

## **(12) BREVET D'INVENTION BELGE**

(47) Date de publication : 05/03/2018

(21) Numéro de demande : BE2016/5782

(22) Date de dépôt : 19/10/2016

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C07K 14/505, A61K 38/00, A61K 39/09, A61K 39/00, A61K 47/64

(30) Données de priorité :

21/10/2015 GB 1518684.4

(73) Titulaire(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA  
1330, RIXENSART  
Belgique

(72) Inventeur(s) :

BERTAUD Elisabeth Marie Monique  
1330 RIXENSART  
Belgique

BIEMANS Ralph Leon  
1330 RIXENSART  
Belgique

MONOTTE Nicolas Jean Benoit  
1330 RIXENSART  
Belgique

STRODIOT Laurent  
1330 RIXENSART  
Belgique

**(54) VACCIN**

(57) La présente invention concerne le domaine des vaccins à conjugués de saccharides capsulaires pneumococciques. Plus précisément, la présente invention concerne des polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, en particulier des polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A dont la taille moyenne (par exemple, Mw) est située entre 100 et 1000 kDa, conjugués de manière appropriée à une protéine porteuse.

Figure 1: Evaluation de conjuguée PS6A dans une formulation 14V AlPO4 dans le modèle de souris Balb/c avec co-administration d'Infanrix Hexa. ELISA anti-PS6A.

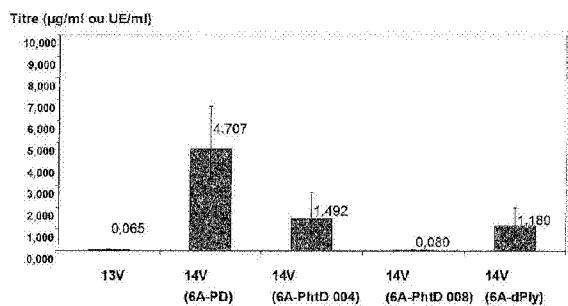


Figure 1

## BREVET D'INVENTION BELGE

SPF Economie, PME, Classes  
Moyennes & Energie

Numéro de publication : 1024465  
Numéro de dépôt : BE2016/5782

Office de la Propriété intellectuelle

Classification Internationale : C07K 14/505 A61K 38/00 A61K 39/09  
A61K 39/00 A61K 47/64  
Date de délivrance : 05/03/2018

Le Ministre de l'Economie,

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

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

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

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

Vu la demande de brevet d'invention reçue par l'Office de la Propriété intellectuelle en date du 19/10/2016.

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

### Arrête :

Article premier. - Il est délivré à

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

représenté par

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

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

INVENTEUR(S) :

BERTAUD Elisabeth Marie Monique, GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

BIEMANS Ralph Leon, GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

MONIOTTE Nicolas Jean Benoit, GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

STRODIOT Laurent , GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, 1330, RIXENSART;

PRIORITE(S) :

21/10/2015 GB 1518684.4;

DIVISION :

divisé de la demande de base :

date de dépôt de la demande de base :

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

Bruxelles, le 05/03/2018,

Par délégation spéciale :

VACCINDomaine de l'invention

La présente invention concerne des polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, en particulier des polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A ayant une taille moyenne (par exemple,  $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 110 et 750, 150 et 500, 180 et 600, 210 et 490, 210 et 450, 180 et 400, 210 et 400, 210 et 370, 220 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa. Elle concerne en outre des polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A conjugués à une protéine porteuse, des compositions immunogènes, des vaccins et des procédés de préparation des polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A. Elle concerne également l'utilisation des compositions immunogènes et des vaccins de l'invention en thérapie et des procédés d'immunisation contre une infection par *Streptococcus pneumoniae*.

Contexte de l'invention

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) est une bactérie à Gram positif responsable d'une très grande morbidité et mortalité (en particulier, chez les nourrissons et les personnes âgées), en provoquant des maladies invasives, telles qu'une pneumonie, une bactériémie et une méningite, et d'autres maladies non invasives, telles que l'otite moyenne aiguë. Environ 800 000 enfants meurent chaque année à cause d'une

maladie à pneumocoques, en particulier dans les pays émergeant (O-Brien *et al.* 2009 Lancet 374 : 893-902). Le nombre croissant de souches résistant aux antibiotiques (Linares *et al.* 2010 Cin. Microbiol. Infect. 16 : 402-5 410) et la gravité des maladies à pneumocoques font de la vaccination l'intervention la plus efficace.

Les principaux syndromes cliniques provoqués par *S. pneumoniae* sont parfaitement connus et décrits dans tous les ouvrages médicaux classiques (Fedson DS, 10 Muscher DM dans : Plotkin SA, Orenstein WA, Editeurs. Vaccines. 4ème Edition. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a : 529-588). Par exemple, une maladie invasive à pneumocoques (IPD) est définie comme étant toute infection dans laquelle *S. pneumoniae* est isolé à partir 15 du sang ou d'autre site normalement stérile (Musher DM. Streptococcus pneumoniae. Dans Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (éds). Principles and Practice of infectious diseases (5ème éd.). New York, Churchill Livingstone, 2001, p 2128-2147). Il est connu que la 20 bronchopneumopathie obstructive chronique (BPOC) englobe plusieurs affections (obstruction des voies respiratoires, bronchite chronique, bronchiolite ou maladie des petites voies respiratoires et emphysème) qui souvent coexistent (Wilson *et al.*, Eur. Respir. J. 25 2001 ; 17 : 995-1007). Les patients souffrent d'une exacerbation de leur affection qui est généralement associée à une augmentation de l'essoufflement avec, souvent, un accroissement de la toux pouvant produire du mucus ou des expectorations purulentes (Wilson, Eur 30 Respir J 2001 17 : 995-1007). La BPOC est définie sur le plan physiologique par la présence d'une obstruction

irréversible ou partiellement réversible des voies respiratoires chez les patients atteints de bronchite chronique et/ou d'emphysème (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov ; 152(5 Pt 2) : S77-121). Les exacerbations de la BPOC sont souvent provoquées par une infection bactérienne (par exemple, à pneumocoques) (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000 : a state-of-the-art review. Clin. Microbiol. Rev. 2001 avr ; 14(2) : 336-63).

Le pneumocoque est encapsulé par un polysaccharide lié chimiquement qui confère la spécificité du sérotype. Il existe plus de 90 sérotypes connus de pneumocoques, et la capsule est le principal déterminant de virulence pour les pneumocoques, car la capsule protège la surface interne de la bactérie contre le complément, mais elle est elle-même peu immunogène. Il est considéré qu'un taux d'anticorps anti-polysaccharide est prédictif de la protection contre une maladie invasive à pneumocoques (Jodar et al. Vaccine (21) 2003, p. 3264-3272). Après l'autorisation initiale d'un vaccin conjugué heptavalent contenant les sérotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F (PCV7), deux vaccins conjugués antipneumococciques (PCV) conçus pour élargir la couverture ont été autorisés. Le vaccin conjugué antipneumococcique décavalent à protéine D d'*Haemophilus influenzae* (PCV10) contient les sérotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 et 23F conjugués à la protéine D non typable d'*H. influenzae*, plus le sérotype 18C conjugué à l'anatoxine tétanique et le sérotype 19F.

conjugué à l'anatoxine diphtérique. Le vaccin conjugué antipneumococcique 13-valent (PCV13) contient les sérotypes PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) plus les sérotypes 1, 3, 5, 6A, 7F et 19A, conjugués à la 5 substance à réaction croisée CRM197.

Un objet de la présente invention est de développer des polysaccharides améliorés de *Streptococcus pneumoniae* et des vaccins conjugués améliorés à polysaccharides de *Streptococcus pneumoniae*.

10 Les isolats de *S. pneumoniae* de sérogroupe 6, notamment les isolats de sérogroupes 6A, 6B, 6C et 6D, sont importants car on les trouve fréquemment dans les infections (Song et al. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, mai 2011, p. 1758-1764). Le document WO 2009/000 826 A2 15 divulgue un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A présentant une taille de 1100 à 1540 ( $Da \times 10^3$ ) conjugué à la protéine D et un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B présentant une taille de 1069 à 1391 20 ( $Da \times 10^3$ ) conjugué à la protéine D (voir le tableau 2 du document WO 2009/000 826 A2). A la fois le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A et le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B décrits dans le 25 document WO 2009/000 826 A2 sont des polysaccharides natifs. La seule différence entre les structures chimiques des sérotype 6A et 6B est la liaison entre les motifs rhamnose et ribitol. Comme la structure du polysaccharide 6A est très similaire à celle du 30 polysaccharide 6B, on a tout d'abord cru qu'un PS6A natif (polysaccharide 6A) devrait être utilisé pour la

conjugaison car un PS6B natif (polysaccharide 6B) est utilisé pour la conjugaison. Dans l'essai FinIP, il a été démontré que PHiD-CV10 contenant 6B conjugué à la protéine D est efficace contre le sérotype 6B (Palmu et 5 al. Lancet 2013 ; 381 : 214-22). Cependant, de manière inattendue, la présente invention propose un polysaccharide 6A dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* présentant des propriétés améliorées. Les inventeurs ont découvert que grâce à l'utilisation d'un 10 polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (PS6A) ayant une taille particulière, il est possible d'obtenir un conjugué présentant une immunogénicité élevée qui est filtrable.

15 Brève description des figures

Figure 1 : Evaluation de conjugués de PS6A dans une formulation 14-valent (14V) à AlPO<sub>4</sub> dans le modèle de souris Balb/c avec co-administration d'Infanrix™ Hexa. ELISA anti-PS6A.

20 Figure 2(A) : Immunogénicité de PS6A-CRM197 dans le modèle de souris Balb/c. Résultats ELISA.

Figure 2(B) : Immunogénicité de PS6A-CRM197 dans le modèle de souris Balb/c. Résultats OPA.

25 Figure 3(A) : Evaluation of PS6A-CRM197. Résultats ELISA.

Figure 3(B) : Evaluation of PS6A-CRM197. Résultats OPA.

Description de l'invention

30 La présente invention propose un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de

sérotype 6A. Dans un aspect, la présente invention propose un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne ( $M_w$ ) du polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 6A 5 est située entre 100 et 1000, 110 et 750, 150 et 500, 180 et 600, 210 et 490, 210 et 450, 180 et 400, 210 et 400, 210 et 370, 220 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa.

Le terme « polysaccharide », tout au long de la 10 présente description, fait référence à un glucide complexe composé d'une chaîne de saccharides liés les uns aux autres par des liaisons glycosidiques. Le polysaccharide peut contenir au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 ou 50 saccharides ou plus.

15 Dans le cadre de l'invention, un « polysaccharide natif » est un polysaccharide qui n'a pas subi un traitement (par exemple, une post-purification) ayant pour but de réduire la taille du polysaccharide. La taille du polysaccharide peut diminuer légèrement 20 pendant les procédures normales de purification ou par dégradation lors d'une conjugaison. Un tel saccharide est encore natif. Ce n'est que si le polysaccharide est soumis à des techniques de dimensionnement que le polysaccharide n'est pas considéré comme natif.

25 Dans le cadre de l'invention, un « polysaccharide dimensionné » est un polysaccharide qui a été soumis à un traitement (par exemple, une post-purification) ayant pour but de réduire la taille du polysaccharide. Les polysaccharides peuvent être dimensionnés par des 30 techniques de dimensionnement mécanique ou chimique. Les techniques de dimensionnement mécanique pouvant être

utilisées comprennent les techniques à haute pression (tel que la microfluidisation, l'Emulsiflex™, l'homogénéisation à haute pression ou l'homogénéisation de Gaulin) et la sonication. Les techniques de dimensionnement chimique pouvant être utilisées comprennent l'hydrolyse acide (par exemple, par traitement avec de l'acide acétique) ou le traitement avec un periodate. Le terme « periodate » comprend à la fois le periodate et l'acide périodique ; le terme comprend également à la fois le métaperiodate ( $\text{IO}_4^-$ ) et l'orthoperiodate ( $\text{IO}_6^{5-}$ ) et les divers sels de periodate (par exemple, le periodate de sodium et le periodate de potassium). Les plages de poids moléculaires décrites dans le présent document font référence aux polysaccharides purifiés avant conjugaison (par exemple, avant activation quand une activation est mise en œuvre).

Dans le cadre de la présente invention, « dimensionné d'un facteur allant jusqu'à x2 » signifie que le saccharide est soumis à un traitement destiné à réduire la taille du saccharide, mais tout en conservant une taille supérieure à la moitié de la taille du polysaccharide natif. Les termes tels que « dimensionné d'un facteur allant jusqu'à » x3, x4, etc., doivent être interprétés de la même manière, c'est-à-dire que le saccharide est soumis à un traitement destiné à réduire la taille du polysaccharide mais tout en conservant une taille supérieure au tiers, au quart, etc.. Respectivement, de la taille du polysaccharide natif.

Le terme « poids moléculaire » ou « poids moléculaire moyen » ou « taille moyenne » d'un polysaccharide fait référence dans le présent document

au poids moléculaire moyen en poids (Mw) du polysaccharide, mesuré par MALLS (diffusion de lumière laser à angles multiples) avant la conjugaison.

La technique MALLS est connue dans l'art et est 5 habituellement mise en œuvre comme décrit ci-dessous.

Pour une analyse MALLS des polysaccharides pneumococciques, deux colonnes (TSKG6000 et 5000PWxI) peuvent être utilisées en combinaison, et les saccharides sont élués dans du NaCl 0,2 M. Les 10 saccharides sont détectés en utilisant un détecteur à diffusion de lumière (par exemple, le Wyatt Dawn DSP (traitement des signaux numériques) équipé d'un laser à argon de 10 mW à 488 nm) et un réfractomètre interférométrique (par exemple, le Wyatt Otilab DSP 15 (traitement des signaux numériques) équipé d'une cellule P100 et d'un filtre rouge à 498 nm).

Le détecteur à diffusion laser mesure les intensités lumineuses diffusées à 16 angles par la solution macromoléculaire et, par ailleurs, un 20 réfractomètre interférométrique placé en ligne permet la détermination de la quantité d'échantillon éluée. A partir de ces intensités, la taille et la forme des macromolécules en solution peuvent être déterminées.

Le poids moléculaire moyen en poids (Mw) est défini 25 comme étant la somme des poids de toutes les espèces, multipliée par leur poids moléculaire respectifs et divisée par la somme des poids de toutes les espèces.

a) Poids moléculaire moyen en poids : -Mw-

30

$$M_w = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

b) Poids moléculaire moyen en nombre : -M<sub>n</sub>-

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

5

c) Rayon quadratique moyen : -R<sub>w</sub>- et r<sup>2</sup><sub>w</sub> est le rayon au carré défini par :

$$R^2_w \text{ ou } \langle r^2 \rangle_w = \frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}$$

10

(-m<sub>i</sub>- est la masse d'un centre de diffusion i et -r<sub>i</sub>- est la distance entre le centre de diffusion i et le centre de gravité de la macromolécule).

15 d) La polydispersité est définie comme étant le rapport -M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>-.

Tel qu'utilisé dans le présent document, le terme « traitement » (y compris ses variations, par exemple « traiter » ou « traité ») fait référence à l'un quelconque parmi les suivants : (i) la prévention d'une infection ou d'une ré-infection, comme dans un vaccin traditionnel, (ii) la réduction de la gravité ou l'élimination des symptômes, (iii) le retardement de la réapparition des symptômes, et (iii) l'élimination substantielle ou complète du pathogène ou du trouble en question chez un sujet. Par conséquent, un traitement peut être effectué de manière prophylactique (avant une infection) ou thérapeutique (après une infection).

Dans le cadre de la présente invention, « le traitement ou la prévention des exacerbations d'une BPOC » ou « la réduction de la gravité des exacerbations d'une BPOC » fait référence à une réduction de 5 l'incidence ou de la fréquence des exacerbations d'une BPOC (par exemple, une réduction de fréquence de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 % ou plus) ou à une réduction de la gravité des exacerbations d'une BPOC (par exemple, l'obstruction des voies respiratoires, une bronchite 10 chronique, une bronchiolite ou une maladie des petites voies respiratoires et un emphysème), par exemple chez un groupe de patients immunisés avec les compositions immunogènes ou les vaccins de l'invention.

15 Polysaccharides capsulaires dimensionnés de  
*Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A

Les polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A peuvent être dimensionnés par des techniques de dimensionnement mécanique ou chimique. 20 Dans un mode de réalisation, les polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A sont dimensionnés par une technique de dimensionnement chimique. Les techniques de dimensionnement chimique pouvant être utilisées comprennent un traitement avec de 25 l'acide acétique ou un traitement avec un periodate. Dans un aspect, les polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention sont dimensionnés par un traitement avec un periodate. Le terme « periodate » comprend à la fois le periodate 30 et l'acide periodique ; le terme comprend également à la fois le métaperiodate ( $\text{IO}_4^-$ ) et l'orthoperiodate ( $\text{IO}_6^{5-}$ )

et les divers sels de periodate (par exemple, le periodate de sodium et le periodate de potassium). Dans un autre aspect, les polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention 5 sont dimensionnés par un traitement avec de l'acide acétique. Dans un mode de réalisation, les polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention sont dimensionnés par une technique de dimensionnement mécanique, par exemple en 10 utilisant une technique à haute pression. Les techniques à haute pression comprennent la micro-fluidisation, l'homogénéisation à haute pression ou l'homogénéisation de Gaulin. Dans un aspect, le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de 15 l'invention est dimensionné par homogénéisation à haute pression. L'homogénéisation à haute pression permet d'obtenir des taux de cisaillement élevés en pompant le courant du procédé à travers un trajet d'écoulement ayant des dimensions suffisamment petites. Le taux de 20 cisaillement est augmenté par l'utilisation d'une pression d'homogénéisation appliquée plus élevée, et le temps d'exposition peut être augmenté par la remise en circulation du courant d'alimentation à travers l'homogénéisateur. La technique d'homogénéisation à 25 haute pression est décrite dans Cho *et al.* (Int. J. Mol. Sci. 2014, 15). Dans un autre aspect de l'invention, le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est dimensionné par homogénéisation de Gaulin. L'homogénéisation de Gaulin 30 peut être mise en œuvre en utilisant la technique décrite dans Lander *et al.* (Biotechnol. Prog. 2000, 16, 80-85).

Dans un autre aspect, le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est dimensionné par microfluidisation (par exemple, comme décrit dans les exemples ci-dessous).

5 Les polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de la présente invention présente une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 110 et 750, 150 et 500, 180 et 600, 210 et 490, 210 et 450, 180 et 400, 210 et 400, 210 et 370, 220  
10 15 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa. Le dimensionnement est par un facteur d'au plus  $\times 20$ ,  $\times 10$ ,  $\times 8$ ,  $\times 6$ ,  $\times 5$ ,  $\times 4$ ,  $\times 3$  ou  $\times 2$ . Par exemple, le dimensionnement peut être effectué d'un facteur situé entre  $\times 2$  et  $\times 6$ ,  $\times 2$  et  $\times 5$ ,  $\times 2$  et  $\times 4$ , ou  $\times 3$  et  $\times 6$ ,  $\times 3$  et  $\times 5$  ou  $\times 3$  et  $\times 4$ . Dans un aspect, le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est dimensionné par un facteur d'au plus  $\times 5$ . Les plages de poids moléculaires décrites dans le présent document font référence au poids moléculaire des  
20 polysaccharides capsulaires purifiés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A avant conjugaison (par exemple, avant activation quand une activation est mise en œuvre).

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est antigénique (tel que déterminé par ELISA), par exemple en ayant un indice d'antigénicité situé entre 70 et 200 %, de préférence entre 90 % et 150 % (par exemple, entre 120 et 144 %). Comme expliqué dans les exemples ci-dessous, l'indice d'antigénicité est mesuré par rapport au polysaccharide capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype  
25 30

6A auquel il est attribué un indice d'antigénicité de 100 % (également représenté par 1,0 dans les tableaux ci-dessous).

