholine (didécanoyl-L-α-phosphatidylcholine [DDPC], la dilauroylphosphatidylcholine [DLPC], la dimyristoylphosphatidylcholine [DMPC], la dipalmitoylphosphatidylcholine [DPPC], la distéaroylphosphatidylcholine [DSPC], la dioléoylphosphatidylcholine [DOPC], la 1-palmitoyl, la 2-oléoylphosphatidylcholine [POPC], la diélaïdoylphosphatidylcholine [DEPC]), le phosphoglycérol (1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [DMPG], le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [DPPG], le 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [DSPG], le 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol [POPG]), l'acide phosphatidique (acide 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphatidique [DMPA], l'acide dipalmitoylphosphatidique [DPPA], l'acide distéaroylphosphatidique [DSPA]), la phosphoéthanolamine (1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DMPE], la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DPPE], la 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DSPE], la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine [DOPE]), la phosphosérine, le polyéthylène glycol [PEG] phospholipide.

La taille des liposomes peut varier de 30 nm à plusieurs µm selon la composition des phospholipides et la méthode utilisée pour les préparer. Dans des modes de réalisation particuliers de l'invention, la taille des liposomes se situe dans la gamme de 50 nm à 500 nm, et dans d'autres modes de réalisation de 50 nm à 200 nm. La diffusion de la lumière



laser dynamique est une méthode utilisée pour mesurer la taille des liposomes et bien connue de l'homme du métier.

Dans un mode de réalisation particulièrement approprié, les liposomes utilisés dans l'invention comprennent la DOPC et un stérol, en particulier le cholestérol. Dans un mode de réalisation particulier, les compositions de l'invention comprennent donc la QS21 dans une quantité quelconque décrite ici sous la forme d'un liposome, ledit liposome comprenant la DOPC et un stérol, en particulier le cholestérol.

De préférence, le premier adjuvant et le second adjuvant comprennent le 3D-MPL et la QS21 dans une préparation liposomale.

Dans un mode de réalisation, le premier adjuvant comprend entre 25 et 75, par exemple 50 microgrammes, de 3D-MPL et entre 25 et 75, par exemple 50 microgrammes de QS21 dans une préparation liposomale et le second adjuvant comprend entre 5 et 15, par exemple 10 microgrammes de 3D-MPL et entre 5 et 15, par exemple 10 microgrammes de QS21 dans une préparation liposomale.

Dans un autre mode de réalisation, le premier adjuvant comprend entre 12,5 et 37,5, par exemple 25 microgrammes, de 3D-MPL et entre 12,5 et 37,5, par exemple 25 microgrammes de QS21 dans une préparation liposomale et le second adjuvant comprend entre 2,5 et 7,5, par exemple 5 microgrammes de 3D-MPL et entre 2,5 et 7,5, par exemple 5 microgrammes de QS21 dans une préparation liposomale.

Il est bien connu que pour l'administration parentérale, les solutions doivent être physiologiquement isotoniques (c'est-à-dire avoir une osmolalité pharmaceutiquement acceptable) pour éviter la déformation ou la lyse des cellules. Un « agent d'isotonicité » est un composé qui est physiologiquement toléré et qui confère une tonicité appropriée à une préparation (par exemple les compositions immunogènes de l'invention) pour éviter le flux net de l'eau à travers les membranes des cellules en contact avec la préparation. Des compositions adjuvantes aqueuses qui contiennent 100 mM de chlorure de sodium ou plus, par exemple

le système adjuvant A (ASA) figurant dans les documents WO 2005/112991 et WO2008/142133, ou les adjuvants liposomaux décrits dans le document WO2007/068907, sont connues.

5 Dans certains modes de réalisation, l'agent d'isotonicité utilisé pour la composition est un sel. Dans d'autres modes de réalisation, cependant, la composition comprend un agent d'isotonicité non ionique et la concentration du chlorure de sodium ou la force ionique de la composition est inférieure à 100 mM, par exemple inférieure à 80 mM, par exemple inférieure  
10 à 30 mM, par exemple inférieure à 10 mM ou inférieure à 5 mM. Dans un mode de réalisation préféré, l'agent d'isotonicité non ionique est un polyol, par exemple le sorbitol. La concentration du sorbitol peut, par exemple, être comprise entre environ 3 % et environ 15 % (p/v), par exemple entre  
15 environ 4 % et environ 10 % (p/v). Des adjuvants comprenant une fraction de saponine immunologiquement active et un agoniste de TLR4 où l'agent d'isotonicité est un sel ou un polyol ont été décrits dans le document WO2010142685, notamment dans les Exemples 1 et 2 du document WO2010142685.  
20 Dans un autre mode de réalisation, le premier adjuvant et/ou le second adjuvant ne comprennent pas d'aluminium.

#### Antigènes utilisés dans la méthode de l'invention.

Dans un mode de réalisation de la méthode de l'invention, la  
25 seconde composition contient une quantité de l'antigène en commun plus faible que dans la première composition.

Dans un mode de réalisation, la quantité de l'antigène en commun dans la seconde composition est au moins 10 % plus faible, par exemple au moins 25 % plus faible, par exemple au  
30 moins deux fois plus faible, par exemple au moins trois fois plus faible, par exemple au moins quatre fois plus faible, par exemple au moins cinq fois plus faible, par exemple au moins six fois plus faible, par exemple au moins sept fois plus faible, par exemple au moins huit fois plus faible, par  
35 exemple au moins neuf fois plus faible, par exemple au moins dix fois plus faible, par exemple au moins 15 fois plus



faible, par exemple au moins 20 fois plus faible que dans la première composition.

Dans un autre mode de réalisation, la quantité de l'antigène en commun dans la seconde composition est entre 2 et 50 fois plus faible, par exemple entre 2 et 20 fois plus faible, par exemple entre 2 et 15 fois plus faible, par exemple entre 2 et 10 fois plus faible, par exemple entre 3 et 7 fois plus faible, par exemple entre 4 et 6 fois plus faible que dans la première composition.

Comme décrit précédemment, la première composition immunogène et la seconde composition immunogène possèdent au moins un antigène en commun. Dans certains modes de réalisation, les antigènes présents dans la première et la seconde composition sont tous les mêmes.

Dans un mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène de *Plasmodium*, par exemple un antigène de *P. falciparum* ou de *P. vivax*. Dans un mode de réalisation, l'antigène en commun est la protéine circumsporozoïte (CP) ou un fragment immunogène ou un variant de celle-ci, par exemple la protéine CS de *P. falciparum* ou un fragment immunogène ou un variant de celle-ci ou la protéine CS de *P. vivax* ou un fragment immunogène ou un variant de celle-ci.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est CelTOS (numéro d'accèsion Q8I5P1 : *P. falciparum* 3D7 CelTOS ; GenBank : AAN36249).), TRAP (numéro d'accèsion : CAD52497.1 GI:23615505) ou Pfs25 (numéro d'accèsion : AAN35500.1 GI:23495169) ou un fragment immunogène ou un variant de CelTOS, TRAP, et/ou Pfs25.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est une protéine immunogène constituée de l'antigène de surface S du virus de l'hépatite B (HBsAg) ou un fragment immunogène de celle-ci, ou une protéine immunogène comprenant HBsAg ou un fragment immunogène de celle-ci, par exemple une protéine de fusion de HBsAg avec un antigène différent.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène de VZV, par exemple la glycoprotéine gE (ou gp1) de VZV ou un dérivé immunogène de celle-ci. La



protéine gE de type sauvage ou pleine longueur est constituée de 623 acides aminés comprenant un peptide signal, la majeure partie de la protéine, une région d'ancrage hydrophobe (résidus 546-558) et une queue C-terminale. Dans un aspect, une extrémité C tronquée de gE (également désignée gE tronquée) est utilisée, la troncature éliminant 4 à 20 pour cent du nombre total des résidus d'acides aminés de l'extrémité carboxy-terminale. Dans un autre aspect, la gE tronquée est dépourvue de la région d'ancrage de l'extrémité carboxylique (de manière appropriée, à peu près les acides aminés 547-623 de la séquence de type sauvage). Dans un autre aspect, la gE est une gE tronquée de séquence SEQ ID NO. 2.

L'antigène gE, ses dérivés sans ancrage (qui sont aussi des dérivés immunogènes) et leur production sont décrits dans le document EP0405867 et les références de la présente description (voir aussi Vafai (1994) Vaccine 12:1265). Le document EP192902 décrit aussi la gE et sa production. La gE tronquée dont la séquence est illustrée en figure 3, est aussi décrite par Haumont *et al.* Virus Research (1996) 40:199, et est intégrée ici entièrement par référence.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène de CMV, par exemple la gB ou un fragment immunogène de celle-ci ou un variant de celle-ci. Les antigènes dérivés de la gB appropriés ont été décrits dans le document WO 2012/049317, publié aux États-Unis sous la référence US2013216613 et qui est intégré par référence en vue de décrire les protéines appropriées à utiliser dans la présente invention.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène de RSV, par exemple la protéine F de RSV ou un fragment immunogène de celle-ci ou un variant de celle-ci. Les antigènes dérivés de la protéine F appropriés ont été décrits dans le document WO2010149745, par exemple les variants de la protéine F illustrés dans les séquences SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 20 et SEQ ID NO : 22 du document WO2010149745. D'autres antigènes du RSV appropriés ont été décrits dans les documents WO2011008974 et WO2012158613.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène du virus de la dengue, par exemple un virus de la dengue entier inactivé ou vivant atténué. La composition peut être multivalente et contenir par exemple quatre souches  
5 du virus de la dengue ou plus.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène du virus *Haemophilus influenzae*, par exemple la protéine E et/ou la piline A ou des fragments immunogènes de celles-ci ou des variants de celles-ci, par exemple ceux  
10 décrits dans le document WO2012139225.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un antigène de *M. tuberculosis*, par exemple l'antigène M72, par exemple l'antigène décrit dans le document WO2006/117240, ou le brevet américain US No. 8 470 338 et qui  
15 est intégré par référence en vue de décrire les protéines appropriées à utiliser dans la présente invention.

Un fragment immunogène peut avoir une longueur quelconque pourvu qu'il conserve ses propriétés immunogènes. Le fragment peut, par exemple, comprendre 5 acides aminés consécutifs ou  
20 plus, par exemple 10 acides aminés consécutifs ou plus, par exemple 20 acides aminés consécutifs ou plus, par exemple 50 acides aminés consécutifs ou plus, par exemple 100 acides aminés consécutifs ou plus de la protéine CS.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun  
25 comprend ou est constitué d'un variant de la protéine CS.

Un variant polypeptidique peut contenir un certain nombre de substitutions, de préférence de substitutions conservatrices (la modification peut concerner par exemple, 1 à 50, par exemple 1 à 25, en particulier 1 à 10, et tout  
30 particulièrement 1 résidu(s) d'acide(s) aminé(s) par rapport à la séquence de référence). De manière appropriée, ces substitutions ne se produisent pas dans la région d'un épitope et n'ont donc pas d'incidence significative sur les propriétés immunogènes de l'antigène.

35 Les variants des protéines peuvent aussi être des variants contenant des acides aminés supplémentaires par rapport à la séquence de référence ; ces insertions peuvent,



par exemple, se produire dans 1 à 10 sites (par exemple 1 à 5 sites, de manière appropriée 1 ou 2 sites, en particulier 1 site) et peuvent, par exemple, impliquer l'ajout de 50 acides aminés ou moins en chacun des sites (par exemple 20 acides aminés ou moins, en particulier 10 acides aminés ou moins, en particulier 5 acides aminés ou moins). De manière appropriée, ces insertions ne se produisent pas dans la région d'un épitope et n'ont donc pas d'incidence significative sur les propriétés immunogènes de l'antigène. Un allongement bref de résidus d'histidine (par exemple 2 à 6 résidus) qui favorise l'expression et/ou la purification de l'antigène en question constitue un exemple d'insertion.

Les variants peuvent aussi être des variants où des acides aminés ont été délétés par rapport à la séquence de référence ; ces délétions peuvent, par exemple, se produire dans 1 à 10 sites (par exemple 1 à 5 sites, de manière appropriée 1 ou 2 sites, en particulier 1 site) et peuvent, par exemple, impliquer la délétion de 50 acides aminés ou moins en chacun des sites (par exemple 20 acides aminés ou moins, en particulier 10 acides aminés ou moins, en particulier 5 acides aminés ou moins). De manière appropriée, ces délétions ne se produisent pas dans la région d'un épitope et n'ont donc pas d'incidence significative sur les propriétés immunogènes de l'antigène.

L'homme du métier saura reconnaître que le variant d'une protéine peut contenir des substitutions, des délétions et des insertions (ou l'une quelconque de ces associations).

Les variants présentent de préférence une identité d'au moins environ 70 %, de préférence au moins environ 80 %, et de manière préférée entre toutes au moins environ 90 % (par exemple au moins environ 95 %, au moins environ 98 % ou au moins environ 99 %) avec la séquence de référence associée.

Les algorithmes BLAST et BLAST 2.0, qui sont décrits par Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) et Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivement, sont des exemples d'algorithmes appropriés



pour déterminer le pourcentage d'identité et de similarité entre deux séquences.

Un variant approprié de la protéine CS peut être un variant où certaines parties de la protéine CS sont sous la  
5 forme d'une protéine hybride avec l'antigène de surface S du virus de l'hépatite B (HBsAg). L'antigène du variant de CS peut par exemple être sous la forme d'une protéine hybride comprenant sensiblement toute la portion C-terminale de la protéine CS, quatre répétitions en tandem ou plus de la région  
10 immunodominante de la protéine CS, et HBsAg. La protéine hybride peut comprendre une séquence qui contient au moins 160 acides aminés et qui est sensiblement homologue à la portion C-terminale de la protéine CS, mais dépourvue de la séquence d'ancrage hydrophobe. La protéine CS peut être  
15 dépourvue des 12 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale. Elle peut par ailleurs contenir 4 ou plus, par exemple au moins 10 répétitions tétrapeptidiques Asn-Ala-Asn-Pro (NANP) ou plus.

La protéine hybride utilisée dans l'invention peut être  
20 une protéine qui comprend une portion de la protéine CS de *P. falciparum* correspondant sensiblement aux acides aminés 207-395 du clone 3D7 de *P. falciparum*, provenant de la souche NF54 fusionnée en phase par l'intermédiaire d'un lien « linker » linéaire à l'extrémité N-terminale de HBsAg. Le lien  
25 « linker » peut comprendre une portion de preS2 provenant de HBsAg. Les constructions de CS appropriées pour être utilisées dans la présente invention sont exposées dans le document WO 93/10152, qui a donné lieu aux États-Unis aux brevets US No. 5 928 902 et 6 169 171, ces deux documents étant intégrés  
30 par référence en vue de décrire les protéines appropriées à utiliser dans la présente invention.

La protéine hybride connue sous le nom de RTS (figure 2) [décrite dans le document WO93/10152 (où elle est désignée RTS\* et dans le document WO98/05355)] est une protéine hybride  
35 spécifique utilisée dans l'invention et est constituée de :

- un résidu méthionine
- trois résidus d'acides aminés : Met Ala Pro

- un allongement de 189 acides aminés représentant les acides aminés 207 à 395 de la protéine CS de *P. falciparum*, souche 3D7

- un résidu glycine

5       - quatre résidus d'acides aminés, Pro Val Thr Asn, représentant les quatre résidus de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine preS2 du virus de l'hépatite B (sérototype adw), et

10       - un allongement de 226 acides aminés, codé par les nucléotides 1653 à 2330, et désignant la protéine S du virus de l'hépatite B (sérototype adw).

Le RTS peut être sous la forme de particules mixtes de RTS,S. Les particules de RTS,S comprennent deux polypeptides, RTS et S, qui peuvent être synthétisés simultanément et former  
15 spontanément des structures particulières composites (RTS,S).

La protéine RTS peut être exprimée dans la levure, par exemple *S. cerevisiae*. Dans ce type d'hôte, la protéine RTS sera exprimée sous forme de particules de lipoprotéines. La souche de levure hôte peut déjà porter dans son génome  
20 plusieurs copies intégrées d'une cassette d'expression de S du virus de l'hépatite B. La souche résultante synthétise alors deux polypeptides, S et RTS, qui s'unissent spontanément pour former des particules mixtes de lipoprotéines (RTS,S). Ces particules peuvent présenter les séquences CSP de l'hybride à  
25 leur surface. Les antigènes RTS et S dans ces particules mixtes peuvent être présents en un rapport spécifique, par exemple 1:4.