5 Polysaccharides capsulaires conjugués de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A

De manière appropriée, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est conjugué à une protéine porteuse. La 10 protéine porteuse peut être choisie dans le groupe constitué par la TT (anatoxine tétanique), la DT (anatoxine diphtérique), CRM197, le fragment C de TT, PhtD (protéine D de la triade à histidine pneumococcique), les fusions PhtDE (une fusion de PhtD et de PhtE 15 (protéine E à histidine pneumococcique) en particulier celles décrites dans le document WO 01/98 334 et WO 03/54 007), la pneumolysine détoxifiée et la protéine D. Dans un aspect de l'invention, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de 20 sérotype 6A est conjugué à une protéine porteuse choisie dans le groupe constitué par la TT (anatoxine tétanique), la DT (anatoxine diphtérique), CRM197, le fragment C de TT et PhtD (protéine D de la triade à histidine pneumococcique). Dans un autre aspect de l'invention, le 25 polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est conjugué à la DT ou à CRM197. Dans un autre aspect de l'invention, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention 30 est conjugué à CRM197.

CRM197 est une forme non toxique de l'anatoxine diphtérique, mais qui est impossible à distinguer de l'anatoxine diphtérique (DT) sur le plan immunologique. Des analogues génétiquement détoxifiés de la toxine diphtérique comprennent CRM197 et d'autres mutants décrits dans les documents US 4 709 017, US 5 843 711, US 5 601 827 et US 5 917 017. CRM197 est produit par *C. diphtheriae* infecté par la phase non toxigène  $\beta$ 197tox- créée par la mutagenèse à la nitrosoguanidine du carynéphage toxigène b (Uchida et al Nature New Biology (1971) 233 ; 8-11). La protéine CRM197 possède le même poids moléculaire que l'anatoxine diphtérique, mais diffère de celle-ci par la substitution d'une seule base dans le gène structurel. Celle-ci entraîne une substitution d'acide aminé glycine pour glutamine en position 52 qui rend le fragment A incapable de se lier au NAD et donc non toxique (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46 : 69-94, Rappuoli. Applied and Environmental Microbiology sept 1983 p 560-564).

Le fragment C de TT est un fragment carboxy-terminal non toxique de la chaîne lourde de la toxine téstanique. La toxine téstanique est un peptide unique d'environ 150 kDa, qui est constitué de 1315 résidus d'acide aminé. Le clivage de la toxine téstanique par la papaine donne deux fragments ; l'un d'entre eux, le fragment C, fait environ 50 kDa. Le fragment C de TT est décrit plus en détail dans Neubauer et al. Biochim. Biophys. Acta 1981, 27, 141-148.

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué à la protéine porteuse par

l'intermédiaire d'un lieu, par exemple un lieu bifonctionnel (contenant deux extrémités réactives). Le lieu est facultativement hétérobifonctionnel (présentant différents groupes réactifs à chaque extrémité) ou homobifonctionnel (présentant des groupes réactifs identiques à chaque extrémité d'un bras espaceur), par exemple en ayant un groupe amino réactif et un groupe acide carboxylique réactif, 2 groupes amino réactifs ou deux groupes acide carboxylique réactifs. Le lieu contient, par exemple, entre 4 et 20, 4 et 12, 5 et 10 atomes de carbone. Un lieu possible est l'ADH (dihydrazide de l'acide adipique). D'autres lieux comprennent le B-propionamido (document WO 00/10 599), la nitrophényl-éthylamine (Gever et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165 : 171-288), les halogénures d'haloalkyle (document US 4 057 685), les liaisons glycosidiques (documents US 4 673 574, US 4 808 700), l'hexane-diamine et l'acide 6-aminocaproïque (document US 4 459 286). Dans un autre mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est directement conjugué à la protéine porteuse. Dans un aspect, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est liée à la protéine porteuse par l'intermédiaire d'une liaison iso-urée. Une liaison iso-urée est formée par la réaction entre un ester de cyanate se trouvant sur le polysaccharide et un groupe amino se trouvant sur le support. Une « liaison iso-urée » fait ici référence à une liaison stable.

### Compositions immunogènes

Dans un mode de réalisation, la présente invention propose une composition immunogène comprenant un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (ou un conjugué) de l'invention.

Généralement, les compositions immunogènes de l'invention comprendront des antigènes à base de polysaccharide capsulaire (conjugués de manière appropriée), les polysaccharides dérivant d'au moins dix sérotypes de *S. pneumoniae*. Le nombre de polysaccharides capsulaires de *S. pneumoniae* peut varier de 10 sérotypes différents (ou valences « V ») à 23 sérotypes différents (23V, une composition à 23-valent). Dans un mode de réalisation, la composition immunogène comprend 10 ou plus, 11 ou plus, 12 ou plus, 13 ou plus, 14 ou plus, 15 ou plus ou 15 ou plus de 15 polysaccharides capsulaires provenant de différents sérotypes de *S. pneumoniae*. Dans un mode de réalisation, il y a 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 sérotypes différents de *S. pneumoniae*. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention peut comprendre des polysaccharides conjugués de *S. pneumoniae* et des saccharides non conjugués de *S. pneumoniae*. Dans un mode de réalisation, le nombre total de sérotypes de saccharides est inférieur ou égal à 23.

Dans un mode de réalisation, le vaccin anti-pneumococcique multivalent de l'invention comprendra des polysaccharides (conjugués de manière appropriée) choisis parmi les sérotypes suivants : 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F, même si l'on comprendra

qu'un ou deux autres sérotypes puissent être utilisés à la place en fonction de l'âge de la personne recevant le vaccin et de l'emplacement géographique où le vaccin sera administré. Dans un mode de réalisation, le vaccin 5 peut être un vaccin 11-valent. Par exemple, un vaccin 11-valent peut comprendre des polysaccharides de sérotypes 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F. Un mode de réalisation, le vaccin peut être un vaccin 12-valent ou 13-valent. Un vaccin 12- ou 13-valent 10 pédiatrique (pour nourrisson) peut également comprendre la formulation à 11 valences complétée avec les sérotypes 19A, ou 22F, ou 15, ou 19A et 22F, ou 19A et 15, ou 22F et 15, tandis qu'un vaccin 13-valent pour personnes âgées peut comprendre la formulation à 11 valences complétée 15 avec les sérotypes 19A et 22F, 8 et 12F, ou 8 et 15B, ou 8 et 19A, ou 8 et 22F, ou 12F et 15, ou 12F et 19A, ou 12F et 22F, ou 15 et 19A, ou 15 et 22F. Dans un mode de réalisation, le vaccin peut être un vaccin 14-valent ou 15-valent. Un vaccin 14- ou 15-valent pédiatrique peut 20 comprendre la formulation à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 3, 19A et 22F ; les sérotypes 8, 19A et 22F ; les sérotypes 12F, 19A et 22F ; les sérotypes 15, 19A et 22F ; les sérotypes 3, 8, 19A et 22F ; les sérotypes 3, 12F, 19A et 22F ; les sérotypes 25 3, 15, 19A et 22F. Dans un mode de réalisation, le vaccin peut être un vaccin 16-valent. Un vaccin 16-valent peut comprendre la formulation à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 3, 15B, 19A, 22F et 23F. Un vaccin 16-valent peut comprendre la formulation 30 à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 3, 15B, 19A, 22F et 33F. Dans un mode de

réalisation, le vaccin peut être un vaccin 19-valent. Un vaccin 19-valent peut comprendre la formulation à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 19A, 22F et 23F. Un 5 vaccin 19-valent peut comprendre la formulation à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 19A, 22F et 33F. Dans un mode de réalisation, le vaccin peut être un vaccin 10 20-valent. Un vaccin 20-valent peut comprendre la formulation à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 3, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 19A, 22F et 23F. Un vaccin 20-valent peut comprendre la formulation à 11 valences décrites ci-dessus complétées avec les sérotypes 3, 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 19A, 22F et 33F. 15 Dans un mode de réalisation, le vaccin peut être un vaccin 21-valent.

Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 20 9V, 14, 18C, 19F et 23F (conjugués de manière appropriée). Dans un autre mode de réalisation de l'invention, au moins 12 antigènes saccharidiques (conjugués de manière appropriée) sont inclus, par exemple des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 25 9V, 14, 18C, 19A, 19F et 23F. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, au moins 12 antigènes saccharidiques (conjugués de manière appropriée) sont inclus, par exemple des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 30 18C, 19A et 23F. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, au moins 13 antigènes polysaccharidiques

(conjugués de manière appropriée) sont inclus, par exemple un vaccin peut comprendre des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F et 23F, bien que d'autres 5 antigènes saccharidiques, par exemple, 23-valents (tels que les sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F), soient également envisagés par l'invention. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, au moins 15 10 antigènes saccharidiques (conjugués de manière appropriée) sont inclus, par exemple des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F et 33F. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, au moins 15 antigènes 15 saccharidiques (conjugués de manière appropriée) sont inclus, par exemple des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F et 33F. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, au moins 16 antigènes 20 saccharidiques (conjugués de manière appropriée) sont inclus, par exemple des polysaccharides capsulaires dérivés des sérotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F et 33F. Dans un autre mode 25 de réalisation, la composition immunogène comprend un (poly)saccharide capsulaire (conjugué) de sérotype 33F de *S. pneumoniae*. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène comprend un (poly)saccharide capsulaire (conjugué) de sérotype 15C de *S. pneumoniae*. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène comprend un (poly)saccharide capsulaire 30 (conjugué) de sérotype 12F de *S. pneumoniae*. Dans un

mode de réalisation, il y a 10 à 23 sérotypes différents de polysaccharides capsulaires de *S. pneumoniae* (conjugués de manière appropriée).

## 5 Protéines porteuses

Des exemples de protéine porteuse pouvant être utilisées dans la présente invention sont la DT (anatoxine diphtérique), la TT (anatoxine tétanique) ou le fragment C de TT, la DT, CRM197, d'autres mutants ponctuels de DT, tels que CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218 ; 3838-3844, 1973) ; CRM 9, CRM 45, CRM102, CRM 103 et CRM107 et autres mutations décrites par Nicholls et Youle dans Genetically Engineers Toxins, Ed : Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992 ; la délétion ou mutation de Glu-148 en Asp, Gln ou Ser et/ou Ala 158 en Gly et autres mutations décrites dans le document US 4 709 017 ou US 4 950 740 ; la mutation d'au moins un ou plusieurs résidus Lys 516, Lys 526, Phe 530 et/ou Lys 534 et d'autres mutations décrites dans le document US 5 917 017 ou US 6 455 673 ; ou la fragment de DT décrit dans le document US 5 843 711, la pneumolysine pneumococcique (Kuo et al (1995) Infect Immun 63 ; 2706-13) comprenant la pneumolysine (ply) détoxifiée d'une quelconque manière, par exemple, la pneumolysine détoxifiée au GMBS (dPly-GMBS) (WO 04 081 515, PCT/EP2005/010 258) ou la pneumolysine détoxifiée au formaldéhyde (dPly-formaldéhyde), les protéines de la famille Pht (triade à histidine pneumococcique) (PthX), comprenant PhtA, PhtB, PhtD, PhtE et les fusions des protéines Pht, par exemple les fusions PhtDE, les fusions PhtBE (WO 01/98 334 et

WO 03/54 007), (Pht A à E sont décrites plus en détail ci-dessous), OMPC (protéine de la membrane externe du méningocoque - généralement extraite de *N. meningitidis* sérogroupe B - document EP 0 372 501), le porine PorB de 5 *Neisseria meningitidis*, PD (protéine D de *Haemophilus influenzae* - voir, par exemple, le document EP 0 594 610 B), ou les équivalents immunologiquement fonctionnels de celle-ci, des peptides synthétiques (EP 0 378 881, EP 0 427 347), les protéines de choc 10 thermique (WO 93/17 712, WO 94/03 208), les protéines pertussiques (WO 98/58 668, EP 0 471 177), les cytokines, les lymphokines, les facteurs de croissance ou les hormones (WO 91/01 146), des protéines artificielles 15 comprenant de multiples épitopes de lymphocytes T CD4+ humains provenant de divers antigènes dérivés de pathogènes (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31 ; 3816-3824) telles que la protéine N19 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72 ; 4884-7), la protéine pneumococcique de 20 surface PspA (WO 02/091 998), les protéines fixant le fer (WO 01/72 337), la toxine A ou B de *Clostridium difficile* (WO 00/61 761).

Dans un mode de réalisation, dans la composition immunogène de l'invention, chaque saccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* est conjugué à une protéine 25 porteuse choisie indépendamment dans le groupe constitué par DT, CRM197, TT, le fragment C de TT, dPly (pneumolysine détoxifiée), PhtA, PhtB, PhtD, PhtE, PhtDE OmpC, PorB et la protéine D d'*Haemophilus influenzae*. Dans un autre mode de réalisation, chaque saccharide 30 capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* est conjugué à une protéine porteuse choisie indépendamment dans le

groupe constitué par TT, DT, CRM197, le fragment C de TT, PhtD, les fusions PhtDE (en particulier celles décrites dans les documents WO 01/98 334 et WO 03/54 007), la pneumolysine détoxifiée et la protéine D. Dans un autre mode de réalisation, chaque saccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* est conjugué à une protéine porteuse choisie indépendamment dans le groupe constitué par TT, DT, CRM197, PhtD, la pneumolysine détoxifiée et la protéine D. Dans un autre mode de réalisation, chaque saccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* est conjugué à une protéine porteuse choisie indépendamment dans le groupe constitué par TT, DT, CRM197, PhtD et la protéine D. Dans un autre mode de réalisation, chaque saccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* est conjugué à une protéine porteuse choisie indépendamment dans le groupe constitué par TT, DT, CRM197 et la protéine D.

Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend deux ou plus de deux protéines de support différentes. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend 2, 3, 4, 5 ou 6 protéines de support différentes. Chaque type de protéine porteuse peut jouer le rôle de support pour plus d'un polysaccharide, lesdits polysaccharides pouvant être de sérotypes identiques ou différents. Dans un mode de réalisation, deux ou plus de deux sérotypes différents de polysaccharide peuvent être conjugués à la même protéine porteuse, soit à la même molécule de protéine porteuse (molécules de support auxquelles sont conjugués 2 ou plus de 2 sérotypes différents de polysaccharide) [voir, par exemple, le

document WO 04/083 251], soit des molécules différentes de la même protéine porteuse (chaque molécule de support protéique étant conjuguée seulement à un sérotype de saccharide).

5       Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend la protéine D de *Haemophilus influenzae* (PD), par exemple la séquence de protéine D représentés sur la figure 9 (figures 9a et 9b ensemble, 364 acides aminés) du document EP 0 594 610 (SEQ ID NO : 1). L'inclusion de cette protéine dans la composition immunogène peut fournir un niveau de protection contre l'otite moyenne associée à *Haemophilus influenzae* (Pyrmula et al Lancet 367 ; 740-748 (2006)). La protéine D peut être utilisée sous la forme d'une protéine pleine longueur ou sous la forme d'un fragment (par exemple, la protéine D peut être telle que décrite dans le document WO 0 056 360). Par exemple, une séquence de protéine D peut comprendre (ou consister en) le fragment de protéine D décrit dans le document EP 0 594 610 qui commence à la séquence SSHSSNMANT (SerSerHisSerSerAsnMetAlaAsnThr) (SEQ ID NO. 3), et qui est dépourvu des 19 acides aminés N-terminaux, tel que représenté sur la figure 9 du document EP 0 594 610, facultativement avec le tripeptide MDP à partir de NS1 fusionné à l'extrémité N-terminale dudit fragment de protéine D (348 acides aminés) (SEQ ID NO : 2). Dans un aspect, la protéine D ou le fragment de protéine D est non lipidé. La protéine D peut être présente dans la composition immunogène sous la forme d'une protéine libre ou d'une protéine porteuse. Dans un aspect, la protéine D est présente dans la composition immunogène

sur la forme d'une protéine libre. Dans un autre aspect, la protéine D est présente à la fois sous la forme d'une protéine porteuse et d'une protéine libre. Dans un autre aspect, la protéine D est présente la forme d'une protéine porteuse pour un ou plusieurs des polysaccharides. Dans un autre aspect, 2 à 9 des polysaccharides capsulaires choisis parmi différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Dans un autre aspect, la protéine D est présente sous la forme d'une protéine porteuse pour la majorité des polysaccharides, par exemple 6, 7, 8, 9 ou plus de 9 des polysaccharides peuvent être conjugués à la protéine D.

Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention contient 2 à 8, 2 à 7, 2 à 6, 2 à 5, 3 à 5, 4 à 5, 2 à 4, 2 à 3, 3 à 4 or 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 conjugués de sérotypes de saccharide capsulaire dans lesquels la protéine D est la protéine porteuse. Par exemple, 2 à 8, 2 à 7, 2 à 6, 2 à 5, 3 à 5, 4 à 5, 2 à 4, 2 à 3, 3 à 4 ou 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 polysaccharides choisis parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F et 23F sont conjugués à la protéine D. Par exemple, des poly-saccharides de sérotypes 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 et 23F sont conjugués à la protéine D.

Dans un mode de réalisation, des polysaccharides issus au moins des sérotypes 1 et 3, 1 et 4, 1 et 5, 1 et 6A, 1 et 6B, 1 et 7, 1 et 9V, 1 et 14, 1 et 22F, 1 et 23F, 3 et 4, 3 et 5, 3 et 6A, 3 et 6B, 3 et 7F, 3 et 9V, 3 et 14, 3 et 22F, 3 et 23F, 4 et 5, 4 et 6A, 4 et 6B, 4 et 7F, 4 et 9V, 4 et 14, 4 et 22F, 4 et 23F, 5 et 6A, 5 et 6B, 5 et 7F, 5 et 9V, 5 et 14, 5 et 22F, 5 et 23F,

6A et 6B, 6A et 7F, 6A et 9V, 6A et 14, 6A et 22F, 6A et 23F, 6B et 7F, 6B et 9V, 6B et 14, 6B et 22F, 6B et 23F, 7F et 9V, 7F et 14, 7F et 22F, 7F et 23F, 9V et 14, 9V et 22F, 9V et 23F, 14 et 22F, 14 et 23F ou 22F et 23F  
5 sont conjugués à la protéine D.

Dans un mode de réalisation, des polysaccharides issus au moins des sérotypes 1, 3 et 4 ; 1, 3 et 5 ; 1, 3 et 6A ; 1, 3 et 6B ; 1, 3 et 7F ; 1, 3 et 9V ; 1, 3 et 14 ; 3, 4 et 7F ; 3, 4 et 5 ; 3, 4 et 7F ; 3, 4 et 9V ; 10 3, 4 et 14 ; 4, 5 et 7F ; 4, 5 et 9V ; 4, 5, et 14 ; 5, 7F et 9V ; 5, 7F et 14 ; 7F, 9V et 14 ; 1, 3, 4 et 5 ; 3, 4, 5 et 7F ; 4, 5, 7F et 9V ; 4, 5, 7F et 14 ; 4, 5, 9V et 14 ; 4, 7F, 9V et 14 ; 5, 7F, 9V et 14 ; ou 4, 5, 7F, 9V et 14 sont conjugués à la protéine D.

15 Par exemple, dans une composition immunogène 10-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 11-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 12-valent de 20 *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 13-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 14-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par 25 30

exemple, dans une composition immunogène 15-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 16-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 17-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 18-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Par exemple, dans une composition immunogène 19-valent de *S. pneumoniae*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 des polysaccharides capsulaires de différents sérotypes sont conjugués à la protéine D. Facultativement, les sérotypes conjugués à la protéine D sont choisis dans les groupes décrits ci-dessus.

Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend au moins un saccharide capsulaire conjugué à l'anatoxine tétanique (TT). Dans un autre mode de réalisation, un saccharide capsulaire 18C est conjugué à la TT, facultativement dans lequel 18C est le seul saccharide dans la composition à être conjugué à l'anatoxine tétanique (TT).

Dans un aspect de la présente invention, le sérotype 19F est conjugué à la DT ou à CRM197. Dans un autre aspect, le sérotype 19F est conjugué à la DT. Dans un aspect, les sérotypes restants de saccharides de la composition immunogène peuvent tous être conjugués à une

ou plusieurs protéines porteuses qui ne sont pas la DT (c'est-à-dire, 19F est le seul être conjugué à la DT). Dans un mode de réalisation, 19F est conjugué à la DT ou à CRM197, et les sérotypes restants sont conjugués aux 5 protéines porteuses choisies indépendamment parmi PhtD, PD (protéine D), TT (anatoxine tétanique), DT (anatoxine diphtérique) et CRM197. Dans un autre mode de réalisation, 19F est conjugué à la DT ou à CRM197, et les sérotypes restants sont conjugués aux protéines porteuses choisies indépendamment parmi PD, TT et CRM197 10 (par exemple, comme décrit dans les documents et CRM197, et les sérotypes restants sont conjugués aux protéines porteuses choisies indépendamment parmi PD, TT et CRM197 15 (par exemple, comme décrit dans les documents WO 2007/071 710 A2 et WO 2007/071 707 A2)).

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention et le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de 20 sérotype 6B sont conjugués à des protéines porteuses différentes. Dans un autre mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention est conjugué à CRM197. Dans un autre mode de réalisation, un conjugué 25 de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B est présent, mais il n'est pas conjugué à la DT ou à CRM197. Dans un autre mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué à 30 CRM197 et le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B est conjugué à une protéine

porteuse différente de CRM197. Dans un autre mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué à CRM197 et le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B est conjugué à une protéine porteuse choisie parmi PhtD, PD (protéine D), TT (anatoxine tétanique) ou DT (anatoxine diphtérique). Dans un autre mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué à CRM197 et le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B est conjugué à la protéine D.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la protéine porteuse conjuguée à un ou plusieurs des polysaccharides capsulaires de *S. pneumoniae* est un membre des protéines de la famille des triades polyhistidine (Pht), des fragments ou des protéines de fusion de celle-ci. Les protéines PhtA, PhtB, PhtD ou PhtE peuvent avoir une séquence d'acides aminés partageant 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % ou 100 % d'identité avec une séquence divulguée dans le document WO 00/37 105 ou WO 00/39 299 (par exemple, avec la séquence d'acides aminés 1 à 838 ou 21 à 838 de SEQ ID NO : 4 du document WO 00/37 105 pour PhtD). Par exemple, les protéines de fusion sont composées de 2, 3 ou 4 des protéines PhtA, PhtB, PhtD, PhtE pleine longueur ou de leurs fragments. Des exemples de protéines de fusion sont PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B et PhtE/D, dans lesquelles les protéines sont liées avec la première

mentionnée à l'extrémité N-terminale (voir, par exemple, le document WO 01/98 334).

Quand des fragments de protéines Pht sont utilisés (séparément ou dans une protéine de fusion), chaque 5 fragment contient facultativement un ou plusieurs motifs de triade d'histidine et/ou des régions en superhélice de ces polypeptides. Un motif de triade d'histidine est la partie du polypeptide qui présente la séquence HxxHxH, où H est l'histidine et x est un acide aminé différent 10 de l'histidine. Une région en superhélice est une région prédite par l'algorithme « Coils » Lupus, A et al (1991) Science 252 ; 1162-1164. Dans un mode de réalisation, le fragment comprend un ou plusieurs motifs de triade d'histidine et au moins une région en superhélice. Dans 15 un mode de réalisation, le fragment contient exactement ou au moins 2, 3, 4 ou 5 motifs de triade d'histidine (facultativement, avec la séquence Pht native entre les 2 ou plus de 2 triades, ou une séquence intra-triade qui est à plus de 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 % identique à 20 une séquence Pht intra-triade pneumococcique native - par exemple, la séquence intra-triade représentée par SEQ ID NO : 4 dans le document WO 00/37 105 pour PhtD). Dans un mode de réalisation, le fragment contient exactement ou au moins 2, 3 ou 4 25 régions en superhélice. Dans un mode de réalisation, une protéine Pht divulguée dans le présent document comprend la protéine pleine longueur à laquelle la séquence signal est fixée, la protéine pleine longueur mature de laquelle le peptide signal est retiré (par exemple, 20 acides 30 aminés à l'extrémité N-terminale), des variants naturels de la protéine Pht et des fragments immunogènes de la

protéine Pht (par exemple, les fragments décrits ci-dessus ou des polypeptides comprenant au moins 15 ou 20 acides aminés contigus provenant d'une séquence d'acides aminés de WO 00/37 105 (SEQ ID NO : 4, 6, 8 ou 10) ou de 5 WO 00/39 299 (SEQ ID NO : 2, 4, 6, 8, 10 ou 14), ledit polypeptide étant capable de déclencher une réponse immunitaire spécifique pour ladite séquence d'acides aminés dans WO 00/37 105 ou WO 00/39 299).

En particulier, le terme « PhtD », tel qu'utilisé 10 dans le présent document, comprend la protéine pleine longueur à laquelle la séquence signal est fixée, la protéine pleine longueur mature de laquelle le peptide signal est retiré (par exemple, 20 acides aminés à l'extrémité N-terminale), des variants naturels de PhtD 15 et des fragments immunogènes de PhtD (par exemple, les fragments décrits ci-dessus ou des polypeptides comprenant au moins 15 ou 20 acides aminés contigus provenant d'une séquence d'acides aminés de PhtD dans WO 00/37 105 ou WO 00/39 299, ledit polypeptide étant 20 capable de déclencher une réponse immunitaire spécifique pour ladite séquence d'acides aminés de PhtD dans WO 00/37 105 ou WO 00/39 299) (par exemple, SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105 ou SEQ ID NO : 14 de WO 00/39 299 pour PhtD). Toutes les formes de PhtD mentionnées ci-dessus 25 peuvent être utilisées dans la présente invention.

#### Procédés de conjugaison

Les conjugués de saccharide présents dans les compositions immunogènes de l'invention peuvent être 30 préparés par les procédés de conjugaison de la présente invention ou selon l'une quelconque des techniques de

couplage connues. Le procédé de conjugaison peut comprendre l'activation du saccharide avec le tétrafluoroborate de 1-cyano-4-diméthylaminopyridinium (CDAP) pour former un ester de cyanate. Le saccharide activé peut ainsi être couplé directement, ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur (lieur), à un groupe amino se trouvant sur la protéine porteuse. Par exemple, l'espaceur peut être une cystamine ou une cystéamine pour donner un polysaccharide thiolé qui peut être couplé au support par l'intermédiaire d'une liaison thioéther obtenue après réaction avec une protéine porteuse activée par un maléimide (en utilisant, par exemple, le GMBS (ester de N-hydroxy-succinimide de l'acide 4-maléimidobutyrique)) ou une protéine porteuse haloacétylée (en utilisant, par exemple, le SIAB ((4-iodoacétyl)aminobenzoate de succinimidyle), ou le SIA (iodoacétate de succinimidyle), ou le SBAP (3-(bromoacétamide)-propionate de succinimidyle)). Dans un mode de réalisation, l'ester de cyanate (facultativement préparé par la chimie au CDAP) est couplé à l'hexane diamine ou à l'ADH (dihydrazide de l'acide adipique) et le saccharide amino-dérivatisé est conjugué à la protéine porteuse en utilisant la chimie au carbodiimide (par exemple, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDAC or EDC)) via un groupe carboxyle se trouvant sur la protéine porteuse. De tels conjugués sont décrits dans la demande PCT publiée WO 93/15 760 Uniformed Services University et les documents WO 95/08 348 et WO 96/29 094.

Dans un mode de réalisation, au moins un des polysaccharides capsulaires de *S. pneumoniae* est

directement conjugué à une protéine porteuse (par exemple, en utilisant une des chimies décrites ci-dessus). Dans un mode de réalisation, au moins un des polysaccharides capsulaires de *S. pneumoniae* est 5 directement conjugué par le tétrafluoroborate de 1-cyano-4-diméthylaminopyridinium (CDAP). Dans un mode de réalisation, la majorité des polysaccharides capsulaires, par exemple 5, 6, 7, 8, 9 ou plus de 9, sont liés directement à une protéine porteuse par le 10 CDAP (voir les documents WO 95/08 348 et WO 96/29 094).

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide de *Streptococcus pneumoniae* est conjugué à la protéine porteuse par l'intermédiaire d'un lieu, par exemple un lieu bifonctionnel. Le lieu est facultativement 15 hétérobifonctionnel ou homobifonctionnel, par exemple en contenant un groupe amino réactif et un groupe acide carboxylique réactif, 2 groupes amino réactifs ou deux groupes acide carboxylique réactifs. Le lieu contient, par exemple, entre 4 et 20, 4 et 12, 5 et 10 atomes de 20 carbone. Un lieu possible est l'ADH (dihydrazide de l'acide adipique). D'autres lieux comprennent le B-propionamido (document WO 00/10 599), la nitrophénylethylamine (Gever et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165 : 171-288), les halogénures d'haloalkyle (document 25 US 4 057 685), les liaisons glycosidiques (documents US 4 673 574, US 4 808 700), l'hexane-diamine et l'acide 6-aminocaproïque (document US 4 459 286). Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention peut comprendre un polysaccharide capsulaire 18C 30 conjugué à la protéine porteuse par l'intermédiaire d'un lieu, le lieu étant facultativement l'ADH. Dans un

mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention peut comprendre un polysaccharide capsulaire 22F conjugué à la protéine porteuse par l'intermédiaire d'un lieu, le lieu étant facultativement l'ADH (par 5 exemple, comme décrit dans le document WO 2007/071 711 A2).

D'autres techniques appropriées utilisent les carbodiimides, les hydrazides, les esters activés, le norborane, l'acide p-nitrobenzoïque, le N-hydroxy-10 succinimide, le N-hydroxysulfosuccinimide (S-NHS), l'EDC, le tétrafluoroborate d'O-(N-succinimidyl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TSTU). Un grand nombre est décrit dans le document WO 98/42 721. La conjugaison peut impliquer un lieu carbonyle qui peut être formé par la 15 réaction d'un groupe hydroxyle libre du polysaccharide avec le carbonyldiimidazole (CDI) (Bethell *et al* J. Biol. Chem. 1979, 254 ; 2572-4, Hearn *et al* J. Chromatogr. 1981. 218 ; 509-18), puis réaction avec une protéine pour former une liaison carbamate. Ceci peut impliquer 20 la réduction de la terminaison anomère pour donner un groupe hydroxyle primaire, une protection/déprotection facultative du groupe hydroxyle primaire, la réaction du groupe hydroxyle primaire avec le CDI pour former un intermédiaire CDI-carbamate et le couplage de 25 l'intermédiaire CDI-carbamate avec un groupe amino se trouvant sur une protéine.

Les conjugués peuvent également être préparés par des procédés d'amination réductrice directe, comme décrit dans les documents US 4 365 170 (Jennings) et 30 US 4 673 574 (Anderson). D'autres procédés sont décrits

dans les documents EP-0-161-188, EP-208 375 et EP-0-477 508.

Un autre procédé implique le couplage d'un polysaccharide dérivatisé avec le dihydrazide d'acide 5 adipique (ADH) et activé par le bromure de cyanogène (ou CDAP) à une protéine porteuse par condensation en présence d'un carbodiimide (Chu C. et al *Infect. Immunity*, 1983 245 256), par exemple, en utilisant l'EDAC.

Dans un mode de réalisation, au moins un 10 polysaccharide de *S. pneumoniae* est conjugué à une protéine porteuse par l'intermédiaire d'un lieu en utilisant CDAP et EDAC. Par exemple, 18C ou 22F peuvent être conjugués à une protéine par l'intermédiaire d'un lieu (par exemple ceux contenant deux groupes hydrazino 15 à leur extrémité, comme ADH) en utilisant CDAP et EDAC, comme décrit ci-dessus. Quand un lieu est utilisé, le CDAP peut être utilisé pour conjuguer le polysaccharide au lieu et l'EDAC peut être utilisé pour conjuguer le lieu à une protéine ou, en variante, l'EDAC peut être 20 utilisé en premier pour conjuguer le lieu à la protéine, après quoi le CDAP peut être utilisé pour conjuguer le lieu au saccharide.

Dans un mode de réalisation, un groupe hydroxyle 25 (de manière appropriée, un groupe hydroxyle activé, par exemple un groupe hydroxyle activé pour former un ester de cyanate [par exemple, avec le CDAP]) se trouvant sur un polysaccharide est lié à un groupe amino ou carboxylique se trouvant sur une protéine, soit directement, soit indirectement (par l'intermédiaire 30 d'un lieu). Quand un lieu est présent, un groupe hydroxyle se trouvant sur un polysaccharide est lié, de

manière appropriée, à un groupe amino se trouvant sur un lieu, par exemple en utilisant une conjugaison en présence de CDAP. Un autre groupe amino se trouvant sur le lieu (par exemple, ADH) peut être conjugué à un 5 groupe acide carboxylique se trouvant sur une protéine, par exemple en utilisant la chimie des carbodiimides, par exemple l'EDAC. Dans un mode de réalisation, le ou les saccharides capsulaires pneumococciques sont tout d'abord conjugués au lieu, avant que le lieu soit 10 conjugué à la protéine porteuse. En variante, le lieu peut être conjugué au support avant d'être conjugué au saccharide.

Une combinaison de techniques peut également être utilisée, certains conjugués saccharide-protéine étant 15 préparés par le CDAP, et certains par amination réductrice.

En général, les types suivants de groupes chimiques sur une protéine porteuse peuvent être utilisés pour un couplage/une conjugaison :

20 A) un carboxyle (par exemple, par l'intermédiaire de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique). Dans un mode de réalisation, ce groupe est lié directement aux groupes amino se trouvant sur les polysaccharides ou lié à un groupe amino se trouvant sur un lieu avec la chimie 25 des carbodiimides, par exemple avec l'EDAC.

B) un groupe amino (par exemple, par l'intermédiaire de la lysine). Dans un mode de réalisation, ce groupe est lié directement aux groupes carboxyle se trouvant sur les polysaccharides ou lié à 30 un groupe carboxyle se trouvant sur un lieu avec la chimie des carbodiimides, par exemple avec l'EDAC. Dans

un autre mode de réalisation, ce groupe est lié directement aux groupes hydroxyle activés par le CDAP ou CNBr se trouvant sur les polysaccharides ou lié à ces groupes se trouvant sur un lieu ; aux polysaccharides 5 ou aux lieux contenant un groupe aldéhyde ; aux polysaccharides ou aux lieux contenant un groupe ester de succinimide.

C) un sulfhydryle (par exemple, par l'intermédiaire de la cystéine). Dans un mode de réalisation, ce groupe 10 est lié à un polysaccharide bromo- ou chloro-acétylé ou à un lieu par la chimie des maléimides. Dans un mode de réalisation, ce groupe est activé/modifié avec la bisdiazobenzidine.

D) un groupe hydroxyle (par exemple, par l'intermédiaire de la tyrosine). Dans un mode de réalisation, ce groupe est activé/modifié avec la bisdiazobenzidine. 15

E) un groupe imidazolyle (par exemple, par l'intermédiaire de l'histidine). Dans un mode de réalisation, ce groupe est activé/modifié avec la bisdiazobenzidine. 20

F) un groupe guanidyle (par exemple, par l'intermédiaire de l'arginine).

G) un groupe indolyle (par exemple, par l'intermédiaire du tryptophane). 25

Sur un saccharide, en général, les groupes suivants peuvent être utilisés pour un couplage : OH, COOH ou NH<sub>2</sub>. Des groupes aldéhyde peuvent être générés après différents traitements connus dans l'art, par exemple 30 avec du périodate, par hydrolyse acide, avec le peroxyde d'hydrogène, etc.

Approches de couplage direct :

Saccharide-OH + CNBr ou CDAP -> ester de cyanate + NH<sub>2</sub>-  
 5 Protéine -> conjugué

Saccharide-aldéhyde + NH<sub>2</sub>-Protéine -> base de Schiff +  
 NaCNBH3 -> conjugué

Saccharide-COOH + NH<sub>2</sub>-Protéine + EDAC -> conjugué

Saccharide-NH<sub>2</sub> + COOH-Protéine + EDAC -> conjugué

10

Approches de couplage indirect par l'intermédiaire d'un espaceur (lieur)

Saccharide-OH + CNBr ou CDAP -> ester de cyanate + NH<sub>2</sub>-  
 --NH<sub>2</sub> -> saccharide-NH<sub>2</sub> + COOH-Protéine + EDAC ->  
 15 conjugué

Saccharide-OH + CNBr ou CDAP -> ester de cyanate + NH<sub>2</sub>-  
 --SH -> saccharide-SH + SH-Protéine (protéine native  
 ayant une cystéine exposée ou obtenue après modification  
 20 des groupes amino de la protéine par SPDP, par exemple)  
 -> saccharide-S-S-Protéine

Saccharide-OH + CNBr ou CDAP --> ester de cyanate + NH<sub>2</sub>-  
 --SH -> saccharide---SH + maléimide-Protéine  
 25 (modification des groupes amino) -> conjugué

Saccharide-OH + CNBr ou CDAP --> ester de cyanate + NH<sub>2</sub>-  
 --SH -> saccharide---SH + Protéine haloacétylée ->  
 conjugué

30

Saccharide-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>---NH<sub>2</sub> -> saccharide---NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Protéine -> conjugué

Saccharide-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>-SH -> saccharide-SH + SH-  
5 Protéine (protéine native ayant une cystéine exposée ou obtenue après modification des groupes amino de la protéine par SPDP, par exemple) -> saccharide-S-S-Protéine

Saccharide-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>-SH -> saccharide---SH +  
10 maléimide-Protéine (modification des groupes amino) -> conjugué

Saccharide-COOH + EDAC + NH<sub>2</sub>-SH -> saccharide-SH +  
Protéine haloacétylée -> conjugué

15 Saccharide-aldéhyde + NH<sub>2</sub>---NH<sub>2</sub> -> saccharide-NH<sub>2</sub> + EDAC + COOH-Protéine -> conjugué.

20 Remarque : au lieu de l'EDAC ci-dessus, n'importe quel carbodiimide approprié peut être utilisé.

En résumé, les types de groupe chimique de la protéine porteuse qui peuvent être généralement utilisés pour un couplage avec un polysaccharide sont les groupes amino (par exemple, sur les résidus lysine), les groupes 25 COOH (par exemple, sur les résidus acide aspartique et acide glutamique) et les groupes SH (s'ils sont accessibles) (par exemple, sur les résidus cystéine).

Dans un mode de réalisation, le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de 30 l'invention est conjugué à la protéine porteuse (par exemple, CRM-197) en utilisant la chimie au CDAP. Dans

un aspect, la chimie au CDAP utilise un rapport CDAP/PS6A situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, par exemple de 1/1. Dans un autre aspect, la conjugaison en présence de CDAP est réalisée en utilisant un temps de couplage situé 5 entre 50 et 130 minutes, 60 et 130 minutes, ou 110 et 130 minutes. Par conséquent, la présente invention propose également un procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (par exemple, un 10 polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention) comprenant la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197) ou à un lieur (par 15 exemple, ADH) en utilisant la chimie au CDAP avec un rapport CDAP/PS (polysaccharide) situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, par exemple de 1/1.

Dans un autre aspect, la présente invention propose 20 un procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (par exemple, un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention) comprenant la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 25 à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197) en utilisant la chimie au CDAP avec un rapport CDAP/PS (polysaccharide) situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, par exemple de 1/1. Dans un aspect, la présente invention propose également un procédé de 30 préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (par exemple,

un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention, tel qu'un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A ayant une taille moyenne (par exemple,  $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 110 et 750, 150 et 500, 180 et 600, 210 et 490, 210 et 450, 180 et 400, 210 et 400, 210 et 370, 220 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa) comprenant la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197) ou à un lieu (par exemple, ADH) en utilisant la chimie au CDAP avec un temps de couplage situé entre 50 et 130 minutes, 60 et 130 minutes, ou 110 et 130 minutes.

Dans un autre aspect, la présente invention propose un procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (par exemple, un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention, tel qu'un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A ayant une taille moyenne (par exemple,  $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 110 et 750, 150 et 500, 180 et 600, 210 et 490, 210 et 450, 180 et 400, 210 et 400, 210 et 370, 220 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa) comprenant la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197) en utilisant la chimie au CDAP avec un temps de couplage situé entre 50 et 130 minutes, 60 et 130 minutes, ou 110 et 130 minutes. Dans un aspect, le pH pour l'activation

et le couplage est situé entre pH 8 et pH 9, de manière appropriée le pH est de 9,5. Dans un autre aspect, la conjugaison est réalisée en présence de NaCl. Par exemple, dans du NaCl 0,1 à 3 M, du NaCl 0,1 à 2,5 M, du NaCl 1,5  
5 à 2,5 M ou du NaCl 2 M.