Le RTS,S a été revu par exemple par Vekemans et al. (2009) *Vaccine* 275:G67 et Regules et al. (2011) *Expert Rev. Vaccines* 10:589.  
30

Dans un mode de réalisation, la première composition immunogène comprend entre 25 et 75, par exemple 50 microgrammes, de RTS,S et la seconde composition immunogène comprend entre 5 et 15, par exemple 10 microgrammes de RTS,S.

35       Dans un autre mode de réalisation, la première composition immunogène comprend entre 12,5 et 37,5, par exemple 25 microgrammes, de RTS,S et la seconde composition



immunogène comprend entre 2,5 et 7,5, par exemple 5 microgrammes de RTS,S.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est dérivé de la protéine CS de *P. vivax*. Des variants  
 5 appropriés de la protéine CS de *P. vivax* ont été décrits. Par exemple, le document WO2008009652, publié aux États-Unis sous la référence US20100150998 et intégré par référence en vue de décrire les protéines appropriées à utiliser dans la présente invention, décrit des protéines hybrides de fusion immunogènes  
 10 comprenant : a. au moins une unité répétée dérivée de la région répétée d'une protéine circumsporozoïte de type I de *P. vivax*, b. au moins une unité répétée dérivée de la région répétée d'une protéine circumsporozoïte de type II de *P. vivax*, et c. l'antigène de surface S dérivé du virus de  
 15 l'hépatite B, ou un fragment. La séquence SEQ ID NO : 17 du document WO2008009652 décrit une protéine hybride de fusion spécifique, appelée CVS-S. Lorsqu'elle s'exprime conjointement avec l'antigène de surface S dérivé du virus de l'hépatite B, il se forme des particules de CSV-S,S (WO2008009652). Ces  
 20 particules peuvent aussi être utilisées dans la présente invention.

Dans un autre mode de réalisation, l'antigène en commun est un mélange de particules comprenant RTS et CSV-S. Ces particules ont été décrites dans le document WO2008009650,  
 25 publié aux États-Unis sous la référence US20100062028 et intégré par référence en vue de décrire les protéines appropriées à utiliser dans la présente invention.

### Schémas d'immunisation, populations cibles et modes 30 d'administration

Comme décrit précédemment, la méthode de l'invention consiste à administrer une première composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs  
 35 antigènes et un second adjuvant.

Dans un mode de réalisation, le délai entre l'administration de la première composition et



l'administration de la seconde composition est compris entre 1 et 24 mois, par exemple entre 1 et 18 mois, par exemple entre 1 et 12 mois, par exemple entre 2 et 10 mois, par exemple entre 3 et 9 mois, par exemple entre 4 et 8 mois.

5           La méthode de l'invention peut comprendre une ou plusieurs autres administrations de compositions immunogènes en plus de l'administration de la première composition et de l'administration de la seconde composition. Le sujet peut, par exemple, recevoir plusieurs doses de la première composition  
10 avant l'administration de la seconde composition. Ainsi, par exemple, dans un mode de réalisation, la première composition est administrée deux fois avant l'administration de la seconde composition. Le sujet peut, sinon ou en plus, recevoir plusieurs autres doses de la seconde composition après la  
15 première administration de la seconde composition. Dans un mode de réalisation de la méthode de l'invention, la seconde composition est ainsi administrée une ou plusieurs autres fois. Voici les schémas possibles, non limitatifs :

- a. Première composition puis seconde composition
- 20   b. Première composition puis première composition puis seconde composition
- c. Première composition puis seconde composition puis seconde composition
- d. Première composition puis première composition puis  
25   première composition puis seconde composition
- e. Première composition puis première composition puis seconde composition puis seconde composition
- f. Première composition puis seconde composition puis seconde composition puis seconde composition

30   Les délais pour le schéma b. peuvent par exemple être 0, 1, 5 (c'est-à-dire Mois 0, Mois 1, Mois 5) ou 0, 1, 6 ou 0, 1, 7 ou 0, 1, 8 ou 0, 1, 12. De même, les délais pour le schéma c. peut par exemple être 0, 1, 5 ou 0, 1, 6 ou 0, 1, 7 ou 0, 1, 8 ou 0, 1, 12. Des délais plus courts pour les schémas b. et c.  
35 peuvent par exemple être Jour 0, Jour 7, Jour 14.

Dans un autre mode de réalisation, la seconde composition peut par exemple être administrée sous forme d'un rappel annuel récurrent, par exemple pendant 1 à 5 ans ou plus.

5 Le sujet humain à traiter selon la méthode de l'invention peut être de n'importe quel âge. La méthode de l'invention peut être utilisée dans le cadre d'un programme d'éradication du paludisme, auquel cas il peut être utile d'immuniser sensiblement la population tout entière, c'est-à-dire tout groupe d'âge. Dans un mode de réalisation, cependant, le sujet  
10 humain a plus de 18 ans lorsque la première composition est administrée. Dans un autre mode de réalisation, le sujet humain a moins de cinq ans lorsque la première composition est administrée. Dans un autre mode de réalisation, le sujet est âgé de 6 à 12 semaines ou de 5 à 17 mois. Les sujets voyageant  
15 dans les régions où le paludisme est endémique constituent une autre population particulièrement appropriée.

La première et la seconde composition peuvent être administrées par différentes voies appropriées, notamment la voie parentérale, par exemple intramusculaire ou sous-cutanée.

20 Dans un mode de réalisation particulier, la seconde composition est administrée en intradermique. Le terme intradermique, tel qu'il est utilisé ici, veut faire référence à l'application d'antigènes dans le derme et/ou l'épiderme du sujet humain. L'application intradermique d'une composition  
25 immunogène peut être effectuée par n'importe quelle méthode cutanée connue de l'homme du métier, y compris mais sans s'y limiter, au moyen d'un dispositif d'injection court (dispositif comprenant une micro-aiguille d'environ 0,2 à environ 0,6 mm de longueur) ou au moyen d'un timbre cutané.  
30 Les dispositifs appropriés utilisés avec les vaccins cutanés décrits ici comprennent les dispositifs à micro-aiguille par exemple ceux décrits dans les documents US 4,886,499, US 5,190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141,496, US 5,417,662 et EP1092444. Les  
35 vaccins cutanés peuvent aussi être administrés par des dispositifs qui limitent la profondeur de pénétration effective de l'aiguille dans la peau, par exemple ceux décrits



dans le document WO99/34850. Les dispositifs d'injection à jet qui administrent des vaccins liquides dans le derme par l'intermédiaire d'un injecteur à jet liquide ou d'une aiguille conviennent également. Les dispositifs d'administration de poudre/particule balistique qui utilisent un gaz comprimé pour que le vaccin sous forme de poudre traverse rapidement les couches externes de la peau pour accéder au derme conviennent également. Les timbres cutanés comprennent généralement un support contenant un substrat solide. Les timbres administrent l'antigène et l'adjuvant de l'invention dans le derme ou l'épiderme. Dans un mode de réalisation particulier, les timbres de la présente invention comprennent plusieurs microprojections. Les microprojections peuvent avoir n'importe quelle forme appropriée pour pouvoir percer le stratum corneum, l'épiderme et/ou le derme, et administrer l'antigène et l'adjuvant dans l'épiderme ou le derme. Dans un mode de réalisation particulier, les microprojections sont biodégradables et comprennent un polymère biodégradable.

Les compositions immunogènes utilisées dans l'invention peuvent être fabriquées en mélangeant le ou les antigènes et l'adjuvant. Ledit antigène peut être fourni sous forme lyophilisée ou dans une préparation liquide. Pour chaque composition, un kit peut être fourni comprenant un premier récipient contenant l'antigène et un second récipient contenant l'adjuvant.

De manière appropriée, les compositions immunogènes selon la présente invention ont un volume-dose humain compris entre 0,05 ml et 1 ml, par exemple entre 0,1 et 0,5 ml, en particulier un volume-dose d'environ 0,5 ml, ou 0,7 ml. Le volume de la seconde composition immunogène peut être réduit, et être compris par exemple entre 0,05 ml et 0,5 ml, par exemple entre 0,1 et 0,2 ml. Les volumes des compositions utilisés peuvent dépendre des voies d'administration, les plus petits volumes étant administrés par voie intradermique.