La présente invention propose également un procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A comprenant (a) la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (par exemple, un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention) à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197) et (b) une diafiltration contre une solution 10 présentant une concentration en NaCl inférieure à 150 mM (par exemple, inférieure à 100 mM de NaCl, inférieure à 50 mM de NaCl, inférieure à 10 mM de NaCl) ou en utilisant de l'eau (par exemple, WFI, eau pour injection).  
15

Dans un autre aspect, la présente invention propose d'une solution comprenant 6A-CRM197 dans moins de 150 mM de NaCl. Par exemple, moins de 100 mM de NaCl, moins de 50 mM de NaCl, moins de 10 nM de NaCl, ou en l'absence 20 de chlorure de sodium. Dans un autre aspect, la présente invention propose une composition immunogène de l'invention (par exemple, 6A-CRM197) comprenant moins de 25 150 mM de NaCl. Par exemple, moins de 100 mM de NaCl, moins de 50 mM de NaCl, moins de 10 mM de NaCl, ou en l'absence de chlorure de sodium.

30 Rapport protéine porteuse sur polysaccharide

Dans un mode de réalisation, le rapport protéine porteuse sur polysaccharide de *S. pneumoniae* est situé entre 1/5 et 5/1 ; par exemple entre 1/0,5 et 4/1, 1/1 et 3,5/1, 1,2/1 et 3/1, 1,5/1 et 2,5/1 ; par exemple 5 entre 1/2 et 2,5/1 ; 1/1 et 2/1 (en poids/poids). Dans un mode de réalisation, la majorité des conjugués, par exemple 6, 7, 8, 9 ou plus de 9 des conjugués, présente un rapport protéine porteuse sur polysaccharide qui est supérieur à 1/1, par exemple de 1,1/1, 1,2/1, 1,3/1, 10 1,4/1, 1,5/1 ou 1,6/1.

Dans un mode de réalisation, le rapport protéine porteuse sur polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A dans les compositions immunogènes de l'invention est situé entre 5/1 et 1/5, 15 4/1 et 1/1 ou 2/1 et 1/1, 1,5/1 et 1/1, 1,4/1 et 1,3/1 (par exemple, 1,2/1, 1,5/1) (en poids/poids).

Le rapport polysaccharide sur protéine porteuse (en poids/poids) dans un conjugué peut être déterminé en utilisant le conjugué. La quantité de protéine est 20 déterminée en utilisant un essai de Lowry (par exemple, Lowry et al. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 ou Peterson et al. Analytical Biochemistry 100, 201-220 (1979)) et la quantité de polysaccharide est déterminée en utilisant un essai au résorcinol (Monsigny et al. 25 (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530). Le rapport protéine/polysaccharide final (en poids/poids) sur le conjugué stérilisé est déterminé par le rapport des concentrations de Lowry/résorcinol.

30 Taille des polysaccharides capsulaires dans la composition immunogène

Les polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* comprennent des motifs oligosaccharidiques répétitifs qui contiennent jusqu'à 8 fragments glucidiques. Pour une vue d'ensemble des motifs 5 oligosaccharidiques pour les sérotypes clés de *Streptococcus pneumoniae*, voir JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Ciênc., juin 2005, vol. 77, no. 2, p. 293-324. Tableau II ISSN 0001-3765.

10 Dans un mode de réalisation, un polysaccharide capsulaire peut être un polysaccharide pleine longueur, cependant dans d'autres il peut être plus court que la chaîne polysaccharidique native de motifs répétitifs. Dans un mode de réalisation, les conjugués de

15 polysaccharide capsulaire de sérotype de *Streptococcus pneumoniae* post-conjugaison doivent être facilement filtrables à travers un filtre de 0,2 micron, de façon qu'un rendement de plus de 95 % soit obtenu après la filtration par rapport à l'échantillon avant la

20 filtration.

En plus du conjugué de polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de l'invention, la composition immunogène de l'invention peut comprendre un ou plusieurs conjugués de 25 (poly)saccharide issus de sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* différents de 6A (par exemple, 6B et/ou 23F), dans lesquels la taille moyenne (par exemple, le poids moléculaire moyen en poids ;  $M_w$ ) du (poly)saccharide avant la conjugaison est supérieure à 80 kDa, 100 kDa, 30 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa, 700 kDa ou 1000 kDa. Par exemple, la composition immunogène de l'invention

peut comprendre un ou plusieurs conjugués de (poly)saccharide issus de sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* différents de 6A, dans lesquels la taille moyenne (par exemple, le poids moléculaire moyen en 5 poids ;  $M_w$ ) du (poly)saccharide avant la conjugaison est située entre 80 kDa et 100 kDa, 100 et 200 kDa, 200 et 300 kDa, 300 et 400 kDa, 400 et 500 kDa, 500 et 1000 kDa ou 1000 et 1400 kDa. Dans un mode de réalisation, la 10 composition immunogène comprend (i) un conjugué de polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A et (ii) un ou plusieurs conjugués de (poly)saccharide ayant une taille moyenne de saccharide avant la conjugaison de 50 à 1600, 80 à 1400, 100 à 1000, 150 à 500, ou 200 à 400 kDa (il doit 15 être noté que quand la taille moyenne est  $M_w$ , l'unité « kDa » doit être remplacée ici par «  $\times 10^3$  »).

Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 1 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 200 et 800, 250 et 600, ou 300 et 400 kDa. Dans un mode de réalisation, 20 la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 4 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 500, 60 et 300, 70 et 150, ou 75 et 125 kDa. Dans un mode de réalisation, 25 la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 5 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 100 et 700, 100 et 350, ou 150 et 300 kDa. Dans un mode de réalisation, 30 la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae*

de sérotype 6B présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 200 et 1800, 500 et 1800, 600 et 1800, 900 et 1660, ou 1000 et 1400 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 7F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 500, ou 200 et 300 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 9V présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 500, 200 et 400, ou 250 et 300 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 14 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 500, ou 200 et 250 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 18C présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 50 et 750, 50 et 500, 50 et 190, 50 et 150 ou 80 et 110 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* 19A présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 800, 110 et 700, 110 et 300, 120 et 200, 130 et 180, 140 et 160 ou 80 et 130 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 19F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 100 et 500, 100 et 190 ou 120 et 180 kDa. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention

comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 23F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 500 et 1500, 600 et 1500, 700 et 1300, 900 et 1250, 800 et 1100, ou 900 et 1000 kDa. Dans un mode de réalisation, 5 la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide de *S. pneumoniae* de sérotype 22F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 800, 110 et 700, 110 et 300, 120 et 200, 130 et 180, 150 et 170, 100 et 190, 100 et 150, 95 et 125 ou 100 et 115 10 kDa.

Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend 1 ou plusieurs polysaccharides capsulaires natifs issus de différents sérotypes de *S. pneumoniae*. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène comprend des polysaccharides de *Streptococcus pneumoniae* issus d'au moins 10 sérotypes conjugués à une protéine porteuse, dans lesquels au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 des sérotypes de polysaccharide de *S. pneumoniae* sont des polysaccharides natifs. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un polysaccharide capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 23F. 20 25

Dans un aspect de l'invention, la composition immunogène comprend des polysaccharides de *Streptococcus pneumoniae* issus d'au moins 10 sérotypes conjugués à une protéine porteuse, dans lesquels au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 des sérotypes de polysaccharide de 30

*S. pneumoniae* sont dimensionnés par un facteur allant jusqu'à x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 ou x10. Dans un mode de réalisation de cet aspect, la majorité des polysaccharides, par exemple 6, 7, 8 ou plus de 8 des 5 sérotypes de polysaccharide, sont dimensionnés par un facteur allant jusqu'à x2, x3, x4, x5, x6, x7, x8, x9 ou x10. Par exemple, le dimensionnement peut être d'un facteur situé entre x2 et x6, x2 et x5, x2 et x4, ou x3 et x6, x3 et x5 ou x3 et x4.

10 Dans un mode de réalisation, la majorité des polysaccharides de *S. pneumoniae* dans la composition immunogène est dimensionnée. Dans un mode de réalisation, la majorité des sérotypes de polysaccharide de *S. pneumoniae* dans la composition immunogène est 15 dimensionnée. Dans un aspect, les polysaccharides de *S. pneumoniae* dans la composition immunogène sont dimensionnés par clivage mécanique, par exemple par microfluidisation ou sonication. Dans un autre aspect, les polysaccharides de *S. pneumoniae* dans la composition 20 immunogène sont dimensionnés par clivage chimique, par exemple par un traitement avec de l'acide acétique ou un periodate. Le dimensionnement est effectué d'un facteur d'au plus x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 ou x2.

25 Dans un mode de réalisation, la composition immunogène comprend des conjuguées de *S. pneumoniae* qui sont un mélange de polysaccharides natifs et de polysaccharides qui sont dimensionnés d'un facteur d'au plus x20, x10, x8, x6, x5, x4, x3 ou x2. Dans un aspect de ce mode de réalisation, la majorité des 30 polysaccharides, par exemple 6, 7, 8, 9, 10 ou plus de

10 des polysaccharides, est dimensionnée d'un facteur allant jusqu'à x2, x3, x4, x5 ou x6.

Dosage

5 En général, la composition immunogène de l'invention peut comprendre une dose de chaque conjugué de saccharide située entre 0,1 et 20 µg, 1 et 10 µg ou 1 et 3 µg de saccharide.

10 Dans un mode de réalisation, dans la composition immunogène de la présente invention, la dose du conjugué de polysaccharide 6A de *Streptococcus pneumoniae* est située entre 1 et 10 µg, 1 et 5 µg, ou 1 et 3 µg de saccharide (par exemple, 2 µg).

15 Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention contient chaque saccharide capsulaire de *S. pneumoniae* à une dose située entre 0,1 et 20 µg ; 0,5 et 10 µg ; 0,5 et 5 µg ou 1 et 3 µg de saccharide. Dans un mode de réalisation, les polysaccharides capsulaires peuvent être présents à des doses différentes, par exemple certains polysaccharides capsulaires peuvent être présents à une dose d'environ ou exactement de 1 µg ou certains polysaccharides capsulaires peuvent être présents à une dose d'environ ou exactement de 3 µg. Dans un mode de réalisation, les 20 polysaccharides de sérotypes 3, 18C et 19F sont présents à une dose plus élevée que les autres polysaccharides. Dans un mode de réalisation, les polysaccharides de sérotypes 4, 18C et 19F sont présents à une dose plus élevée que les autres polysaccharides. Dans un aspect de 25 ce mode de réalisation, les sérotypes 3, 18C et 19F sont présents à une dose d'environ ou exactement de 3 µg,

tandis que les autres polysaccharides dans la composition immunogène sont présents à une dose d'environ ou exactement de 1 µg. Dans un aspect de ce mode de réalisation, les sérotypes 4, 18C et 19F sont 5 présents à une dose d'environ ou exactement de 3 µg, tandis que les autres polysaccharides dans la composition immunogène sont présents à une dose d'environ ou exactement de 1 µg.

Dans le cadre de la présente invention, « environ » 10 ou « approximativement » signifie à plus ou moins 10 % du chiffre donné.

#### Protéines de *Streptococcus pneumoniae*

La composition immunogène de l'invention peut 15 également comprendre des protéines de *Streptococcus pneumoniae*, appelées ci-après protéines de *Streptococcus pneumoniae* de l'invention. Ces protéines peuvent être utilisées comme protéines porteuses, ou elles peuvent être présentes sous forme de protéines libres, ou elles 20 peuvent être présentes à la fois sous forme de protéines porteuses et de protéines libres. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend en outre une ou plusieurs protéines de *S. pneumoniae* conjuguées ou non conjuguées. Dans un mode 25 de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend en outre une ou plusieurs protéines de *S. pneumoniae* non conjuguées. Par exemple, les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre une pneumolysine non conjuguée, par exemple 30 dPly, et PhtD pneumococcique non conjugué.

Les protéines de *Streptococcus pneumoniae* de l'invention sont exposées en surface, au moins pendant une partie du cycle biologique du pneumocoque, ou sont des protéines qui sont sécrétées ou libérées par le pneumocoque. Dans un mode de réalisation, les protéines de l'invention sont choisies parmi les catégories suivantes, telles que les protéines contenant un motif LXXC de séquence signal de type II (où X est un acide aminé quelconque, par exemple la famille des triades 5 polyhistididine (Phtx)), les protéines se liant à la choline (par exemple, CbpX, PcpA), les protéines contenant un motif de séquence signal de type I (par exemple, Sp101), les protéines contenant un motif LPXTG (où x est un acide aminé quelconque, par exemple Sp128, 10 Sp130) et les toxines (par exemple, Ply). Les exemples préférés dans ces catégories (ou motifs) sont les protéines suivantes, ou leurs équivalents immunologiquement fonctionnels. Par conséquent, la composition immunogène de l'invention peut comprendre 15 une ou plusieurs protéines de *S. pneumoniae* choisies parmi la famille des triades polyhistididine (Phtx), la famille des protéines se liant à la choline (CbpX), les CbpX tronquées, la famille LytX des autolysines pneumococciques (LytA (N-acétylmuramoyl-l-alanine 20 amidase), LytB, LytC), les LytX tronquées, les protéines chimères CbpX tronquée-LytX tronquée, la pneumolysine détoxifiée (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 25 et Sp133. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend 2 ou plus de 2 protéines choisies dans le groupe constitué par la famille des triades polyhistididine (Phtx), la famille des 30

protéines se liant à la choline (CbpX), les CbpX tronquées, la famille des LytX, les LytX tronquées, les protéines chimère CbpX tronquée-LytX tronquée (ou les fusions), la pneumolysine (Ply), PspA, PsaA et Sp128.

5 Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène comprend 2 ou plus de 2 protéines choisies dans le groupe constitué par la famille des triades polyhistidine (PhtX), la famille des protéines se liant à la choline (CbpX), les CbpX tronquées, la famille des

10 LytX, les LytX tronquées, les protéines chimères CbpX tronquée-LytX tronquée (ou les fusions), la pneumolysine (Ply) et Sp128.

La famille des Pht (triade polyhistine) comprend les protéines PhtA, PhtB, PhtD et PhtE. La famille est caractérisée par une séquence de lipidation, deux domaines séparés par une région riche en proline et plusieurs triades d'histidine, éventuellement impliquées dans une liaison aux métaux ou aux nucléosides ou dans une activité enzymatique, (3 à 5) régions en superhélice, une région N-terminale conservée et une extrémité C-terminale hétérogène. Elle est présente dans toutes les souches de pneumocoques testées. Des protéines homologues ont également été trouvées dans d'autres Streptocoques et chez Nesseiria. Dans un mode de réalisation de l'invention, la composition immunogène comprend PhtD. Cependant, on comprendra que les termes Pht A, B, D et E font référence aux protéines possédant les séquences divulguées dans les citations ci-dessous, ainsi qu'à leurs variants naturels qui présentent une homologie de séquence qui est au moins identique à 90 % aux protéines décrites ci-dessous, par exemple les

acides aminés 21 à 838 de SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. Dans un mode de réalisation, elle est identique à au moins 95 % et, dans un autre mode de réalisation, elle est identique à 97 %.

5 En ce qui concerne les protéines PhtX, PhtA est divulguée dans le document WO 98/18 930, et est également appelée Sp36. Comme indiqué ci-dessus, c'est une protéine appartenant à la famille des triades polyhistididine qui contient le motif signal de type II, LXXC. PhtD est divulguée dans le document WO 00/37 105, et est également appelée Sp036D. Comme indiqué ci-dessus, c'est également une protéine appartenant à la famille des triades polyhistididine qui contient le motif signal de type II, LXXC. PhtB est divulguée dans le document 10 WO 00/37 105, et est également appelée Sp036B. Un autre membre de la famille de PhtB est le polypeptide de dégradation C3, divulgué dans le document WO 00/17 370. Cette protéine appartient également à la famille des triades polyhistididine et contient le motif signal de 15 type II, LXXC. Un équivalent immunologiquement fonctionnel préféré est la protéine Sp42 divulguée dans le document WO 98/18 930. Une PhtB tronquée (d'environ 79 kD), que l'on considère appartenir également à la famille des PhtX, est divulguée dans le document 20 WO 99/15 675. PhtE est divulguée dans le document WO 00/30 299, et est appelée BVH-3. Quand une protéine Pht quelconque est mentionnée dans le présent document, cela signifie que les fragments immunogènes, ou leurs fusions, de la protéine Pht peuvent être utilisés. Par 25 exemple, une référence à PhtX comprend les fragments 30

immunogènes ou leurs fusions provenant de n'importe quelle protéine Pht.

Dans un mode de réalisation, la protéine de *S. pneumoniae* choisie parmi un ou plusieurs membres de 5 la famille des triades polyhistidine est PhtD. Le terme « PhtD », tel qu'utilisé dans le présent document, comprend la protéine pleine longueur à laquelle la séquence signal est fixée ou la protéine pleine longueur mature de laquelle le peptide signal est retiré (par 10 exemple, 20 acides aminés à l'extrémité N-terminale), et ses fragments immunogènes, variants et/ou protéines de fusion, par exemple SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. Dans un aspect, PhtD est la protéine pleine longueur à laquelle la séquence signal est fixée, par exemple 15 SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. Dans un autre aspect, PhtD est une séquence comprenant la protéine pleine longueur mature de laquelle le peptide signal est retiré (par exemple, 20 acides aminés à l'extrémité N-terminale), par exemple les acides aminés 21 à 838 de 20 SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. De manière appropriée, la séquence de PhtD comprend une méthionine N-terminale. La présente invention comprend également les polypeptides PhtD qui sont des fragments immunogènes de PhtD, des variants de PhtD et/ou des protéines de fusion de PhtD. 25 Par exemple, comme décrit dans les documents WO 00/37 105, WO 00/39 299, US 6 699 703 et WO 09/12 588.

Quand des fragments immunogènes des protéines PhtD sont utilisés (séparément ou dans une protéine de fusion), ces fragments immunogènes auront une longueur d'au moins 30 environ 15, d'au moins environ 20, d'au moins environ 40, ou d'au moins environ 60 résidus d'acide aminé

contigus, par exemple provenant d'une séquence d'acide aminé de PhtD décrite dans le document WO 00/37 105 ou WO 00/39 299, comme SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. Dans un mode de réalisation de l'invention, les fragments 5 immunogènes de la protéine PhtD comprennent au moins environ 15, au moins environ 20, au moins environ 40, ou au moins environ 60 résidus d'acide aminé contigus de la séquence représentée par SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105, dans lequel ledit polypeptide est capable de déclencher 10 une réponse immunitaire spécifique pour ladite séquence d'acides aminés. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène de l'invention comprend un fragment immunogène de PhtD, par exemple décrit dans les documents WO 09/12 601, WO 01/98 334 et WO 09/12 588. 15 Quand des fragments immunogènes de protéines PhtD sont utilisés (séparément ou dans une protéine de fusion), chaque fragment immunogène contient facultativement un ou plusieurs motifs de triade d'histidine de ces polypeptides. Un motif de triade d'histidine est la 20 partie du polypeptide qui présente la séquence HxxHxH, où H est l'histidine et x est un acide aminé différent de l'histidine. Dans un mode de réalisation de la présente invention, le ou chaque fragment immunogène contient exactement ou au moins 2, 3, 4 ou 5 motifs de 25 triade d'histidine (facultativement, avec la séquence native de PhtD entre les 2 ou plus de 2 triades, ou une séquence intra-triade), le fragment immunogène étant à plus de 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 % identique à une séquence PhtD intra-triade pneumococcique native (par 30 exemple, la séquence intra-triade représentée par SEQ ID NO : 4 dans le document WO 00/37 105). Les

fragments immunogènes des protéines PhtD contiennent facultativement une ou plusieurs régions en superhélice de ces polypeptides. Une région en superhélice est une région prédictée par l'algorithme « Coils » Lupus, A et al 5 (1991) Science 252 ; 1162-1164. Dans un mode de réalisation de la présente invention, chaque fragment immunogène contient exactement ou au moins 2, 3 ou 4 régions en superhélice. Dans un mode de réalisation de la présente invention, le ou chaque fragment immunogène 10 contient exactement ou au moins 2, 3 ou 4 régions en superhélice, le fragment immunogène étant à plus de 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96 ou 100 % identique à une séquence PhtD pneumococcique native (par exemple, la séquence représentée par SEQ ID NO : 4 dans le document 15 WO 00/37 105). Dans un autre mode de réalisation de la présente invention, le fragment immunogène comprend un ou plusieurs motifs de triade d'histidine et au moins 1, 2, 3 ou 4 régions en superhélice.

Quand le polypeptide PhtD est un variant, la 20 variation se situe généralement dans une partie de celui-ci différente des résidus de la triade d'histidine et de la région en superhélice, bien que des variations dans une ou plusieurs de ces régions puissent être faites. Selon la présente invention, un variant polypeptidique 25 comprend des séquences dans lesquelles un ou plusieurs acides aminés sont substitués et/ou supprimés et/ou insérés par rapport à la séquence de type sauvage. Une substitution d'acide aminé peut être conservative ou non conservative. Dans un aspect, la substitution d'acide 30 aminé est conservative. Des substitutions, des délétions, des insertions ou n'importe quelle combinaison de

celles-ci peuvent être combinées dans un unique variant, du moment que le variant est un polypeptide immunogène. Les variant de PhtD comprennent généralement n'importe quel fragment immunogène ou n'importe quelle variation 5 de PhtD qui partage une identité de séquence d'acides aminés d'au moins 80, 90, 95, 96, 98 ou 99 % avec une séquence de PhtD de type sauvage, par exemple SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. Dans un mode de réalisation, la présente invention comprend des 10 fragments immunogènes et/ou des variants dans lesquels plusieurs 5 à 10, 1 à 5, 1 à 3, 1 à 2 ou 1 acide(s) aminé(s) est/sont substitué(s), supprimé(s) ou ajouté(s) dans n'importe quelle combinaison. Dans un autre mode de réalisation, la présente invention comprend des 15 fragments immunogènes et/ou des variants qui comprennent un épitope de lymphocyte B ou de lymphocyte T. Ces épitopes peuvent être prédits en utilisant une combinaison de prédiction de structure 2D, par exemple en utilisant le programme PSIPRED (de David Jones, Brunel 20 Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, RU) et l'indice antigénique calculé sur la base du procédé décrit par Jameson et Wolf (CABIOS 4 : 181-186 [1988]).

Dans un mode de réalisation de l'invention, PhtD et 25 ses fragments immunogènes, variants et/ou protéines de fusion comprennent une séquence d'acides aminés partageant une identité d'au moins 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 % avec la séquence d'acides aminés 21 à 838 de SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. Dans un autre 30 mode de réalisation, PhtD et ses fragments immunogènes, variants et/ou protéines de fusion possèdent une

séquence d'acides aminés partageant une identité d'au moins 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 % avec la séquence d'acides aminés 21 à 838 de SEQ ID NO : 4 de WO 00/37 105. De manière appropriée, PhtD et ses fragments immunogènes, variants et/ou protéines de fusion comprennent une séquence d'acides aminés contenant une méthionine N-terminale. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, PhtD et ses fragments immunogènes, variants et/ou protéines de fusion comprennent au moins environ 15, au moins environ 20, au moins environ 40, ou au moins environ 60 ou au moins environ 100, ou au moins environ 200, ou au moins environ 400 ou au moins environ 800 résidus d'acide aminé contigus de la séquence représentée par SEQ ID NO : 4 dans le document WO 00/37 105.

La pneumolysine (Ply) est une toxine multifonctionnelle ayant des activités cytolytiques (hémolytiques) et d'activation du complément distinctes (Rubins et al., Am. Respi. Cit Care Med, 153 : 1339-1346 (1996)). La toxine n'est pas sécrétée par les pneumocoques, mais elle est libérée après la lyse des pneumocoques sous l'action d'une autolysine. Ses effets comprennent, par exemple, la stimulation de la production des cytokines inflammatoires par les monocytes humains, l'inhibition du battement des cils sur l'épithélium respiratoire humain, la diminution de l'activité bactéricide et la migration des neutrophiles, la lyse des érythrocytes, qui implique la liaison au cholestérol. Comme c'est une toxine, elle doit être détoxifiée (c'est-à-dire, qu'elle doit être non toxique pour les humains quand elle est fournie à une dose

appropriée pour une protection) avant qu'elle soit administrée *in vivo*. L'expression et le clonage de la pneumolysine de type sauvage ou native sont connus dans l'art. Voir, par exemple, Walker *et al.* (*Infect Immun.* 5 55 : 1184-1189 (1987)), Mitchell *et al.* (*Biochim Biophys Acta*, 1007 : 67-72 (1989) et Mitchell *et al* (*NAR*, 18 : 4010 (1990))). La détoxification de Ply peut être effectuée par des moyens chimiques, par exemple par soumission à un traitement au formaldéhyde ou au glutaraldéhyde, ou combinaison des deux (WO 04 081 515, PCT/EP 2005/010 258). Ces procédés sont connus dans l'art pour diverses toxines. En variante, ply peut être génétiquement détoxifiée. Par conséquent, l'invention englobe les dérivés de protéines pneumococciques qui peuvent être, par exemple, des protéines mutées. Le terme « muté » est utilisé ici pour désigner une molécule qui a subi une délétion, une addition ou une substitution d'un ou de plusieurs acides aminés en utilisant des techniques connues de mutagenèse dirigées ou tout autre procédé classique. Par exemple, comme décrit ci-dessus, une protéine ply mutante peut être modifiée de manière à être biologiquement inactive tout en conservant ces épitopes immunogènes, voir, par exemple, le document WO 90/06 951, Berry *et al.* (*Infect Immun*, 67 : 981-985 20 (1999)) et le document WO 99/03 884.

Tel qu'utilisé dans le présent document, il est entendu que le terme « Ply » désigne une pneumolysine mutée et une pneumolysine détoxifiée (dPly), appropriées pour une utilisation médicale (c'est-à-dire, non 30 toxique).

En ce qui concerne les protéines se liant à la choline (CbpX), les membres de cette famille ont à l'origine été identifiés comme des protéines pneumococciques qui pouvaient être purifiées par chromatographie d'affinité avec la choline. Toutes les protéines se liant à la choline sont liées de manière non covalente aux fragments phosphorylcholine de l'acide téichoïque des parois cellulaires et de l'acide lipotéichoïque associé aux membranes. Sur le plan de la structure, elles ont plusieurs régions en commun sur toute la famille, bien que la nature exacte des protéines (séquence d'acides aminés, longueur, etc.) puisse varier. En général, les protéines se liant à la choline comprennent une région N-terminale (N), des régions à répétition conservées, une région riche en proline (P) et une région conservée se liant à la choline (C), constituée de multiples répétitions, qui représente environ la moitié de la protéine. Tel qu'utilisé dans la présente demande, le terme « famille de protéines se liant à la choline (CbpX) » est choisi dans le groupe constitué par les protéines se liant à la choline identifiées dans le document WO 97/41 151, la protéine A se liant à la choline, CbpA (également appelée PbcA (protéine A de liaison C3), SpsA (protéine de liaison IgA sécrétoire de *Streptococcus pneumoniae*), PspC (protéine C de surface des pneumocoques), la protéine D se liant à la choline (CbpD) et la protéine G se liant à la choline (CbpG). CbpA est divulguée dans le document WO 97/41 151. CbpD et CbpG sont divulguées dans le document WO 00/29 434. PspC est divulguée dans le document WO 97/09 994. PbcA est divulguée dans le

document WO 98/21 337. SpsA est une protéine se liant à la choline divulguée dans le document WO 98/39 450. Dans un mode de réalisation, la protéine se liant à la choline est CbpA. Une autre protéine se liant à la choline est 5 la protéine A pneumococcique se liant à la choline (PcpA) (Sanchez-Beato *et al* FEMS Microbiology Letters 164 (1998) 207-214).

Un autre mode de réalisation préféré est les CbpX tronquées, où « CbpX » est CbpA, CbpD ou CbpG et 10 « tronquées » fait référence aux protéines CbpX dépourvues de 50 % ou plus de la région se liant à la choline (C). Un autre mode de réalisation préféré est les PcpA tronquées, où « tronquées » fait référence aux protéines PcpA dépourvues de 50 % ou plus de la région 15 se liant à la choline (C). Dans un mode de réalisation, les CbpX tronquées et les PcpA sont dépourvues de la totalité de la région se liant à la choline. Dans un autre mode de réalisation, les CbpX tronquées et les PcpA sont dépourvues (i) de la région se liant à la 20 choline et (ii) également d'une partie de la moitié N-terminale de la protéine, mais elles conservent au moins une région à répétition. Dans un autre mode de réalisation, la protéine tronquée comporte au moins 2 régions à répétition. Des exemples de ces modes de 25 réalisation préférés sont illustrés dans le document WO 99/51 266 ou WO 99/51 188, bien que d'autres protéines se liant à la choline dépourvues d'une région similaire se liant à la choline soient également envisagées dans le cadre de la présente invention.

30 La famille des LytX comprend les protéines associées à la membrane associées à la lyse cellulaire.

Le domaine N-terminal comprend le(s) domaine(s) se liant à la choline, bien que la famille des LytX ne présente pas toutes les caractéristiques que l'on trouve chez la famille des CbpA décrite ci-dessus, par conséquent, pour 5 la présente invention, on considère que la famille des LytX est distincte de la famille des CbpX. Par rapport à la famille des CbpX, le domaine C-terminal contient le domaine catalytique de la famille des protéines LytX. La famille comprend LytA, LytB et LytC. En ce qui concerne 10 la famille des LytX, LytA est divulguée dans Ronda et al., Eur. J Biochem, 164 : 621-624 (1987). LytB est divulguée dans le document WO 98/18 930, et est également appelée Sp46. LytC est également divulguée dans le document WO 98/18 930, et est également appelée 15 Sp91. Un membre préféré de cette famille est LytC.

Un autre mode de réalisation préféré est les LytX tronquées, où « LytX » est LytA, LytB et LytC et « tronquée » fait référence aux protéines LytX dépourvues de 50 % ou plus de la région se liant à la 20 choline. De manière appropriée, ces protéines sont dépourvues de la totalité de la région se liant à la choline. Un autre mode de réalisation préféré de la présente invention comprend les protéines chimères (ou les fusions) CbpX tronquée-LytX tronquée. Dans un mode 25 de réalisation, la protéine chimère CbpX tronquée-LytX tronquée comprend les régions de répétition de CbpX et la partie C-terminale (Cterm, c'est-à-dire dépourvue des domaines se liant à la choline) de la LytX (par exemple, LytCCterm ou Sp91Cterm). Dans un autre mode de 30 réalisation, CbpX est choisie dans le groupe constitué par CbpA, PbcA, SpsA et Pspc. Dans un autre mode de

réalisation, c'est CbpA. Dans un mode de réalisation, LytX est LytC (également appelée Sp91). Un autre mode de réalisation de la présente invention est une PspA ou des PsaA tronquées dépourvues du domaine se liant à la 5 choline (C) et qui sont exprimées sous la forme d'une protéine de fusion avec LytX. Dans un mode de réalisation, LytX est LytC.

PsaA et ses variants à délétion transmembranaire ont été décrits par Berry & Paton, Infect Immun 1996 10 déc ; 64(12) : 5255-62. PspA et ses variants à délétion transmembranaire ont été décrits, par exemple, dans les documents US 5 804 193, WO 92/14 488 et WO 99/53 940.

Sp128 et Sp130 sont décrites dans le document WO 00/76 540. Sp125 est un exemple de protéine 15 pneumococcique de surface contenant le motif ancré dans la paroi cellulaire, LPXTG (c'est-à-dire, leucine-proline-X-thréonine-glycine, où X est n'importe quel acide aminé). Les protéines appartenant à cette classe de protéines pneumococciques de surface contenant ce 20 motif se sont avérées utiles dans le contexte de la présente invention et sont donc considérées comme des protéines supplémentaires de l'invention. Sp125 est elle-même divulguée dans le document WO 98/18 930, et est également appelée ZmpB - une métalloprotéinase de 25 zinc. Sp101 est divulguée dans le document WO 98/06 734 (où elle a la référence #y85993). Elle est caractérisée par une séquence signal de type I. Sp133 est divulguée dans le document WO 98/06 734 (où elle a la référence #y85992). Elle est également caractérisée par une 30 séquence signal de type I.

Les protéines de l'invention peuvent également être avantageusement combinées. Par « combinées », on entend que la composition immunogène comprend toutes les protéines provenant des combinaisons suivantes, sous forme de protéines porteuses ou de protéines libres, ou un mélange des deux. Par exemple, dans une combinaison de deux protéines telle que décrite ci-dessous, les deux protéines peuvent être utilisées comme protéines porteuses, ou les deux protéines peuvent être présentes sous forme de protéines libres, ou les deux peuvent être présentes sous forme de protéine porteuse et de protéine libre, ou l'une peut être présente sous la forme d'une protéine porteuse et d'une protéine libre tandis que l'autre n'est présente que sous la forme d'une protéine porteuse ou que sous la forme d'une protéine libre, ou l'une peut être présente sous la forme d'une protéine porteuse et l'autre sous la forme d'une protéine libre. Quand une combinaison de trois protéines est donnée, les mêmes possibilités existent. Les combinaisons préférés comprennent, mais sans s'y limiter, PhtD + les régions de répétition de CbpX, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + les régions de répétition de CbpX, PhtA + les régions de répétition de CbpX -protéines de fusion ou chimères de Sp91CTerm, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, les régions de répétition de CbpX + LytC, les régions de répétition de CbpX + PspA, les régions de répétition de CbpX + PsaA, les régions de répétition de CbpX + Sp128, les régions de répétition de CbpX + LytC, les régions de répétition de CbpX + PspA, les régions de répétition de CbpX + PsaA, les régions de répétition de CbpX + Sp128, les régions

de répétition de CbpX + PhtD, les régions de répétition de CbpX + PhtA. Dans un mode de réalisation, les régions de répétition de CbpX proviennent de CbpA. Dans un autre mode de réalisation, c'est à partir de CbpA. D'autres 5 combinaisons comprennent des combinaisons avec 3 protéines, comme PhtD + les régions de répétition de CbpX + Ply, et PhtA + les régions de répétition de CbpX + PhtD. Dans un mode de réalisation, la composition immunogène comprend une pneumolysine détoxifiée et PhtD 10 ou PhtE en tant que protéines porteuses. Dans un autre mode de réalisation, la composition immunogène comprend une pneumolysine détoxifiée et PhtD ou PhtDE sous forme de protéines libres.

La teneur totale en antigènes protéiques dans le 15 vaccin sera généralement située dans la plage allant de 1 à 100 µg, ou de 5 à 80 µg, par exemple dans la plage allant de 50 à 70 µg. Par exemple, dans un aspect, la composition immunogène de l'invention comprend 26 µg à 20 45 µg (par exemple, 26 µg à 40 µg, 28 µg à 35 µg ou environ 30 µg) de chaque protéine de *S. pneumoniae*, par dose pour les humains. Dans un autre aspect, la composition immunogène comprend 26 µg à 45 µg (par exemple, 26 µg à 40 µg, 28 µg à 35 µg ou environ 30 µg) de PhtD, par dose pour les humains. Dans un autre aspect, 25 la composition immunogène de l'invention comprend 26 µg à 45 µg (par exemple, 26 µg à 40 µg, 28 µg à 35 µg ou environ 30 µg) de pneumolysine (par exemple dPly), par dose pour les humains.

Par le terme « dose pour les humains », on entend 30 une dose qui est dans un volume approprié pour une utilisation chez les humains. Généralement, celle-ci est

située entre 0,25 et 1,5 ml. Dans un mode de réalisation, une dose pour les humains est de 0,5 ml. Dans un autre mode de réalisation, une dose pour les humains est supérieure à 0,5 ml, par exemple de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 5 ou 1 ml. Dans un autre mode de réalisation, une dose pour les humains est située entre 1 ml et 1,5 ml. Dans un autre mode de réalisation, en particulier quand la composition immunogène est destinée à la population pédiatrique, une dose pour les humains peut être 10 inférieure à 0,5 ml, par exemple entre 0,25 et 0,5 ml.

#### Adjuvants

Les compositions immunogènes de la présente invention peuvent être adjuvantées, en particulier quand 15 elles sont destinées à être utilisées chez les personnes âgées, mais également chez les nourrissons. Par conséquent, un autre aspect est une composition immunogène de l'invention qui comprend en outre un adjuvant. Les adjuvants appropriés comprennent un sel 20 d'aluminium, tel qu'un gel d'hydroxyde d'aluminium ou le phosphate d'aluminium ou l'alun, mais un adjuvant approprié peut également être un sel de calcium, de magnésium, de fer ou de zinc, ou peut être une suspension insoluble de tyrosine acylée, ou des sucres acylés, des 25 polysaccharides rendus anioniques ou cationiques, ou des polyphosphazènes. Dans un aspect de l'invention, l'adjuvant est un sel d'aluminium, par exemple le phosphate d'aluminium. Dans un autre aspect, l'adjuvant comprend (pour une dose de 0,5 ml), 100 à 750, 200 à 500, 30 ou 300 à 400 µg d'Al (aluminium) sous forme de phosphate d'aluminium.

Dans un mode de réalisation, l'adjuvant est un inducteur préférentiel d'une réponse de type Th1. Des taux élevés de cytokines de type Th1 ont tendance à favoriser l'induction de réponses immunitaires à 5 médiation cellulaire dirigées contre un antigène donné, tandis que des taux élevés de cytokines de type Th2 ont tendance à favoriser l'induction de réponses immunitaires humorales dirigées contre l'antigène. Les systèmes d'adjuvants appropriés qui favorisent 10 principalement une réponse Th1 comprennent : le lipide A monophosphorylé ou un dérivé de celui-ci, en particulier, le lipide A monophosphorylé 3-dés-0-acylé (3D-MPL) (pour sa préparation, voir le document GB 2 220 211 A) ; et une combinaison du lipide A 15 monophosphorylé, de manière appropriée le lipide A monophosphorylé 3-dés-0-acylé, avec soit un sel d'aluminium (par exemple, le phosphate d'aluminium ou l'hydroxyde d'aluminium), soit une émulsion huile-dans-eau. Dans de telles combinaisons, l'antigène et le 3D- 20 MPL sont contenus dans les mêmes structures particulaires, ce qui permet une délivrance plus efficace des signaux antigéniques et immunostimulants. Des études ont montré que le 3D-MPL est capable de renforcer davantage l'immunogénicité d'un antigène 25 adsorbé sur de l'alun [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16 : 708-14 ; document EP 689 454-B1].

La composition immunogène peut comprendre un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A (et facultativement un 30 immunostimulant) adsorbé sur un sel métallique (comme un sel d'aluminium, par exemple le phosphate d'aluminium ou

l'hydroxyde d'aluminium). Le terme « immunostimulant », tel qu'utilisé dans le présent document, fait référence à une substance qui stimule une réponse immunitaire, en particulier un adjuvant qui stimule le système immunitaire d'un animal hôte (par exemple, un humain) auquel elle est administrée, et qui augmente donc l'effet protecteur produit par un antigène administré à cet animal, par rapport à l'effet qui serait produit par l'administration de l'antigène seul. Pour les formulations de vaccin à base d'aluminium, l'antigène est généralement adsorbé sur un sel d'aluminium pendant une heure à température ambiante et sous agitation.

15 Adjuvants comprenant des immunostimulants supplémentaires

L'adjuvant de l'invention peut comprendre des immunostimulants, tels que des saponines (par exemple, le QS21) et/ou le 3D-MPL. Des exemples d'immunostimulants sont décrits dans le présent document et dans « Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach » 1995, *Pharmaceutical Biotechnology*, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X. Dans un aspect de la présente invention, l'adjuvant comprend du QS21, le lipide A monophosphorylé (MPL), un phospho-lipide et un stérol, présenté sous la forme d'un liposome.