Les références figurant dans la présente demande, y compris les demandes de brevet et les brevets délivrés, sont toutes intégrées ici par référence. Les termes « comprenant »,



« comprennent » et « comprend », utilisés ici, peuvent éventuellement être substitués par les termes « consistant en », « constitués par » et « constitué par », respectivement. L'exemple suivant permet de poursuivre la description de la présente invention, mais n'est pas limitatif pour autant :

**EXEMPLE : Vaccination utilisant le RTS,S et l'adjuvant AS01 et « challenge » expérimental du paludisme.**

Vaccin

10 Le RTS,S est produit dans une levure (*S. cerevisiae*) essentiellement comme décrit dans le document WO 93/10152.

Une dose « standard » de RTS,S/AS01 contient 50 µg d'antigène RTS,S lyophilisé reconstitué dans 500 µl d'adjuvant AS01 contenant les immunostimulants 3D-MPL®  
 15 (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA) et QS21 (50 µg de chaque) dans une préparation avec liposomes.

Une « fraction de dose » de RTS,S/AS01 représente 100 µl de la solution ci-dessus, c'est-à-dire qu'elle contient 10 µg d'antigène RTS,S lyophilisé, 10 µg de 3D-MPL et 10 µg de QS21  
 20 avec liposomes.

Méthodologie

Un essai clinique a été effectué pour évaluer la tolérance, la réactogénicité et l'efficacité d'un vaccin  
 25 antipaludique contenant l'antigène RTS,S et l'adjuvant AS01 vis-à-vis d'un « challenge aux sporozoïtes », ledit vaccin étant administré en intramusculaire chez des volontaires sains âgés de 18 à 50 ans n'ayant jamais été touchés par le paludisme. Le groupe « fraction de dose administrée ultérieurement » a reçu deux doses standard, à 0 et 1 mois, et  
 30 une fraction de dose [un cinquième (1/5<sup>e</sup>) de la dose standard] à 7 mois. Le groupe « 0, 1, 2 mois » a reçu trois doses standard à un mois d'intervalle.

46 sujets ont été recrutés en deux cohortes et ont été  
 35 répartis dans les groupes susmentionnés : « fraction de dose administrée ultérieurement » (30 sujets) et « 0, 1, 2 mois » (16 sujets). 12 autres sujets ont été inclus dans le groupe

témoin « infectiosité », c'est-à-dire des volontaires qui n'ont reçu aucune immunisation, mais qui ont été soumis au « challenge aux sporozoïtes ».

Pour chaque cohorte, les volontaires ont été soumis à un  
5 « challenge primaire » standardisé du paludisme (Chulay et al. (1986) *Am J Trop Med Hyg.* 35:66), également connu sous le nom de « challenge aux sporozoïtes », environ 3 semaines après la troisième dose de chacun des groupes ci-dessus. Le « challenge primaire » consistait à laisser cinq moustiques *Anopheles*  
10 *stevensi* infectés par le sporozoïte de *P. falciparum* piquer chacun des volontaires pendant une période de cinq minutes.

Après le « challenge », les sujets ont été suivis quotidiennement pendant au moins 30 jours pour étudier chez eux le développement ou l'absence de développement de  
15 l'infection. La détection de l'infection consistait à repérer, par microscopie optique et après coloration de May-Grünwald Giemsa, des parasites au stade asexué dans du sang périphérique. La présence de parasites au stade asexué indique que le sujet se trouve à un stade d'infection productive, avec  
20 des parasites qui ont été libérés du foie et qui progressent vers le stade érythrocytaire, ce qui signifie que la protection stérile vis-à-vis du « challenge » n'est pas effective.

Au premier signe d'infection, les sujets ont été déclarés  
25 positifs au paludisme et ont reçu une dose curative de chloroquine. La protection stérile, autrement dit le sujet ne développe jamais de parasitémie de stade asexué, constituait le critère d'efficacité primaire. Par ailleurs, le délai entre le « challenge » et l'apparition d'une parasitémie chez ceux  
30 qui n'étaient pas complètement protégés a été enregistré. La protection a été évaluée par la proportion de participants immunisés qui sont restés exempts de l'infection à *P. falciparum* après « challenge aux sporozoïtes » et par un délai de la période d'incubation parasitaire conduisant à  
35 l'infection.

L'efficacité vaccinale (EV) est définie par le calcul :  $100 \times (1 - \text{Risque relatif})$ . Le test exact de probabilité de Fisher

a été utilisé pour comparer l'incidence du paludisme entre chacun des groupes « fraction de dose administrée ultérieurement » et « 0, 1, 2 mois » et le groupe témoin « infectiosité ».

5

Résultats

| Groupes                                     | Nombre de sujets vaccinés | Nombre de sujets vaccinés développant une parasitémie après le « challenge »** | Estimation de l'efficacité vaccinale (EV) |
|---|---------------------------|--|---|
| Fraction de dose administrée ultérieurement | 30                        | 4  | 87  |
| 0, 1, 2 mois                                | 16                        | 6  | 63  |

\* Test de Mantel-Haenszel (délai du développement d'une parasitémie), Fx par rapport à RRR p = 0,0455.

10 \*\* Parasitémie mesurée à J28 après le « challenge ».

La puissance de l'étude n'a pas permis de détecter une supériorité du groupe « fraction de dose administrée ultérieurement » par rapport au groupe « 0, 1, 2 mois », et la différence entre les deux groupes n'est pas statistiquement significative (augmentation de l'EV du groupe Fx par rapport au groupe RRR = 57,0 %, [-7,9-88,3], p=0,0741, test de Fisher). Cependant, l'analyse de la différence du délai de survie du groupe « fraction de dose administrée ultérieurement » par rapport au groupe « 0, 1, 2 mois », qui tient compte du délai d'apparition de l'infection dans le groupe « fraction de dose administrée ultérieurement », a bien une signification statistique (p = 0,0455, test de Mantel-Haensze).

Par ailleurs, l'analyse comparant les résultats du bras « fraction de dose administrée ultérieurement » de l'étude par rapport à des données groupées concernant 95 sujets étudiés dans cinq essais RTS,S/AS01 de 0, 1, 2 mois qui sont terminés à ce jour (données non présentées), indique

25



que les résultats obtenus dans la présente étude relèvent très peu probablement du hasard ( $p = 0,0045$ , test de Fisher).

### Revendications

1. Méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première  
5 composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant comprenant un  
10 agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux composants en commun et

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- 15 • l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que la première composition,

à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.  
20

2. Méthode selon la revendication 1, le premier adjuvant et le second adjuvant étant constitués des mêmes composants.

25 3. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le premier adjuvant et le second adjuvant étant constitués des mêmes composants dans les mêmes proportions relatives.

30 4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant.

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications  
35 précédentes, la quantité du composant en commun présente dans le second adjuvant étant au moins 10 % plus faible, par exemple au moins 25 % plus faible, par exemple au moins deux

fois plus faible, par exemple au moins trois fois plus faible, par exemple au moins quatre fois plus faible, par exemple au moins cinq fois plus faible, par exemple au moins six fois plus faible, par exemple au moins sept fois plus faible, par exemple au moins huit fois plus faible, par exemple au moins neuf fois plus faible, par exemple au moins dix fois plus faible, par exemple au moins 15 fois plus faible, par exemple au moins 20 fois plus faible que la quantité présente dans le premier adjuvant.

10

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la quantité du composant en commun présente dans le second adjuvant étant entre 2 et 50 fois plus faible, par exemple entre 2 et 20 fois plus faible, par exemple entre 2 et 15 fois plus faible, par exemple entre 2 et 10 fois plus faible, par exemple entre 3 et 7 fois plus faible, par exemple entre 4 et 6 fois plus faible que la quantité présente dans le premier adjuvant.

15

20

7. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR, et l'agoniste de TLR étant un agoniste de TLR4, par exemple le 3D-MPL.

25

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le premier et le second adjuvant comprenant une saponine immunologiquement active, par exemple la QS21, et éventuellement un stérol.

30

9. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le premier et le second adjuvant comprenant le 3D-MPL et la QS21 dans une préparation liposomale.

35

10. Méthode selon la revendication 9, le premier adjuvant comprenant entre 25 et 75, par exemple 50 microgrammes, de 3D-MPL et entre 25 et 75, par exemple 50 microgrammes de QS21 et le second adjuvant comprenant entre 5 et 15, par exemple



10 microgrammes de 3D-MPL et entre 5 et 15, par exemple 10 microgrammes de QS21.