Le QS-21 est une fraction de saponine purifiée à partir d'extraits d'écorce de l'arbre d'Amérique du Sud *Quillaja saponaria*. Le QS21 comprend généralement deux isomères principaux qui partagent un triterpène, un trisaccharide ramifié et une chaîne acyle pseudodimère

glycosylée. Les deux formes isomères diffèrent en ce qui concerne la constitution du sucre terminal au sein du segment tétrasaccharidique linéaire, l'isomère principal (QS-21-Api) incorporant un résidu  $\beta$ -D-apiose, et 5 l'isomère mineur (QS-21-Xyl) se terminant par un substituant  $\beta$ -D-xylose. (Cleland, J.L. et al. J. Pharm. Sci. 1996, 85, 22-28). Le QS21 peut être préparé par purification CLHP à partir du Quil A<sup>TM</sup>. Il a été décrit que le Quil A<sup>TM</sup> possède une activité d'adjuvant par 10 Dalsgaard et al. en 1974 (« Saponin adjuvants », Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p 243-254). Des procédés de production du QS21 sont décrits dans le document US 5 057 540 (où le QS21 est appelé QA21) et dans le document EP 0 362 278. Dans 15 un mode de réalisation, les compositions immunogènes de l'invention contiennent du QS21 sous une forme sensiblement pure, c'est-à-dire que le QS21 comprend au moins 90 %, par exemple au moins 95 %, ou au moins 98 % de la composition immunogène (c'est-à-dire que la composition de QS21 contient au moins 90 %, par exemple au moins 95 %, ou au moins 98 % de QS21). La dose de QS21 est capable de manière appropriée de renforcer de 20 réponse immunitaire dirigée contre un antigène chez un humain. En particulier, une quantité appropriée de QS21 est une quantité qui améliore le potentiel immunologique 25 de la composition par rapport à une composition non adjuvantée, ou par rapport à la composition adjuvantée avec une autre quantité de QS21, bien qu'étant acceptable à partir d'un profil de réactogénicité. Le QS21 peut 30 être utilisé, par exemple, en une quantité de 1 à 100  $\mu$ g

par dose de composition, par exemple en une quantité de 10 à 50 µg par dose de composition.

Le lipide A monophosphorylé (MPL) est un dérivé non toxique du lipopolysaccharide (LPS) de bactéries à Gram 5 négatif, par exemple *Salmonella minnesota* R595. Il conserve les propriétés adjuvantes du LPS tout en étant moins toxique (Johnson et al. 1987 Rev. Infect. Dis. 9 Suppl : S512-S516). Le MPL est composé d'une série d'espèces de lipide A 4-monophosphorylé chez qui 10 l'étendue et la position des substitutions d'acide gras varient. Il peut être préparé par le traitement du LPS avec un acide faible et une hydrolyse basique, puis par purification du LPS modifié. Par exemple, le LPS peut être mis à reflux dans une solution d'acide minéral de 15 force modérée (par exemple, de l'HCl 0,1 M) pendant une période d'environ 30 minutes. Ce procédé entraîne la déphosphorylation de la position 1, et la décarbohydratation de la position 6'. Le terme « lipide A monophosphorylé (MLP) », tel qu'utilisé dans le 20 présent document, comprend les dérivés du lipide A monophosphorylé. Les dérivés du lipide A monophosphorylé comprennent le 3D-MPL et les dérivés synthétiques.

Le 3D-MPL est le lipide A monophosphorylé 3-O-désacylé (lipide A monophosphorylé 3-dés-O-acylé). Sur 25 le plan chimique, c'est un mélange de lipide A monophosphorylé 3-désacylé contenant 4, 5 ou 6 chaînes acylées. Le 3D-MPL est disponible sous le nom commercial de MPL® chez GlaxoSmithKline Biologicals North America. Lipide A monophosphorylé 3-O-désacylé (3D-MPL). Il 30 présente une toxicité davantage réduite, tout en conservant des propriétés adjuvantes, et peut

généralement être préparé par hydrolyse alcaline douce, voir par exemple document US 4 912 094. L'hydrolyse alcaline est généralement réalisée dans un solvant organique, comme un mélange de chloroforme/méthanol, par 5 saturation avec une solution aqueuse de base faible, comme le carbonate de sodium 0,5 M à pH 10,5. Pour de plus amples informations sur la préparation du 3D-MPL, voir les documents GB 2 220 211 A et WO 02 078 637 (Corixa Corporation). Dans un aspect de la présente 10 invention, une petite particule 3D-MPL peut être utilisée. Une petite particule de 3D-MPL a une taille de particule telle qu'elle peut être stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,22 µm. De telles préparations sont décrites dans la demande de brevet 15 international No. WO 94/21 292. Dans un mode de réalisation, les compositions immunogènes de l'invention comprennent le lipide A monophosphorylé 3-O-désacylé (3D-MPL).

La dose d'un lipide A monophosphorylé (MPL), par 20 exemple le 3D-MPL, est de manière appropriée capable de renforcer une réponse immunitaire dirigée contre un antigène chez un humain. En particulier, une quantité appropriée de lipide A monophosphorylé (MLP), par exemple de 3D-MPL, est une quantité qui améliore le 25 potentiel immunologique de la composition par rapport à la composition non adjuvantée, ou par rapport à la composition adjuvantée avec une autre quantité de MPL, tout en étant acceptable à partir d'un profil de réactogénicité. Un lipide A monophosphorylé (MPL), par 30 exemple le 3D-MPL, peut être utilisé, par exemple, en une quantité de 1 à 100 µg par dose de composition, par

exemple en une quantité de 10 à 50 µg par dose de composition.

Des liposomes peuvent être préparés à partir de phospholipides (tels que la dioléoyl phosphatidyl choline, DOPC) et d'un stérol, par exemple le cholestérol, en utilisant des techniques connues dans l'art. Ces supports liposomiques peuvent porter le QS21 et/ou un lipide A monophosphorylé (MPL), par exemple le 3D-MPL. Les compositions appropriées de l'invention sont celles dans lesquelles des liposomes sont initialement préparés sans MPL (comme décrit dans le document WO 96/33 739), et le MPL est ensuite ajouté, de manière appropriée sous forme de petites particules de moins de 100 nm ou de particules susceptibles d'être stérilisées par filtration à travers une membrane de 0,22 µm. Le MPL n'est donc pas contenu au sein de la membrane des vésicules (connu sous le nom de MPL out). Les compositions dans lesquelles le MPL est contenu au sein de la membrane des vésicules (connu sous le nom de MPL in) forment également un aspect de l'invention. Les protéines de *S. pneumoniae* non conjuguées peuvent être contenues au sein de la membrane des vésicules ou contenues hors de la membrane des vésicules. De manière appropriée, les antigènes solubles se trouvent à l'extérieur et les antigènes hydrophobes ou lipidés sont à l'intérieur ou à l'extérieur de la membrane. L'encapsulation dans les liposomes est décrite dans le document US 4 235 877.

Les liposomes de la présente invention peuvent comprendre un phospholipide, par exemple une phosphatidylcholine, qui peut être non cristallin à

température ambiante, par exemple la phosphatidylcholine de jaune d'œuf, la dioléoyl phosphatidylcholine ou la dilauryl phosphatidylcholine. De manière appropriée, le phospholipide est la dioléoylphosphatidylcholine (DOPC). Un autre aspect est une composition immunogène de l'invention comprenant 0,1 à 10 mg, 0,2 à 7, 0,3 à 5, 0,4 à 2, ou 0,5 à 1 mg (par exemple, 0,4 à 0,6, 0,9 à 1,1, 0,5 ou 1 mg) de phospholipide.

10 Les liposomes de la présente invention peuvent comprendre un stérol. Le stérol augmente la stabilité de la structure du liposome. De manière appropriée, les stérols comprennent le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol, l'ergostérol, l'ergocalciférol et le cholestérol. Ces 15 stérols sont décrits dans l'art, par exemple le cholestérol est décrit dans le Merck Index, 11ème Edn., page 341, en tant que stérol d'origine naturelle que l'on trouve dans les graisses animales. Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le stérol est le 20 cholestérol. Traditionnellement, le stérol peut être ajouté lors de la formulation de la préparation d'antigènes en utilisant du QS21 dilué dans le stérol, comme décrit dans le document WO 96/33 739. Dans un mode de réalisation, les compositions immunogènes de 25 l'invention comprennent 0,025 à 2,5, 0,05 à 1,5, 0,075 à 0,75, 0,1 à 0,3, ou 0,125 à 0,25 mg (par exemple, 0,2 à 0,3, 0,1 à 0,15, 0,25 ou 0,125 mg) d'un stérol.

Dans un mode de réalisation, l'adjuvant comprend (pour une dose de 0,5 ml) 0,1 à 10 mg, 0,2 à 7, 0,3 à 5, 30 0,4 à 2, ou 0,5 à 1 mg (par exemple, 0,4 à 0,6, 0,9 à 1,1, 0,5 ou 1 mg) d'un phospholipide (par exemple, la

DOPC), 0,025 à 2,5, 0,05 à 1,5, 0,075 à 0,75, 0,1 à 0,3, ou 0,125 à 0,25 mg (par exemple, 0,2 à 0,3, 0,1 à 0,15, 0,25 ou 0,125 mg) d'un stérol (par exemple, le cholestérol), 5 à 60, 10 à 50, ou 20 à 30 µg (par exemple, 5 à 15, 40 à 50, 10, 20, 30, 40 ou 50 µg) d'un lipide A monophosphorylé (par exemple, le 3D-MPL), et 5 à 60, 10 à 50, ou 20 à 30 µg (par exemple, 5 à 15, 40 à 50, 10, 20, 30, 40 ou 50 µg) d'une saponine (par exemple, le QS21).

10 Les liposomes de l'invention seront de manière appropriée contenus dans un milieu liquide. Le milieu liquide comprend les liquides physiologiquement acceptables, tels que l'eau, les solutions aqueuses de sel et les solutions tampons, par exemple une solution 15 physiologique tamponnée au phosphate (PBS) etc. Par exemple, les compositions immunogènes de l'invention peuvent comprendre de l'eau et du PBS.

20 Dans un aspect de l'invention, l'adjuvant est AS01B (voir, par exemple, le document WO 96/33 739). Dans un autre aspect de l'invention, l'adjuvant est AS01E (voir, par exemple, le document WO 2007/068 907).

25 Dans certains cas, il peut être avantageux que les compositions immunogènes et les vaccins de la présente invention contiennent en outre un agent de stabilisation, par exemple d'autres émulsifiants/ tensioactifs, comme l'acide caprylique (Merck index 10ème Edition, entrée no. 1739), parmi lesquels la tricapryline est particulièrement préférée.

30 Adjuvants de type émulsion huile-dans-eau

Il a été suggéré que les adjuvants de type émulsion huile-dans-eau étaient en tant que tels utiles comme compositions adjuvantes (document EP 0 399 843B). En outre, des combinaisons d'émulsions huile-dans-eau et 5 d'autres agents actifs ont été décrits en tant qu'adjuvants pour les vaccins (documents WO 95/17 210 ; WO 98/56 414 ; WO 99/12 565 ; WO 99/11 241). D'autres adjuvants de type émulsion huileuse ont été décrits, tels que des émulsions eau-dans-huile (documents 10 US 5 422 109 ; EP 0 480 982 B2) et des émulsions émulsion eau-dans-huile-dans-eau (documents US 5 424 067 ; EP 0 480 981 B). Tous forment des systèmes d'émulsion huileuse préférés (en particulier quand ils contiennent des tocols) qui sont appropriés 15 comme adjuvants pour une utilisation dans les compositions de la présente invention.

Une émulsion huileuse appropriée (par exemple, une émulsion huile-dans-eau) comprend une huile non toxique métabolisable, telle que le squalane, un tocophérol tel 20 que l'alpha-tocophérol, et facultativement un émulsifiant (ou un tensioactif) tel que le polysorbate 80 (Tween™ 80). Un stérol (par exemple, le cholestérol) peut être inclus. Dans un aspect de l'invention, il est proposé un vaccin ou une composition immunogène 25 comprenant un polysaccharide capsulaire dimensionné de *S. pneumoniae* de sérotype 6A et une composition d'adjuvant comprenant une émulsion huile-dans-eau, dans laquelle l'émulsion huile-dans-eau comprend 0,5 à 11 mg d'une huile métabolisable (comme le squalène), 0,5 à 30 12 mg d'un tocol (comme l'alpha-tocophérol) et 0,4 à

5 mg d'un agent émulsifiant (comme le monooléate de sorbitane polyoxyéthyléné), par dose pour les humains.

Pour qu'une composition huile-dans-eau quelconque soit appropriée pour une administration humaine, la 5 phase huileuse du système d'émulsion doit comprendre une huile métabolisable. La signification du terme huile métabolisable est connue dans l'art. Métabolisable peut être défini comme « étant capable d'être transformé par le métabolisme » (Dorland's Illustrated Medical 10 Dictionary, W.B. Sanders Company, 25ème édition (1974)). L'huile peut être n'importe quelle huile végétale, huile de poisson, huile animale ou huile synthétique, qui est non toxique pour le receveur et qui est capable d'être transformée par le métabolisme. Les noix, les semences 15 et les graines sont des sources courantes d'huiles végétales. Les huiles synthétiques font également partie de la présente invention et peuvent comprendre les huiles disponibles dans le commerce, telles que NEOBEE®, et d'autres. Une huile métabolisable particulièrement 20 appropriée est le squalène. Le squalène (2,6,10,15,19,23-hexaméthyl-2,6,10,14,18,22-tétracosahexaène) est une huile insaturée que l'on trouve en grande quantité dans l'huile de foie de requins, et en moindre quantité dans l'huile d'olive, l'huile de 25 germe de blé, l'huile de son de riz et les levures, et est une huile particulièrement préférée pour une utilisation dans la présente invention. Le squalène est une huile métabolisable, c'est-à-dire que c'est un intermédiaire dans la biosynthèse du cholestérol (Merck 30 index, 10ème Edition, entrée no. 8619). De manière appropriée, l'huile métabolisable est présente dans la

composition d'adjuvant en une quantité de 0,5 à 10 mg, par exemple de 1 à 10, 2 à 10, 3 à 9, 4 à 8, 5 à 7, ou 5 à 6 mg (par exemple, de 2 à 3, 5 à 6, ou 9 à 10 mg).

L'émulsion huile-dans-eau comprend de manière appropriée un tocol. Les tocols sont connus dans l'art et sont décrits dans le document EP 0 382 271. De manière appropriée, le tocol est l'alpha-tocophérol ou un dérivé de celui-ci, tel que le succinate d'alpha-tocophérol (également connu sous le nom de succinate de vitamine E). Ledit tocol est présent de manière appropriée dans la composition d'adjuvant en une quantité de 0,5 à 11 mg, par exemple de 1 à 11, 2 à 10, 3 à 9, 4 à 8, 5 à 7, 5 à 6 (par exemple, de 10 à 11, 5 à 6, 2,5 à 3,5 ou 1 à 3 mg). Dans un mode de réalisation spécifique, le tocol est présent en une quantité de 5,94 mg ou de 2,38 mg. Dans un autre mode de réalisation, ledit tocol est présent de manière appropriée dans la composition de vaccin (ou immunogène) en une quantité de 0,5 à 11 mg, par exemple de 1 à 11, 2 à 10, 3 à 9, 4 à 8, 5 à 7, 5 à 6 (par exemple, de 10 à 11, 5 à 6, 2,5 à 3,5 ou 1 à 3 mg).

L'émulsion huile-dans-eau peut comprendre en outre un agent émulsifiant. L'agent émulsifiant peut être de manière appropriée le monooléate de sorbitane polyoxyéthyléné. Dans un mode de réalisation particulier, l'agent émulsifiant peut être choisi dans le groupe comprenant : le polysorbate 80 (Tween™ 80). Ledit agent émulsifiant est présent de manière appropriée dans la composition d'adjuvant en une quantité de 0,1 à 5, 0,2 à 5, 0,3 à 4, 0,4 à 3 ou 2 à 3 mg (par exemple, de 0,4 à 1,2, 2 à 3 ou 4 à 5 mg) d'agent émulsifiant.

Le procédé de production des émulsions huile-dans-eau est connu de l'homme du métier. Classiquement, le procédé comprend le mélange de la phase huileuse contenant le tocol avec un tensioactif, tel qu'une 5 solution de PBS/Tween™80, puis une homogénéisation au moyen d'un homogénéisateur. Un procédé comprenant le passage du mélange deux fois à travers une aiguille de seringue pourrait être approprié pour homogénéiser un petit volume de liquide. De même, le procédé 10 d'émulsification dans un microfluidiseur (machine M110S Microfluidics, maximum de 50 passages, pendant une période de 2 minutes à une pression d'entrée maximale de 6 bar (pression de sortie d'environ 850 bar) pourrait être adapté par l'homme du métier pour produire des 15 volumes plus petits ou plus grands d'émulsion.

Dans une émulsion huile-dans-eau, l'huile et l'émulsifiant doivent être dans un support aqueux. Par exemple, le support aqueux peut être une solution physiologique tamponnée au phosphate.

20 Dans un mode de réalisation, les systèmes d'émulsion huile-dans-eau de la présente invention présentent une petite taille de gouttelette d'huile dans la plage sous-micronique. De manière appropriée, les tailles des gouttelettes seront dans la plage allant de 25 120 à 750 nm, ou de 120 à 600 nm de diamètre. Dans un mode de réalisation, l'émulsion huile-dans-eau contient des gouttelettes d'huile parmi lesquelles au moins 70 % par intensité ont un diamètre inférieur à 500 nm, ou au moins 80 % par intensité ont un diamètre inférieur à 30 300 nm, ou au moins 90 % par intensité ont un diamètre situé dans la plage allant de 120 à 200 nm.

La taille des gouttelettes d'huile, c'est-à-dire le diamètre, selon la présente invention est donnée par intensité. Il existe plusieurs manières de déterminer le diamètre de la taille des gouttelettes d'huile par 5 intensité. L'intensité est mesurée au moyen d'un instrument de dimensionnement, de manière appropriée par diffusion dynamique de la lumière, comme le Malvern Zetasizer 4000, ou de manière appropriée le Malvern Zetasizer 3000HS. Une première possibilité consiste à 10 déterminer le diamètre moyen  $z$  (ZAD) par diffusion dynamique de la lumière (PCS, spectroscopie de corrélation photonique) ; ce procédé donne en plus l'indice de polydispersité (PDI), et le ZAD et le PDI sont calculés tous les deux avec l'algorithme des 15 cumulants. Ces valeurs ne nécessitent pas de connaître l'indice de réfraction des particules. Un second moyen consiste à calculer le diamètre de la gouttelette d'huile en déterminant la répartition granulométrique totale grâce à un autre algorithme, soit le Contin, ou moindres 20 carrés non négatifs (NNLS), soit l'algorithme « Malvern » automatique (l'algorithme par défaut fourni par l'instrument de dimensionnement). La plupart du temps, comme l'indice de réfraction des particules d'une composition complexe est inconnu, seule la répartition 25 des intensités est prise en compte, et si nécessaire les moyens d'intensité provenant de cette répartition.

Les dérivés ou mutations de lipopolysaccharide (LPS) ou de lipooligosaccharide (LOS) ou les dérivés de lipide A décrits dans le présent document sont conçus pour être 30 moins toxiques (par exemple, le 3D-MPL) que les lipopolysaccharides natifs.

Dans un mode de réalisation, l'adjuvant utilisé pour la composition de l'invention comprend une émulsion huile-dans-eau préparée à partir d'une huile métabolisable (comme le squalène), un émulsifiant (tel que le Tween™ 80) et facultativement un tocol (tel que l'alpha-tocophérol). Dans un mode de réalisation, l'adjuvant comprend (pour une dose de 0,5 ml) 0,5 à 15, 5 1 à 13, 2 à 11, 4 à 8, ou 5 à 6 mg (par exemple, 2 à 3, 10 5 à 6, ou 10 à 11 mg), une huile métabolisable (comme le squalène), 0,1 à 10, 0,3 à 8, 0,6 à 6, 0,9 à 5, 1 à 4, ou 2 à 3 mg (par exemple, 0,9 à 1,1, 2 à 3 ou 4 à 5 mg), 15 un émulsifiant (comme le Tween™ 80) et facultativement 0,5 à 20, 1 à 15, 2 à 12, 4 à 10, 5 à 7 mg (par exemple, 11 à 13, 5 à 6, ou 2 à 3 mg) d'un tocol (comme l'alpha-tocophérol).