11. Méthode selon la revendication 9, le premier adjuvant  
5 comprenant entre 12,5 et 37,5, par exemple 25 microgrammes, de 3D-MPL et entre 12,5 et 37,5, par exemple 25 microgrammes de QS21 et le second adjuvant comprenant entre 2,5 et 7,5, par exemple 5 microgrammes de 3D-MPL et entre 2,5 et 7,5, par exemple 5 microgrammes de QS21.

10

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le premier adjuvant et/ou le second adjuvant ne comprenant pas d'aluminium.

15

13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la seconde composition contenant une quantité de l'antigène en commun plus faible que la première composition.

20

14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la quantité de l'antigène en commun présente dans la seconde composition étant au moins 10 % plus faible, par exemple au moins 25 % plus faible, par exemple au moins deux fois plus faible, par exemple au moins trois fois plus faible, par exemple au moins quatre fois plus faible, par exemple au moins cinq fois plus faible, par exemple au moins six fois plus faible, par exemple au moins sept fois plus faible, par exemple au moins huit fois plus faible, par exemple au moins neuf fois plus faible, par exemple au moins dix fois plus faible, par exemple au moins 15 fois plus faible, par exemple au moins 20 fois plus faible que la quantité présente dans la première composition.

30

15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la quantité de l'antigène en commun présente dans  
35 la seconde composition étant entre 2 et 50 fois plus faible, par exemple entre 2 et 20 fois plus faible, par exemple entre 2 et 15 fois plus faible, par exemple entre 2 et 10 fois plus

faible, par exemple entre 3 et 7 fois plus faible, par exemple entre 4 et 6 fois plus faible que la quantité présente dans la première composition.

5           16. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, les antigènes contenus dans la première et la seconde composition étant tous identiques.

10           17. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, l'antigène en commun étant un antigène de *Plasmodium*, par exemple un antigène de *P. falciparum* ou de *P. vivax*.

15           18. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, l'antigène en commun étant la protéine circumsporozoïte ou un fragment immunogène ou un variant de celle-ci.

20           19. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, l'antigène en commun étant sélectionné dans le groupe constitué par : RTS, CSV-S, RTS,S et CSV-S,S et des particules mixtes comprenant RTS et CSV-S.

25           20. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le délai entre l'administration de la première composition et l'administration de la seconde composition étant compris entre 1 et 24 mois, par exemple entre 1 et 18 mois, par exemple entre 1 et 12 mois, par exemple entre 2 et 10 mois, par exemple entre 3 et 9 mois, par exemple entre 4 et  
30           8 mois.

35           21. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la première composition immunogène étant administrée deux fois avant l'administration de la seconde composition immunogène.

22. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la seconde composition étant administrée une ou plusieurs fois après sa première administration.

5        23. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, le sujet humain étant âgé de plus de 18 ans au moment de l'administration de la première composition.

10       24. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, le sujet humain étant âgé de moins de cinq ans au moment de l'administration de la première composition.

15       25. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, la seconde administration étant effectuée par voie intradermique.

20       26. Composition immunogène destinée à être utilisée dans une méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme, la méthode consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant  
25       comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux composants en commun et

- le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde composition contenant une quantité de RTS,S plus faible que la première composition,

30       à condition que la première et la seconde composition ne  
35       comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.



27. Composition immunogène selon la revendication 26 comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une quelconque des revendications 2 à 25.

- 5           28. Utilisation d'une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant dans la fabrication d'un médicament permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme, ledit sujet ayant déjà reçu une première composition immunogène comprenant un ou plusieurs
- 10 antigènes et un premier adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène en commun, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine immunologiquement active et ayant au moins l'un de ces deux composants en commun
- 15           • le second adjuvant contenant une quantité du composant en commun plus faible que le premier adjuvant, et/ou
- l'antigène en commun étant le RTS,S et la seconde composition contenant une quantité de RTS,S plus
- 20 faible que la première composition,
- à condition que la première et la seconde composition ne comprennent pas toutes les deux le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.

- 25           29. Utilisation selon la revendication 28 comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une quelconque des revendications 2 à 25.

- 30           30. Méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant un ou plusieurs antigènes et un second adjuvant, la première et la seconde composition ayant au moins un antigène
- 35 en commun, le premier et le second adjuvant comprenant le 3D-MPL et la QS21 dans une préparation liposomale dans les mêmes proportions relatives, la seconde composition contenant une

quantité d'antigène plus faible et/ou une quantité d'adjuvant plus faible que la première composition.

5 31. Méthode selon la revendication 30 comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une quelconque des revendications 2 à 25.

10 32. Méthode permettant d'induire chez l'homme une réponse immunitaire contre le paludisme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant le RTS,S et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant le RTS,S et un second adjuvant, le premier et le second adjuvant comprenant un agoniste de TLR4 et/ou une saponine immunologiquement active dans les mêmes  
15 proportions relatives, la seconde composition contenant une quantité d'adjuvant plus faible que la première composition, à condition que la première composition ne comprenne pas toutes le RTS,S et la QS21 et le 3D-MPL associés à une émulsion huile dans l'eau.

20

33. Méthode selon la revendication 32 comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une quelconque des revendications 2 à 25.

25

34. Méthode permettant d'induire chez l'homme une réponse immunitaire contre le paludisme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant le RTS,S et un premier adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant le RTS,S et un second adjuvant, le  
30 premier et le second adjuvant étant constitués de 3D-MPL et de QS21 dans une préparation liposomale dans les mêmes proportions relatives, la seconde composition contenant une quantité d'antigène plus faible et/ou une quantité d'adjuvant plus faibles que la première composition.

35

35. Méthode selon la revendication 34 comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une quelconque des revendications 2 à 25.

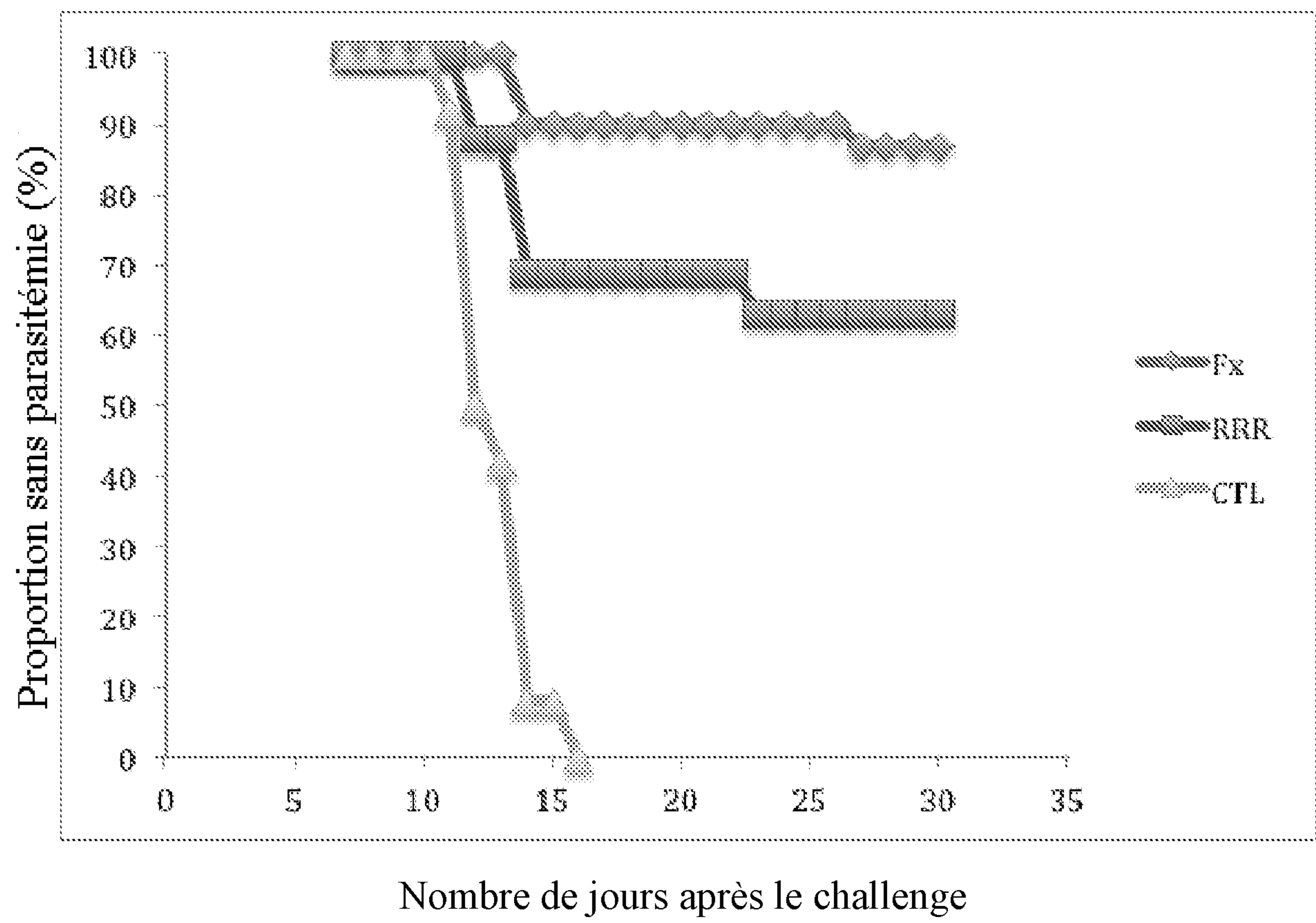
- 5           36. Méthode permettant d'induire une réponse immunitaire chez l'homme et consistant à administrer au sujet une première composition immunogène comprenant le RTS,S et un adjuvant, puis une seconde composition immunogène comprenant RTS,S, l'adjuvant comprenant un agoniste de TLR et/ou une saponine  
10 immunologiquement active, la seconde composition immunogène ne comprenant pas d'adjuvant.