L'adjuvant peut comprendre en outre facultativement 5 à 60, 10 à 50, ou 20 à 30 µg (par exemple, 5 à 15, 40 à 50, 10, 20, 30, 40 ou 50 µg) d'un dérivé de lipide A (par exemple, le 3D-MPL).

20 L'adjuvant peut contenir facultativement 0,025 à 2,5, 0,05 à 1,5, 0,075 à 0,75, 0,1 à 0,3, ou 0,125 à 0,25 mg (par exemple, 0,2 à 0,3, 0,1 à 0,15, 0,25 ou 0,125 mg) d'un stérol (par exemple, le cholestérol), 5 à 60, 10 à 50, ou 20 à 30 µg (par exemple, 5 à 15, 40 à 25 50, 10, 20, 30, 40 ou 50 µg) d'un dérivé de lipide A (par exemple, le 3D-MPL), et 5 à 60, 10 à 50, ou 20 à 30 µg (par exemple, 5 à 15, 40 à 50, 10, 20, 30, 40 ou 50 µg) d'une saponine (par exemple, le QS21).

30 Dans un mode de réalisation, l'adjuvant utilisé pour la composition de l'invention comprend du phosphate d'aluminium et un dérivé de lipide A (comme le 3D-MPL).

Cet adjuvant peut comprendre (pour une dose de 0,5 ml) 100 à 750, 200 à 500, ou 300 à 400 µg d'Al sous forme de phosphate d'aluminium, et 5 à 60, 10 à 50, ou 20 à 30 µg (par exemple, 5 à 15, 40 à 50, 10, 20, 30, 40 ou 50 µg) 5 d'un dérivé de lipide A (par exemple, le 3D-MPL).

#### Procédé d'administration

Les préparations vaccinales contenant les compositions immunogéniques de la présente invention 10 peuvent être utilisées pour protéger ou traiter un mammifère sensible à une infection, en administrant l'édit vaccin par voie systémique ou muqueuse. Ces administrations peuvent inclure une injection par voie intramusculaire (IM), intrapéritonéale (IP), 15 intradermique (ID) ou sous-cutanée (SC) ; ou par administration par les muqueuses dans les tractus buccal/alimentaire, respiratoire, génito-urinaire. Bien que le vaccin de l'invention puisse être administré en monodose, ses composants peuvent également être co- 20 administrés ensemble, en même temps ou à des moments différents (par exemple, les conjugués de saccharide pneumococcique peuvent être administrés séparément, en même temps ou 1 à 2 semaines après l'administration d'un quelconque composant protéique bactérien du vaccin pour 25 une coordination optimale des réponses immunitaires les unes par rapport aux autres). Pour une co-administration, l'adjuvant Th1 facultatif peut être présent dans l'une quelconque ou toutes les différentes administrations. En plus d'une seule voie d'administration, 2 voies 30 d'administration différentes peuvent être utilisées. Par exemple, les conjugués de polysaccharide peuvent être

administrés IM (ou ID) et les protéines bactériennes peuvent être administrées IN (ou ID). De plus, les vaccins de l'invention peuvent être administrés IM pour les doses de primovaccination et IN pour les doses de 5 rappel.

Après une vaccination initiale, les sujets peuvent recevoir une ou plusieurs immunisations de rappel espacées de manière appropriée.

10 Vaccin

La présente invention propose en outre un vaccin contenant les compositions immunogènes de l'invention et un excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

Les excipients et supports pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et peuvent être choisis par l'homme du métier. Par exemple, l'excipient ou le support pharmaceutiquement acceptable peut comprendre un tampon, comme le Tris (triméthamine), un phosphate (par exemple, le phosphate de sodium), un acétate, un borate (par exemple, le borate de sodium), un citrate, la glycine, l'histidine et un succinate (par exemple, le succinate de sodium), de manière appropriée le chlorure de sodium, l'histidine, le phosphate de sodium ou le succinate de sodium. L'excipient pharmaceutiquement acceptable peut comprendre un sel, par exemple le chlorure de sodium, le chlorure de potassium ou le chlorure de magnésium. Facultativement, l'excipient pharmaceutiquement acceptable contient au moins un composant qui stabilise la solubilité et/ou la stabilité. Des exemples d'agents 15 de solubilisation/ stabilisation comprennent les détergents, par exemple la laurel sarcosine et/ou un 20 25 30

tween (par exemple, le Tween 80). Des exemples d'agents de stabilisation comprennent également les poloxamères (par exemple, le poloxamère 124, le poloxamère 188, le poloxamère 237, le poloxamère 338 et le poloxamère 407).

5 L'excipient pharmaceutiquement acceptable peut comprendre un tensioactif non ionique, par exemple les esters de sorbitane d'acide gras polyoxyéthylénés, le polysorbate-80 (Tween 80), le polysorbate-60 (Tween 60), le polysorbate-40 (Tween 40) et le polysorbate-20 (Tween 10 20), ou les alkyléthers polyoxyéthylénés (de manière appropriée le polysorbate-80). D'autres agents de solubilisation/stabilisation comprennent l'arginine, les polyols vitrifiants (comme le saccharose, le tréhalose et équivalents). L'excipient pharmaceutique 15 peut être un conservateur, par exemple le phénol, le 2-phénoxyéthanol, or le thiomersal. D'autres excipients pharmaceutiquement acceptables comprennent des sucres (par exemple, le lactose, le saccharose), et des protéines (par exemple, la gélatine et l'albumine). Les 20 supports pharmaceutiquement acceptables comprennent l'eau, les solutions salées, le dextrose aqueux et les solutions de glycérol. De nombreux excipients et supports pharmaceutiquement acceptables sont connus dans l'art et sont décrits, par exemple, dans Remington's 25 Pharmaceutical Sciences, par E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5ème Edition (975).

Selon un autre aspect de l'invention, il est proposé un procédé de préparation de la composition immunogène ou du vaccin de l'invention, comprenant l'étape de 30 mélange du polysaccharide capsulaire de *S. pneumoniae*

(conjugués) de l'invention, facultativement avec un excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

Des préparations vaccinales sont décrites d'une manière générale dans Vaccine Design (« The subunit et 5 adjuvant approach » (éds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). L'encapsulation au sein de liposomes est décrite par Fullerton, brevet US 4 235 877.

Les vaccins de la présente invention peuvent être stockés en solution ou lyophilisés. Dans un mode de 10 réalisation, la solution est lyophilisée en présence d'un sucre, tel que le saccharose ou le lactose. De manière davantage préférée, elles sont lyophilisées et reconstituées extemporanément avant d'être utilisées. La lyophilisation peut donner une composition (vaccin) plus 15 stable et peut éventuellement entraîner une augmentation des titres en anticorps en présence de 3D-MPL et en l'absence d'un adjuvant à base d'aluminium.

Dans un aspect de l'invention, il est proposé une 20 trousse de vaccin, comprenant une fiole contenant une composition immunogène de l'invention, facultativement sous forme lyophilisée, et comprenant en outre une fiole contenant un adjuvant tel que décrit dans le présent document. Il est envisagé que dans cet aspect de l'invention, l'adjuvant soit utilisé pour reconstituer 25 la composition immunogène lyophilisée.

Bien que les vaccins de la présente invention puissent être administrés par n'importe quelle voie, l'administration des vaccins décrits dans la peau (ID) forme un mode de réalisation de la présente invention. 30 La peau humaine comprend une cuticule « cornée » externe, appelée la couche cornée, qui recouvre l'épiderme. Sous

cet épiderme se trouve une couche appelée le derme, qui à son tour recouvre le tissu sous-cutané. Les chercheurs ont montré que l'injection d'un vaccin dans la peau, et en particulier dans le derme, stimule une réponse immunitaire, ce qui peut également être associé à un certain nombre d'avantages supplémentaires. Une vaccination intradermique avec les vaccins décrits dans le présent document forme une caractéristique préférée de la présente invention.

10 La technique classique d'injection intradermique, la « procédure de Mantoux », comprend les étapes consistant à nettoyer la peau, et ensuite à l'étirer avec une main, et avec le biseau d'une aiguille de calibrer étroit (calibre de 25 à 31) orienté vers le haut, l'aiguille est insérée à un angle de 10 à 15°. Dès que le biseau de l'aiguille est inséré, le cylindre de l'aiguille est abaissé et davantage avancé, tout en exerçant une légère pression pour l'élever sous la peau. Le liquide est ensuite injecté très lentement pour ainsi former une cloque ou une bosse sur la surface de la peau, puis l'aiguille est retirée lentement.

Plus récemment, des dispositifs spécialement conçus pour administrer des agents liquides dans ou travers la peau ont été décrits, par exemple les dispositifs décrits 25 dans les documents WO 99/34 850 et EP 1 092 444, également les dispositifs d'injection par jet décrits, par exemple, dans les documents WO 01/13 977 ; US 5 480 381, US 5 599 302, US 5 334 144, US 5 993 412, US 5 649 912, US 5 569 189, US 5 704 911, US 5 383 851, 30 US 5 893 397, US 5 466 220, US 5 339 163, US 5 312 335, US 5 503 627, US 5 064 413, US 5 520 639, US 4 596 556,

US 4 790 824, US 4 941 880, US 4 940 460, WO 97/37 705 et WO 97/13 537. D'autres procédés d'administration intradermique des préparations vaccinales peuvent comprendre les seringues et aiguilles classiques, ou des dispositifs conçus pour une administration balistique de vaccins solides (document WO 99/27 961), ou des timbres transdermiques (documents WO 97/48 440 ; WO 98/28 037) ; ou appliqués sur la surface de la peau (délivrance transdermique ou transcutanée, documents WO 98/20 734 ; 10 WO 98/28 037).

Quand les vaccins de la présente invention doivent être administrés par la peau, ou plus précisément dans le derme, le vaccin est dans un faible volume de liquide, en particulier un volume entre environ 0,05 ml et 0,2 ml.

15 La teneur de la composition immunogène dans les vaccins cutanés ou intradermiques de la présente invention peut être similaire aux doses classiques que l'on trouve dans les vaccins intramusculaires (voir ci-dessus). Cependant, une des caractéristiques des vaccins 20 cutanés ou intradermiques est que les formulations peuvent être à « faible dose ». Par conséquent, les antigènes protéiques dans les vaccins à « faible dose » sont présents de manière appropriée en une petite quantité de 0,1 à 10 µg, ou de 0,1 à 5 µg par dose ; et 25 les antigènes polysaccharidiques (conjugués de manière appropriée) peuvent être présents dans la plage allant de 0,01 à 1 µg, et de manière appropriée entre 0,01 et 0,5 µg de saccharide par dose.

Tel qu'utilisé dans le présent document, le terme 30 « délivrance intradermique » signifie délivrance du vaccin ou de la composition immunogène dans la région du

derme de la peau. Cependant, le vaccin ou la composition immunogène ne sera pas nécessairement situé exclusivement dans le derme. Le derme est la couche de la peau située entre environ 1,0 et environ 2,0 mm par rapport à la surface de la peau humaine, mais il existe une certaine quantité de variation d'un individu à l'autre et d'une partie du corps à l'autre. En général, on peut s'attendre à atteindre le derme en allant 1,5 mm sous la surface de la peau. Le derme se trouve entre la couche cornée et l'épiderme à la surface et la couche sous-cutanée en-dessous. Selon le mode d'administration, le vaccin ou la composition immunogène peut rester finalement uniquement ou principalement dans le derme, ou il/elle peut finalement se diffuser dans l'épiderme et le derme.

La présente invention propose en outre un vaccin amélioré pour prévenir ou améliorer l'otite moyenne provoquée par *Haemophilus influenzae* par l'ajout de protéines d'*Haemophilus influenzae*, par exemple la protéine D sous forme conjuguée. Un ou plusieurs antigènes protéiques de *Moraxella catarrhalis* peuvent également être inclus dans le vaccin ou la composition immunogène de l'invention, sous une forme libre ou conjuguée. Par conséquent, la présente invention est un procédé amélioré permettant de déclencher une réponse immunitaire dirigée contre l'otite moyenne chez le nourrisson.

Des exemples d'antigènes protéiques préférés de *Moraxella catarrhalis* pouvant être inclus dans un vaccin combiné ou une composition immunogène de l'invention (en particulier pour la prévention de l'otite moyenne) sont :

la protéine 106 de membrane externe (OMP106) [WO 97/41 731 (Antex) & WO 96/34 960 (PMC)] ; la protéine 21 de membrane externe (OMP21) ou ses fragments (WO 0 018 910) ; la protéine A se liant à la lactoferrine 5 (LbpA) et/ou la protéine B se liant à la lactoferrine (LbpB) [WO 98/55 606 (PMC)] ; la protéine A se liant à la transferrine (TbpA) et/ou la protéine B se liant à la transferrine (TbpB) [WO 97/13 785 et WO 97/32 980 (PMC)] ; la protéine CopB de *Moraxella catarrhalis* 10 [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61 : 2003-2010] ; la protéine A1 ubiquitaire de surface (UspA1) et/ou la protéine A2 ubiquitaire de surface (UspA2) [WO 93/03 761 (University of Texas)] ; la protéine CD de membrane externe (OmpCD) ; HasR (PCT/EP 99/03 824) ; 15 PilQ (PCT/EP 99/03 823) ; la protéine 85 de membrane externe (OMP85) (PCT/EP 00/01 468) ; lipo06 (GB 9 917 977.2) ; lipo10 (GB 9 918 208.1) ; lipo11 (GB 9 918 302.2) ; lipo18 (GB 9 918 038.2) ; la protéine P6 20 de membrane externe (P6) (PCT/EP 99/03 038) ; l'antigène D15 de surface (D15) (PCT/EP 99/03 822) ; la protéine A1 de membrane externe (OmpA1) (PCT/EP 99/06 781) ; Hly3 (PCT/EP 99/03 257) ; et la protéine E de membrane externe (OmpE). Des exemples de 25 protéines non typables de *Haemophilus influenzae* ou des fragments de celles-ci pouvant être inclus dans un vaccin combiné (en particulier pour la prévention de l'otite moyenne) comprennent : la protéine fimbrine [(US 5 766 608 - Ohio State Research Foundation)] et les fusions comprenant des peptides en provenant [par exemple, les fusions du peptide LB1(f) ; US 5 843 464 30 (OSU) ou WO 99/64 067] ; la protéine 26 de membrane

externe (OMP26) [WO 97/01 638 (Cortecs) ] ; P6  
[EP 281 673 (State University of New York) ] ; TbpA et/ou  
TbpB ; l'adhésine de *H. influenzae* (Hia) ; les fibrilles  
de surface de *Haemophilus* (Hsf) ; la protéine Hin47 de  
5 *Haemophilus influenzae* ; la protéine Hif de *Haemophilus*  
*influenzae* ; la protéine Hmw1 de *Haemophilus influenzae* ;  
la protéine Hmw2 de *Haemophilus influenzae* ; la protéine  
Hmw3 de *Haemophilus influenzae* ; la protéine Hmw4 de  
*Haemophilus influenzae* ; l'adhésine d'autotransporteur  
10 (Hap) de *Haemophilus influenzae* ; D15 (WO 94/12 641) ;  
P2 ; et P5 (WO 94/26 304).

Procédé de traitement et d'utilisation

La présente invention propose un procédé de  
15 traitement ou de prévention d'une infection par  
*Streptococcus pneumoniae* chez un sujet en ayant besoin,  
comprenant l'administration audit sujet d'une quantité  
thérapeutiquement efficace d'une composition immunogène  
ou du vaccin de l'invention. La présente invention  
20 propose également un procédé d'immunisation d'un hôte  
humain contre une infection par *Streptococcus pneumoniae*,  
comprenant l'administration à l'hôte d'une dose  
immunoprotectrice de la composition immunogène ou du  
vaccin de l'invention. La présente invention propose  
25 également un procédé d'induction d'une réponse  
immunitaire dirigée contre *Streptococcus pneumoniae* (par  
exemple, *Streptococcus pneumoniae* sérotype 6A) chez un  
sujet, le procédé comprenant l'administration d'une  
quantité thérapeutiquement efficace de la composition  
30 immunogène ou du vaccin de l'invention.

Dans un mode de réalisation, la présente invention est un procédé amélioré permettant de déclencher une réponse immunitaire chez les nourrissons (définis comme ayant 0 à 2 ans dans le contexte de la présente invention) 5 par l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une composition immunogène ou d'un vaccin de l'invention. Dans un mode de réalisation, la réponse immunitaire est protectrice (c'est-à-dire qu'elle peut prévenir ou réduire une infection provoquée par 10 *S. pneumoniae*). Dans un mode de réalisation, le vaccin est un vaccin pédiatrique

Dans un mode de réalisation, la présente invention est un procédé amélioré permettant de déclencher une réponse immunitaire (protectrice) chez les personnes 15 âgées (dans le contexte de la présente invention, un patient est considéré âgé s'il a 50 ans ou plus, généralement plus de 55 ans, et plus généralement plus de 60 ans) par l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace de la composition immunogène 20 ou du vaccin de l'invention.

Dans un mode de réalisation, la présente invention propose un procédé de protection d'un sujet contre une maladie provoquée par une infection par *Streptococcus pneumoniae*, ou un procédé de prévention d'une infection 25 par *Streptococcus pneumoniae*, ou un procédé de réduction de la gravité ou de retardement du début d'au moins un symptôme associé à une infection provoquée par *Streptococcus pneumoniae*, les procédés comprenant l'administration à un sujet d'une quantité immunogène 30 d'une composition immunogène ou d'un vaccin de l'invention.

Dans un mode de réalisation, la présente invention propose des compositions immunogènes et des vaccins de l'invention pour une utilisation dans la prévention ou le traitement d'une maladie provoquée par une infection 5 par *S. pneumoniae*. Dans un mode de réalisation, la présente invention propose l'utilisation d'une composition immunogène ou d'un vaccin de l'invention dans la fabrication d'un médicament pour la prévention (ou le traitement) d'une maladie provoquée par une 10 infection par *S. pneumoniae*.

La maladie provoquée par une infection par *S. pneumoniae* peut être choisie parmi la pneumonie, une maladie pneumococcique invasive (IPD), les exacerbations d'une bronchopneumopathie obstructive chronique (BPOC), 15 l'otite moyenne, la méningite, la bactériémie, la pneumonie et/ou la conjonctivite. Quand l'hôte humain est un nourrisson, la maladie peut être choisie parmi l'otite moyenne, la méningite, la bactériémie, la pneumonie et/ou la conjonctivite. Quand l'hôte humain 20 est une personne âgée, la maladie peut être choisie parmi la pneumonie, une maladie pneumococcique invasive (IPD) et/ou les exacerbations d'une bronchopneumopathie obstructive chronique (BPOC).

Les modes de réalisation concernant ici « les 25 compositions vaccinales » de l'invention sont également applicables aux modes de réalisation concernant les « compositions immunogènes » de l'invention, et vice versa.

Des modes de réalisation de l'invention sont en 30 autre décrits dans les paragraphes numérotés suivants.

Paragraphe 1 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne ( $M_w$ ) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 5 est située entre 180 et 400, 210 et 400, 210 et 370, 220 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa.

Paragraphe 2 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 10 selon le paragraphe 1, qui a été dimensionné par une technique de dimensionnement mécanique.

Paragraphe 3 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 15 selon le paragraphe 1 ou le paragraphe 2, conjugué à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197).

Paragraphe 4 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 20 selon le paragraphe 3, dans lequel le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué directement à la protéine porteuse.

Paragraphe 5 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 25 selon l'un quelconque des paragraphes 3 à 4, dans lequel le polysaccharide 6A est conjugué à la protéine porteuse ou à un lieu en utilisant la chimie au CDAP.

Paragraphe 6 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 30 selon l'un quelconque des paragraphes 3 à 5, dans lequel le polysaccharide capsulaire de sérotype 6A (PS6A) est conjugué à la protéine porteuse ou à un lieu en

utilisant la chimie au CDAP avec un rapport CDAP/PS6A situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, ou de 1/1.

Paragraphe 7 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 5 selon l'un quelconque des paragraphes 3 à 6, dans lequel le polysaccharide capsulaire de sérotype 6A est conjugué à la protéine porteuse ou au lieu en utilisant la chimie au CDAP, dans laquelle la réaction a été réalisée avec un temps de couplage situé entre 50 et 130 minutes, 60 10 et 130 minutes ou 110 et 130 minutes.