37. Méthode selon la revendication 36, l'adjuvant comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une  
15 quelconque des revendications 7 à 9 ou 12.

38. Méthode selon la revendication 36 ou 37, comprenant une ou plusieurs des caractéristiques de l'une quelconque des revendications 13 à 25.  
20

          39. Méthode selon l'une quelconque des revendications 36 à 38, la première et la seconde composition comprenant toutes les deux 25 microgrammes de RTS,S ou 50 microgrammes de RTS,S.



**Figure 1**

## Figure 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Met | Ala | Pro | Asp | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | 20  | 25  | 30  |     |
| Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | 35  | 40  | 45  |     |
| Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | 50  | 55  | 60  |     |
| Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Ala | Asn | Pro | Asn | Lys | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Asn | Asn | Gln | Gly | Asn | Gly | Gln | Gly | His | Asn | Met | Pro | Asn | Asp | Pro | Asn | 85  | 90  | 95  |     |
| Arg | Asn | Val | Asp | Glu | Asn | Ala | Asn | Ala | Asn | Ser | Ala | Val | Lys | Asn | Asn | 100 | 105 | 110 |     |
| Asn | Asn | Glu | Glu | Pro | Ser | Asp | Lys | His | Ile | Lys | Glu | Tyr | Leu | Asn | Lys | 115 | 120 | 125 |     |
| Ile | Gln | Asn | Ser | Leu | Ser | Thr | Glu | Trp | Ser | Pro | Cys | Ser | Val | Thr | Cys | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Asn | Gly | Ile | Gln | Val | Arg | Ile | Lys | Pro | Gly | Ser | Ala | Asn | Lys | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Lys | Asp | Glu | Leu | Asp | Tyr | Ala | Asn | Asp | Ile | Glu | Lys | Lys | Ile | Cys | Lys | 165 | 170 | 175 |     |
| Met | Glu | Lys | Cys | Ser | Ser | Val | Phe | Asn | Val | Val | Asn | Ser | Ser | Ile | Gly | 180 | 185 | 190 |     |
| Leu | Gly | Pro | Val | Thr | Asn | Met | Glu | Asn | Ile | Thr | Ser | Gly | Phe | Leu | Gly |     |     |     |     |

| 195   | 200 | 205     |
|---|-----|---------|
| Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu |     |         |
| 210   | 215 | 220     |
| Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu |     |         |
| 225   | 230 | 235 240 |
| Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser |     |         |
|   | 245 | 250 255 |
| Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp |     |         |
|   | 260 | 265 270 |
| Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys |     |         |
|   | 275 | 280 285 |
| Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val |     |         |
|   | 290 | 295 300 |
| Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Asn Thr Gly Pro Cys Lys |     |         |
| 305   | 310 | 315 320 |
| Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys |     |         |
|   | 325 | 330 335 |
| Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser |     |         |
|   | 340 | 345 350 |
| Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe |     |         |
|   | 355 | 360 365 |
| Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu |     |         |
|   | 370 | 375 380 |
| Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly |     |         |
| 385   | 390 | 395 400 |
| Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile |     |         |
|   | 405 | 410 415 |
| Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile                                 |     |         |
|   | 420 |         |



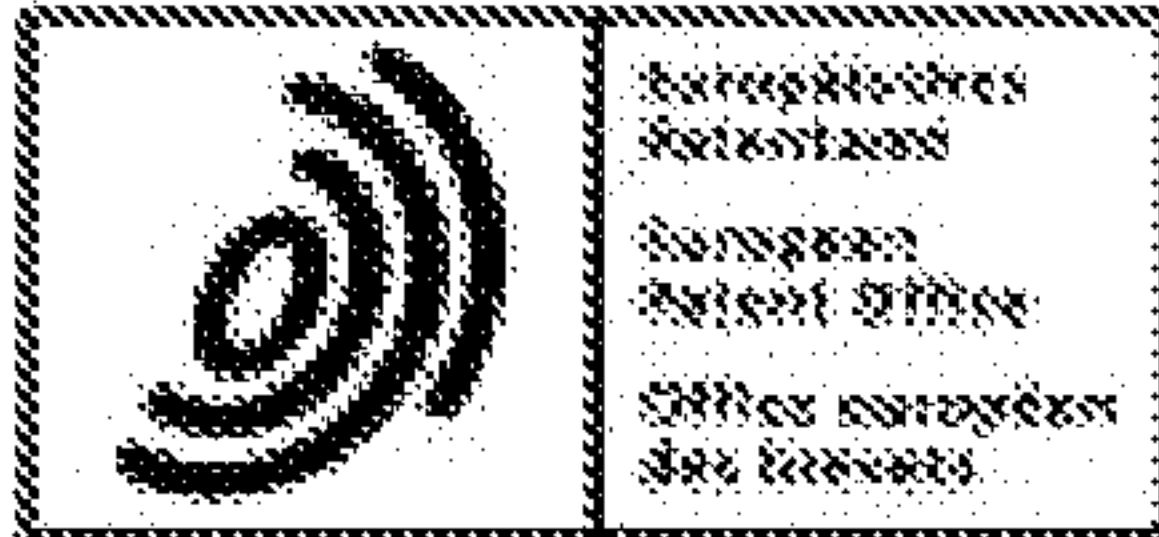
## Figure 3

<213> gE tronquée de VZV

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Thr | Val | Asn | Lys | Pro | Val | Val | Gly | Val | Leu | Met | Gly | Phe | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ile | Ile | Thr | Gly | Thr | Leu | Arg | Ile | Thr | Asn | Pro | Val | Arg | Ala | Ser | Val |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu | Arg | Tyr | Asp | Asp | Phe | His | Ile | Asp | Glu | Asp | Lys | Leu | Asp | Thr | Asn |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser | Val | Tyr | Glu | Pro | Tyr | Tyr | His | Ser | Asp | His | Ala | Glu | Ser | Ser | Trp |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Val | Asn | Arg | Gly | Glu | Ser | Ser | Arg | Lys | Ala | Tyr | Asp | His | Asn | Ser | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Tyr | Ile | Trp | Pro | Arg | Asn | Asp | Tyr | Asp | Gly | Phe | Leu | Glu | Asn | Ala | His |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Glu | His | His | Gly | Val | Tyr | Asn | Gln | Gly | Arg | Gly | Ile | Asp | Ser | Gly | Glu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Arg | Leu | Met | Gln | Pro | Thr | Gln | Met | Ser | Ala | Gln | Glu | Asp | Leu | Gly | Asp |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Asp | Thr | Gly | Ile | His | Val | Ile | Pro | Thr | Leu | Asn | Gly | Asp | Asp | Arg | His |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Lys | Ile | Val | Asn | Val | Asp | Gln | Arg | Gln | Tyr | Gly | Asp | Val | Phe | Lys | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Leu | Asn | Pro | Lys | Pro | Gln | Gly | Gln | Arg | Leu | Ile | Glu | Val | Ser | Val |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Glu | Glu | Asn | His | Pro | Phe | Thr | Leu | Arg | Ala | Pro | Ile | Gln | Arg | Ile | Tyr |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Val | Arg | Tyr | Thr | Glu | Thr | Trp | Ser | Phe | Leu | Pro | Ser | Leu | Thr | Cys |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Thr | Gly | Asp | Ala | Ala | Pro | Ala | Ile | Gln | His | Ile | Cys | Leu | Lys | His | Thr |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Thr | Cys | Phe | Gln | Asp | Val | Val | Val | Asp | Val | Asp | Cys | Ala | Glu | Asn | Thr |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Lys | Glu | Asp | Gln | Leu | Ala | Glu | Ile | Ser | Tyr | Arg | Phe | Gln | Gly | Lys | Lys |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Ala | Asp | Gln | Pro | Trp | Ile | Val | Val | Asn | Thr | Ser | Thr | Leu | Phe | Asp |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | 260 |     | 265 |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Leu | Glu | Leu | Asp | Pro | Pro | Glu | Ile | Glu | Pro | Gly | Val | Leu | Lys | Val |
|     | 275 |     | 280 |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Arg | Thr | Glu | Lys | Gln | Tyr | Leu | Gly | Val | Tyr | Ile | Trp | Asn | Met | Arg |
|     | 290 |     | 295 |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Asp | Gly | Thr | Ser | Thr | Tyr | Ala | Thr | Phe | Leu | Val | Thr | Trp | Lys |
| 305 |     |     | 310 |     | 315 |     | 320 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Asp | Glu | Lys | Thr | Arg | Asn | Pro | Thr | Pro | Ala | Val | Thr | Pro | Gln | Pro |
|     | 325 |     | 330 |     | 335 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Gly | Ala | Glu | Phe | His | Met | Trp | Asn | Tyr | His | Ser | His | Val | Phe | Ser |
|     | 340 |     | 345 |     | 350 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Gly | Asp | Thr | Phe | Ser | Leu | Ala | Met | His | Leu | Gln | Tyr | Lys | Ile | His |
|     | 355 |     | 360 |     | 365 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Ala | Pro | Phe | Asp | Leu | Leu | Leu | Glu | Trp | Leu | Tyr | Val | Pro | Ile | Asp |
|     | 370 |     | 375 |     | 380 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Thr | Cys | Gln | Pro | Met | Arg | Leu | Tyr | Ser | Thr | Cys | Leu | Tyr | His | Pro |
| 385 |     |     | 390 |     | 395 |     | 400 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Ala | Pro | Gln | Cys | Leu | Ser | His | Met | Asn | Ser | Gly | Cys | Thr | Phe | Thr |
|     | 405 |     | 410 |     | 415 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Pro | His | Leu | Ala | Gln | Arg | Val | Ala | Ser | Thr | Val | Tyr | Gln | Asn | Cys |
|     | 420 |     | 425 |     | 430 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | His | Ala | Asp | Asn | Tyr | Thr | Ala | Tyr | Cys | Leu | Gly | Ile | Ser | His | Met |
|     | 435 |     | 440 |     | 445 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Pro | Ser | Phe | Gly | Leu | Ile | Leu | His | Asp | Gly | Gly | Thr | Thr | Leu | Lys |
|     | 450 |     | 455 |     | 460 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Val | Asp | Thr | Pro | Glu | Ser | Leu | Ser | Gly | Leu | Tyr | Val | Phe | Val | Val |
| 465 |     |     | 470 |     | 475 |     | 480 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Phe | Asn | Gly | His | Val | Glu | Ala | Val | Ala | Tyr | Thr | Val | Val | Ser | Thr |
|     | 485 |     | 490 |     | 495 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Asp | His | Phe | Val | Asn | Ala | Ile | Glu | Glu | Arg | Gly | Phe | Pro | Pro | Thr |
|     | 500 |     | 505 |     | 510 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Gln | Pro | Pro | Ala | Thr | Thr | Lys | Pro | Lys | Glu | Ile | Thr | Pro | Val |
|     | 515 |     | 520 |     | 525 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Pro | Gly | Thr | Ser | Pro | Leu | Ile | Arg | Tyr | Ala | Ala | Trp | Thr | Gly | Gly |
|     | 530 |     | 535 |     | 540 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Ala |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 545 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |



# RAPPORT DE RECHERCHE

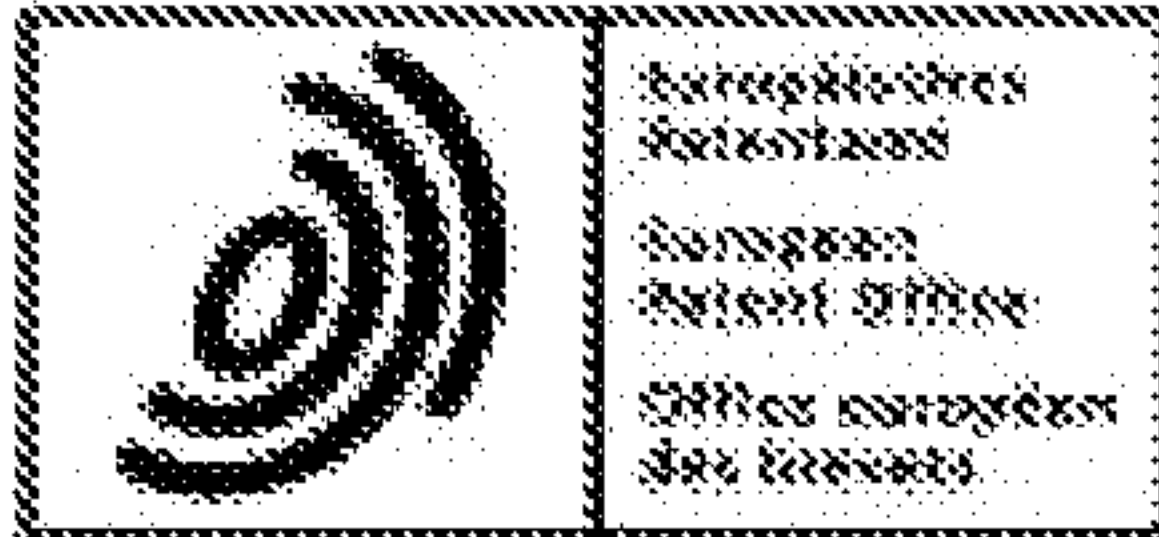
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

BO 11108  
BE 201505209

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS  |  |                          |  |
|--|--|--------------------------|--|
| Catégorie  | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes  | Revendication concernée  | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)                             |
| X,D  | STOUTE J A ET AL: "A PRELIMINARY EVALUATION OF A RECOMBINANT CIRCUMSPOROZOITE PROTEIN VACCINE AGAINST PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, US, vol. 336, no. 2, 9 janvier 1997 (1997-01-09), pages 86-91, XP000990284, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJM199701093360202<br>* le document en entier * | 1-12,<br>16-31,<br>34,35 | INV.<br>A61K39/002<br>A61K39/015<br>A61K39/29<br>A61K39/39 |
| A  | HILL ADRIAN V S: "Vaccines against malaria", PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF LONDON. SERIES B: BIOLOGICAL SCIENCES, ROYAL SOCIETY OF LONDON, LONDON, GB, vol. 366, no. 1579, 12 octobre 2011 (2011-10-12), pages 2806-2814, XP002700406, ISSN: 0080-4622, DOI: 10.1098/RSTB.2011.0091<br>* le document en entier *                            | 1-12,<br>16-31,<br>34,35 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)<br>A61K               |
| X  | W. R. BALLOU: "The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons", PARASITE IMMUNOLOGY, vol. 31, no. 9, 1 septembre 2009 (2009-09-01), pages 492-500, XP055208451, ISSN: 0141-9838, DOI: 10.1111/j.1365-3024.2009.01143.x<br>* le document en entier *  | 1-9,<br>12-29,<br>32,33  |  |
| -/-  |  |                          |  |
| Date d'achèvement de la recherche  |  | Examinateur              |  |
| 7 septembre 2015   |  | Scheffzyk, Ingrid        |  |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X: particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A: art de l'état de la technique<br/>O: divulgation non écrite<br/>P: document prioritaire</p> <p>X: théorie ou principe à la base de l'invention<br/>E: document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br/>O: cité dans la demande<br/>L: cité pour d'autres raisons<br/>S: membre de la même famille, document correspondant</p> |  |                          |  |

1





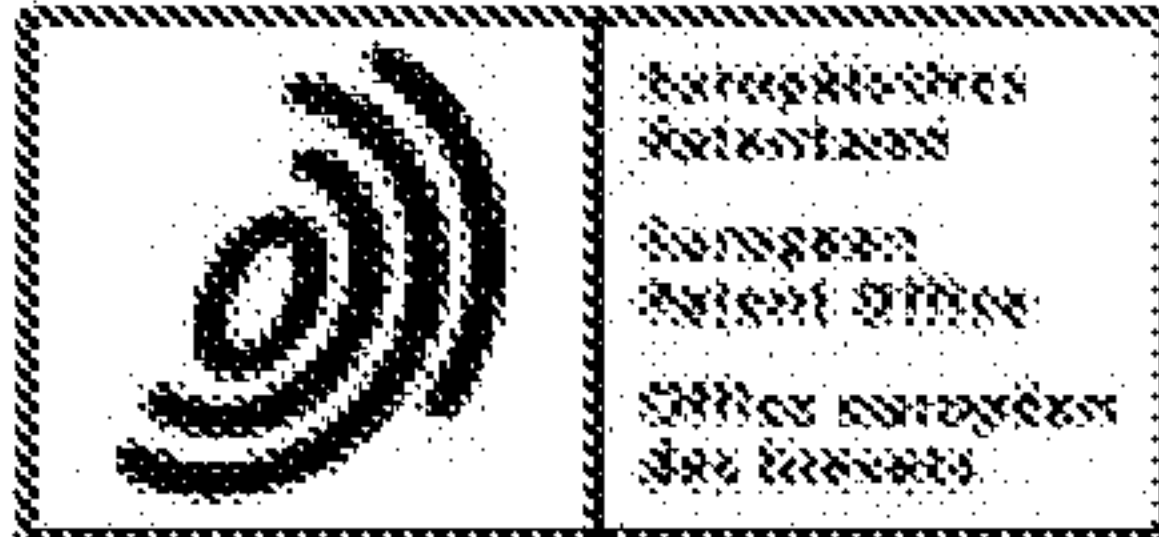
# RAPPORT DE RECHERCHE

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

BO 11108  
BE 201505209

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS  |   |  |                                      |
|--|---|--|--------------------------------------|
| Catégorie  | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes   | Revendication concernée  | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)       |
| X  | STOUTE J A ET AL: "LONG-TERM EFFICACY AND IMMUNE RESPONSES FOLLOWING IMMUNIZATION WITH THE RTS,S MALARIA VACCINE", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, JID, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, vol. 178, no. 4, 1 octobre 1998 (1998-10-01), pages 1139-1144, XP008046110, ISSN: 0022-1899, OOI: 10.1086/515657<br>* le document en entier * | 1-12, 16-31, 34,35   |                                      |
| A  | ELENA MATA ET AL: "Malaria Vaccine Adjuvants: Latest Update and Challenges in Preclinical and Clinical Research", BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, vol. 6, no. 5, 1 janvier 2013 (2013-01-01), pages 599-19, XP055208483, ISSN: 2314-6133, OOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.08.039<br>* le document en entier *  | 1-35   |                                      |
| A  | L. C. PAOLETTI ET AL: "Effects of Alum Adjuvant or a Booster Dose on Immunogenicity during Clinical Trials of Group B Streptococcal Type III Conjugate Vaccines", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 69, no. 11, 1 novembre 2001 (2001-11-01), pages 6696-6701, XP055208551, ISSN: 0019-9567, OOI: 10.1128/IAI.69.11.6696-6701.2001                   | 36-39  | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) |
| -/-  |   |  |                                      |
| Date d'achèvement de la recherche  |   | Examinateur  |                                      |
| 7 septembre 2015   |   | Scheffzyk, Ingrid  |                                      |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES  |   |  |                                      |
| X: particulièrement pertinent à lui seul<br>Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A: art de l'état technique<br>O: divulgation non écrite<br>P: document prioritaire |   | Y: théorie ou principe à la base de l'invention<br>E: document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>O: cité dans la demande<br>L: cité pour d'autres raisons<br>&: membre de la même famille, document correspondant |                                      |

1



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

BO 11108  
 BE 201505209

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS   |   |                         |                                      |
|---|---|-------------------------|--------------------------------------|
| Catégorie   | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes   | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)       |
| A   | GIOVANNI GABUTTI ET AL: "Booster Vaccination: The Role of Reduced Antigen Content Vaccines as a Preschool Booster",<br>BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL,<br>vol. 60, no. 1,<br>1 janvier 2014 (2014-01-01), pages 13-10,<br>XP055192849,<br>ISSN: 2314-6133, DOI:<br>10.4103/0974-777X.77298<br>* le document en entier *<br>***** | 13-15                   |                                      |
|   |   |                         | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) |
| Date d'achèvement de la recherche   |   | Examinateur             |                                      |
| 7 septembre 2015  |   | Scheffzyk, Ingrid       |                                      |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES<br>X: particulièrement pertinent à lui seul<br>Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A: état de l'art technologique<br>O: divulgation non écrite<br>P: document prioritaire<br>T: théorie ou principe à la base de l'invention<br>E: document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D: cité dans la demande<br>L: cité pour d'autres raisons<br>&: membre de la même famille, document correspondant |   |                         |                                      |

1  
 1997/06/29 09:00:00





## OPINION ÉCRITE

|   |   |  |                           |
|---|---|--|---------------------------|
| Dossier n°<br>BO11108   | Date du dépôt (jour/mois/année)<br>02.04.2015 | Date de priorité (jour/mois/année)<br>02.04.2014 | Demande n°<br>BE201505209 |
| Classification internationale des brevets (CIB)<br>INV. A61K39/002 A61K39/015 A61K39/29 A61K39/39 |   |  |                           |
| Déposant<br>GlaxoSmithKline Biologicals S.A.  |   |  |                           |

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

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

|                                |
|--------------------------------|
| Examineur<br>Schellzyk, Ingrid |
|--------------------------------|



## OPINION ÉCRITE

Demande n°

BE201505209

---

### Cadre n° I Base de l'opinion

---

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
  - a. Nature de l'élément:
    - ☐ un listage de la ou des séquences
    - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
  - b. Type de support:
    - ☐ sur papier
    - ☐ sous forme électronique
  - c. Moment du dépôt ou de la remise:
    - ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée
    - ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
    - ☐ remis ultérieurement
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

---

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

---

**1. Déclaration**

|  |       |                |                       |
|--|-------|----------------|-----------------------|
| Nouveauté                              | Oui : | Revendications | 10, 11, 30, 31, 34-39 |
|  | Non : | Revendications | 1-9, 12-29, 32, 33    |
| Activité inventive                     | Oui : | Revendications |                       |
|  | Non : | Revendications | 1-39                  |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : | Revendications | 1-39                  |
|  | Non : | Revendications |                       |

**2. Citations et explications**

voir feuille séparée

---

**Cadre n° VIII Observations relatives à la demande**

---

voir feuille séparée

## SECTION V

Ballou et al. (D1) (voir page 493, colonne à droite, troisième paragraphe) détruit la nouveauté des revendications 1-9, 12-29, 32 et 33.

Les revendications 10, 11, 30, 31, 34 et 35 manquent d'activité inventive car QS21 et 3D-MPL sont des composantes bien connues dans des préparations adjuvantes liposomales avec RTS,S (voir par exemple Mata et al., (D2)). L'omission de l'adjuvant dans la deuxième composition immunogène manque aussi l'activité inventive (voir p.e. Paoletti et al. (D3, page 6697, colonne à droite, troisième paragraphe)).

## SECTION VIII

1). L'objet revendiqué n'est pas techniquement soutenue sur l'ensemble du domaine revendiqué car l'exemple 1 donné dans la demande démontre seulement d'option relative à l'antigène commun réduit RTS,S et une réduction de l'adjuvant dans le deuxième immunogène composition d'une formulation liposomale.

2). Le terme "de l'une quelconque des revendications x-y" utilisée dans des revendications 27, 29, 31, 33, 35 rend imprécise l'étendue de ces revendications.