Paragraphe 8 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'un quelconque des paragraphes 3 à 7, dans lequel le rapport protéine porteuse sur polysaccharide 15 capsulaire de sérotype 6A est situé entre 5/1 et 1/5, 4/1 et 1/1 ou 2/1 et 1/1, 1,5/1 et 1/1, 1,4/1 et 1,3/1 (par exemple, 1,2/1, 1,5/1) (en poids/poids).

Paragraphe 9 : un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A 20 selon les paragraphes 1 à 8, dans lequel le polysaccharide capsulaire 6A est dimensionné d'un facteur d'au plus x5.

Paragraphe 10 : un procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A comprenant la conjugaison d'un 25 polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse ou à un lieu en utilisant la chimie au CDAP avec un rapport CDAP/PS situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, ou de 1/1.

30 Paragraphe 11 : un procédé selon le paragraphe 10, dans lequel la réaction a été réalisée avec un temps de

couplage situé entre 50 et 130 minutes, 60 et 130 minutes ou 110 et 130 minutes.

Paragraphe 12 : un procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A comprenant (a) la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse et (b) une diafiltration contre une solution présentant une concentration en NaCl inférieure à 150 mM.

Paragraphe 13 : une composition immunogène comprenant un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon les paragraphes 1 à 9 ou un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A obtenu par un procédé selon l'un quelconque des paragraphes 10 à 12 conjugué à une protéine porteuse.

Paragraphe 14 : une composition immunogène selon le paragraphe 13, comprenant 10 ou plus de 10, 11 ou plus de 11, 12 ou plus de 12, 13 ou plus de 13, 14 ou plus de 14, 15 ou plus de 15, ou 16 ou plus de 16 conjugués de polysaccharide capsulaire provenant de différents sérotypes de *S. pneumoniae*.

Paragraphe 15 : une composition immunogène selon le paragraphe 13 ou le paragraphe 14, comprenant 1 ou plus de 1 conjugué de polysaccharide capsulaire natif provenant de *S. pneumoniae*.

Paragraphe 16 : une composition immunogène selon le paragraphe 15, comprenant un polysaccharide capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B.

Paragraphe 17 : une composition immunogène selon le paragraphe 15 ou 16, comprenant un polysaccharide

capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 23F.

Paragraphe 18 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 17, qui comprend un 5 polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 500 et 1800, 900 et 1660 ou 1000 et 1400 kDa.

Paragraphe 19 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 18, qui comprend un 10 polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 23F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 500 et 1500, 600 et 1500, 700 et 1300, 900 et 1250, 800 et 1100 ou 900 et 1000 kDa.

Paragraphe 20 : une composition immunogène selon 15 l'un quelconque des paragraphes 13 à 19, qui comprend un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* :  
(a) de sérotype 1 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 200 et 800, 250 et 600, ou 300 et 400 kDa ; (b) de sérotype 4 présentant une taille 20 moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 500, 60 et 300, 70 et 150, ou 75 et 125 kDa ; (c) de sérotype 5 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 100 et 700, 100 et 350, ou 150 et 300 kDa ; (d) de sérotype 7F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 25 1000, 100 et 750, 150 et 500, ou 200 et 300 kDa ; (e) de sérotype 9V présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 500, 200 et 400, ou 250 et 300 kDa ; (f) de sérotype 14 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 30 500, ou 200 et 250 kDa ; (g) de 18C présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 50 et 750, 50 et

500, 50 et 190, 50 et 150 ou 80 et 110 kDa (h) de sérotype 19F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 100 et 500, 100 et 190 ou 120 et 180 kDa ; et/ou (i) de sérotype 19A présentant une 5 taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 800 kDa, 110 et 700, 110 et 300, 120 et 200, 130 et 180, 140 et 160 ou 80 et 130 kDa.

10 Paragraphe 21 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 20, qui comprend en outre un sérotype 22F capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 800 kDa, 110 et 700 kDa, 110 et 300, 120 et 200, 130 et 180, 150 et 170, 100 et 190, 100 et 150, 95 et 125 ou 100 et 115 kDa.

15 Paragraphe 22 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 21, comprenant 2, 3, 4, 5 ou 6 protéines porteuses différentes.

20 Paragraphe 23 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 22, dans laquelle une ou plusieurs ou toutes les protéines porteuses sont choisies dans le groupe constitué par : l'anatoxine diphtérique (DT), CRM197, l'anatoxine tétnique (TT), le fragment C de TT, dPly, PhtA, PhtB, PhtD, PhtE, PhtDE OmpC, PorB et la protéine D de *Haemophilus influenzae*.

25 Paragraphe 24 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 23, dans laquelle le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B est conjugué à une protéine porteuse (par exemple, la protéine D) différente de la protéine 30 porteuse à laquelle le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué.

Paragraphe 25 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 24, comprenant un saccharide de sérotype 1 conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 4 conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 5 conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 6B conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 7F conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 9V conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 14 conjugué à la protéine D et un saccharide de sérotype 23F conjugué à la protéine D.

Paragraphe 26 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 25, comprenant le sérotype 19F conjugué à l'anatoxine diphtérique.

Paragraphe 27 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 26, dans laquelle la composition comprend un saccharide capsulaire 18C conjugué à l'anatoxine tétanique (TT), facultativement dans laquelle 18C est le seul saccharide dans la composition conjugué à l'anatoxine tétanique (TT), facultativement par l'intermédiaire d'un lieu ADH.

Paragraphe 28 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 27, comprenant en outre un ou plusieurs saccharides capsulaires de *S. pneumoniae* d'un ou de plusieurs sérotypes choisis parmi le sérotype 33F, le sérotype 15 et le sérotype 12F, conjugués à une ou plusieurs protéines porteuses.

Paragraphe 29 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 28, dans laquelle la dose du conjugué de saccharides 6A est située entre 1 et 10 µg, 1 et 5 µg, ou 1 et 3 µg de saccharide (par exemple, 2 µg).

Paragraphe 30 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 29, qui comprend en outre une ou plusieurs protéines de *S. pneumoniae*, conjuguées ou non conjuguées, choisies parmi : la 5 famille des triades polyhistidine (PhtX), la famille des protéines se liant à la choline (CbpX), les CbpX tronquées, la famille des LytX, les LytX tronquées, les protéines chimères CbpX tronquée-LytX tronquée, la pneumolysine détoxifiée (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, 10 Sp130, Sp125 et Sp133.

Paragraphe 31 : une composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 30, qui comprend en outre un adjuvant.

Paragraphe 32 : une composition immunogène selon le 15 paragraphe 31, dans laquelle l'adjuvant comprend (pour une dose de 0,5 ml) 100 à 750, 200 à 500 ou 300 à 400 µg d'Al (aluminium) sous forme de phosphate d'aluminium.

Paragraphe 33 : un vaccin comprenant la composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 32 20 et un excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

Paragraphe 34 : un procédé de préparation du vaccin selon le paragraphe 33, qui comprend l'étape de mélange de la composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 32 avec un excipient ou support 25 pharmaceutiquement acceptable.

Paragraphe 35 : un procédé de traitement ou de prévention d'une infection par *Streptococcus pneumoniae* chez un sujet en ayant besoin, comprenant l'administration audit sujet d'une quantité 30 thérapeutiquement efficace d'une composition immunogène

selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 32 ou du vaccin selon le paragraphe 33.

Paragraphe 36 : un procédé d'immunisation d'un hôte humain contre une infection par *Streptococcus pneumoniae*, 5 comprenant l'administration à l'hôte d'une dose immunoprotectrice de la composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 32 ou du vaccin selon le paragraphe 34.

Paragraphe 37 : un procédé d'induction d'une 10 réponse immunitaire dirigée contre *Streptococcus pneumoniae* sérotype 6A chez un sujet, le procédé comprenant l'administration d'une quantité efficace sur le plan thérapeutique ou prophylactique de la composition immunogène selon l'un quelconque des 15 paragraphes 13 à 32 ou du vaccin selon le paragraphe 33.

Paragraphe 38 : la composition immunogène selon l'un quelconque des paragraphes 13 à 32 ou le vaccin selon le paragraphe 33, pour son utilisation dans le traitement ou la prévention d'une maladie provoquée par 20 une infection par *Streptococcus pneumoniae*.

Paragraphe 39 : une utilisation de la composition immunogène des paragraphes 12 à 32 ou du vaccin du paragraphe 33, dans la fabrication d'un médicament pour le traitement ou la prévention d'une maladie provoquée 25 par une infection par *Streptococcus pneumoniae*.

Toutes les références et demandes de brevet citées dans la présente demande de brevet sont incorporées à la présente à titre de référence.

Afin de mieux comprendre la présente invention, les 30 exemples suivants sont présentés. Ces exemples ont seulement un but illustratif, et ne doivent pas être

considérés comme une limite à la portée de l'invention d'une quelconque manière que ce soit.

### Exemples

5

#### Exemple 1 - préparation d'un polypeptide dimensionné

##### Dimensionnement

Un appareil homogénéisateur EMULSIFLEX C-50 a été 10 utilisé pour réduire le poids moléculaire et la viscosité du polysaccharide avant l'étape d'activation (microfluidisation). L'efficacité du dimensionnement dépend de la pression du circuit et du nombre total de cycle. La cellule d'homogénéisation de l'EMULSIFLEX C-50 15 a été remplacée par une cellule ayant une géométrie fixe (chambre d'interaction Microfluidics F20Y-75  $\mu\text{m}$  pour E01 à E07 ; chambre d'interaction Microfluidics F30Y-125  $\mu\text{m}$  pour E08). Le but du dimensionnement est de réduire le poids moléculaire et la viscosité du polysaccharide sans 20 diminution critique de son antigénicité.

La réduction en cours de procédé a été suivie par viscosimétrie (rhéomètre Brookfield Programmable DV III). Quand la viscosité cible a été atteinte, le polysaccharide dimensionné a été caractérisé par HP-SEC- 25 RI (chromatographie d'exclusion stérique à haute performance, indice de réfraction).

Les caractérisations en cours de procédé de  $M_w$  ont été réalisées par HP-SEC-RI (colonne TSK5000 PW<sub>XL</sub> + colonne de garde). L'élution a été réalisée en utilisant 30 50 mM Na/K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl pH 7,6 à un débit de 0,6 ml/minute. La détection a été réalisée par un

détecteur d'indice de réfraction. Cette caractérisation est basée sur la détermination d'un temps de rétention relatif (RRT). Le RRT est calculée par rapport à des dextrans étalonnés ayant un poids moléculaire dans la 5 plage linéaire de séparation d'une colonne TSK5000PW<sub>XL</sub>. Le RRT est défini par la formule suivante :

$$\text{RRT} = \frac{\text{RT}_{(\text{size PS})} - \text{RT}_{(\text{HMW dext})}}{\text{RT}_{(\text{LMW dext})} - \text{RT}_{(\text{HMW dext})}}$$

10             $\text{RT}_{(\text{size PS})}$  = temps de rétention d'un PS  
(polysaccharide) dimensionné

$\text{RT}_{(\text{HMW dext})}$  = temps de rétention d'un dextrane de poids moléculaire élevé (dextrane de 1730 Kda)

15             $\text{RT}_{(\text{LMW dext})}$  = temps de rétention d'un dextrane de poids moléculaire bas (dextrane de 150 Kda).

              Le polysaccharide natif de sérotype 6A a été dissous dans 15 mg/ml pendant 4 heures dans de la WFI (eau pour injection) à température ambiante. Après 4 heures de dilution, le pH de la solution a été ajustée à 20 6,5 +/- 0,5 avant son transfert dans une pièce froide pour poursuivre la dissolution pendant une nuit. Avant le dimensionnement, la solution du polysaccharide natif de sérotype 6A a été clarifiée sur un filtre de 5 µm.

25            Le polysaccharide de sérotype 6A a ensuite été dimensionné par un Emulsiflex doté d'une cellule d'homogénéisation Microfluidics F30Y-125 µm à une pression située entre 2900 et 3800. Le dimensionnement a été arrêté quand la viscosité du polysaccharide a 30 atteint la valeur cible pour la viscosité (8,35 ou 12,4).

Le nombre de cycles nécessaires dépendait de la cible. Par exemple, 32,5 cycles ont été nécessaires pour atteindre une viscosité de 12,4 cps en utilisant une pression de 2900 psi. Pour cet échantillon, la 5 détermination en cours de procédé du temps de rétention relatif par HP-SEC-RI a donné une valeur de 0,28.

Le polysaccharide 6A dimensionné a été filtré sur une membrane Millipak 20 (échelle de 5 g) (coupure à 0,22 µm) à un débit de 10 ml/minute.

10 La teneur en polysaccharide dans la solution de polysaccharide de sérotype 6A a été déterminée avec précision par un procédé colorimétrique (résorcinol) avant son utilisation dans une conjugaison. Le polysaccharide dimensionné a été caractérisé par HP-SEC-15 MALLS ou estimé au moyen d'une courbe d'étalonnage de dextrans et détermination de l'activité antigénique (tableau 1).

#### Antigénicité

20 Les échantillons à tester et de références ont été mis en incubation dans des microplaques de titrage préalablement revêtues avec des anticorps monoclonaux dirigés contre le polysaccharide de sérotype 6A (PS6A) de *S. pneumoniae*. Des anticorps polyclonaux anti-PS6A de 25 lapin ont ensuite été ajoutés. Les complexes antigène/anticorps ont été révélés en utilisant un anti-Ig de lapin de chèvre à peroxydase liée. Le développement de la couleur a ensuite été réalisé par le système orthophénylènediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réagissant avec peroxydase. La 30 coloration a été mesurée par spectrophotométrie (absorbances à 490 et 620 nm). La courbe du

polysaccharide a été comparée à la courbe de référence (un lot de polysaccharide natif utilisé comme référence, tandis qu'un autre lot de polysaccharide natif a été utilisé comme témoin interne) afin de déterminer la 5 concentration en polysaccharide.

Mesure du poids moléculaire et de la polydispersité par MALLS

Le poids moléculaire ( $M_w$ ) a été déterminé par 10 diffusion de lumière laser (SEC-MALLS). Dans un premier temps, les analyses ont été réalisées sur une TSK5000PW<sub>XL</sub> (+ colonne de garde) en utilisant une solution de NaCl 0,2 M + 0,02 % d'azoture comme tampon d'élution. Les analyses finales ont été réalisées sur une colonne 15 TSKGMPW<sub>XL</sub> (+ colonne de garde) avec un chargement de 100 µl de polysaccharide (1 mg/ml) en utilisant 50 mM Na/K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl pH 7,0 comme tampon d'élution et un débit de 0,75 ml/minute.

La détection a été réalisée avec un 20 spectrophotomètre laser et un réfractomètre interférométrique (Wyatt Otilab DSP équipé d'une cellule P100 et d'un filtre rouge à 498 nm).

Le poids moléculaire moyen en nombre ( $M_n$ ) a également été obtenu par MALLS. La polydispersité du 25 polysaccharide dimensionné a été obtenue sous la forme du rapport  $M_w/M_n$ .

Un  $dn/dc$  théorique de 0,14 a tout d'abord été utilisé. Quand il y a eu détermination, la valeur expérimentale de 0,151 a été utilisée.

30

20

5

5

10

5

103

Tableau 1 : Caractérisations du PSSA dimensionné

Lot de PSSA	Teneur en PS (µg/ml)	RRT <sup>1</sup> 150-1730 <sup>1</sup>	Viscosité (cp)	$M_w$ (kDa) <sup>2</sup>	MALLS			Antigénicité par ELISA (%)
					(estimation par rapport à la courbe d'étalonnage de dextrans)	$-M_w$ (kDa)	$-R_w$ (nm)	
E01	13 650	0,45	8,35	575	ND	ND	ND	124
E02	8570	0,50	6,03	514	ND	ND	ND	ND
E03	14 210	0,24	15,6	968	ND	ND	ND	ND
E04	12 000	0,21	17,3	1018				1203
E05	—	—	—	—	—	—	—	—
					T13M/-70 °C			
E06	13 910	0,24	12,1	916	256	25,6	1,124	1303
E07	14 700	0,24	12,2	929	307,4	28,1	1,112	1203

G7

10

G5

20

G2

30

E08	13 590	0,20	12,3	T12M/-70 °C	
				1004	1,094
				277	1443
				27,7	
					1,094

<sup>1</sup> RRT : temps de rétention relatif (HP-SEC-RI) = <sup>2</sup> HP-SEC-RI - <sup>3</sup> Valeur relative par rapport au polysaccharide natif correspondant. Remarque : aucune valeur MALLS disponible à T0 pour les lots E06 et E08. La valeur à T13M (temps = 13 minutes) ou T12M (temps = 12 minutes) n'a pas pu être considérée comme représentative dans la mesure où le temps de rétention relatif et la viscosité n'ont pas changé entre T0 (temps = 0 minute) et T13M ou T12M pour les deux échantillons. ND signifie « non déterminé ».

Exemple 2 : production de conjugués 6A avec différents supports

a) Polysaccharide natif de *S. pneumoniae* de sérotype 6A  
5 par rapport à polysaccharide dimensionné de  
*S. pneumoniae* de sérotype 6A

Les conditions d'activation et de couplage utilisées pour produire les différents conjugués 6A sont données dans le tableau 2.

10

15

20

25

30

30  
20  
15  
10  
5

106

BE2016/5782

Tableau 2 : Conditions spécifiques d'activation/couplage/désactivation de conjugués de polysaccharide de sérotype 6A de *S. pneumoniae*/protéine PhtD

Support	PD (lot PD003) (conjugué PS6A-PD)	PhtD (lot PhtD004) (conjugué PS6A- PhtD)	PhtD (lot PhtD008) (conjugué PS6A- PhtD)	PhtD (lot PhtD008) (conjugué PS6A- PhtD)	dPLY (lot dPLY010) (conjugué PS6A- dPLY)
Conc. en PS6A (mg/ml)	5,5 PS natif	5,5 PS natif	5,5 PS natif	10,0	10
Dissolution de PS6A	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M	NaCl 2 M
Concentration en protéine porteuse (mg/ml)	5,0	10,0	20,0	20,0	10,0
Rapport initial protéine porteuse/PS6A (en poids/poids)	1/1	3/1	3/1	3/1	3/1
Rapport CDAP/PS6A (mg/mg de PS)	0,75	1,5	1,5	1,5	1,5
Temps de couplage	60 minutes	45 minutes	150 minutes	180 minutes	
pH <sub>a</sub> /pH <sub>c</sub> /pH <sub>g</sub>	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0

Le rapport protéine/PS6A final (en poids/poids) pour les conjugués résultants était :

PS6A-PD003 : 0,6/1 (PS6A natif,  $M_w$  par MALLS de 1106 kDa)

5 PS6A-PhtD004 : 1,4/1 (PS6A natif,  $M_w$  par MALLS de 1106 kDa)

PS6A-PhtD008 : 2,7/1 (PS6A dimensionné, lot E01)

PS6A-dPly010 : 1,65/1 (PS6A dimensionné, lot E01)

10 10 b) Polysaccharide dimensionné conjugué à différents supports

Les conditions d'activation et de couplage utilisées pour produire les différents conjugués PS6A sont données dans le tableau 3.

15

Tableau 3 : Conditions spécifiques  
d'activation/couplage/désactivation de conjugués de  
PS6A-Protéine D/CRM197/PhtD

20	Support	PD (lot PDLS001 et lot PDLS002) (conjugué PS6A-PD)	CRM197 (lot CRM025) (conjugué PS6A-CRM197)
	Conc. en PS6A (mg/ml)	10,0	10,0
25	Dissolution de PS6A	NaCl 2 M	NaCl 2 M
	Concentration en protéine porteuse (mg/ml)	10,0	10,0
30	Rapport initial protéine porteuse/PS6A (en poids/poids)	1,5/1	1,5/1
	Conc. en CDAP (mg/mg de PS)	1,5	1

Temps de couplage	120 minutes	120 minutes
pH <sub>a</sub> /pH <sub>c</sub> /pH <sub>g</sub>	9,5/9,5/9,0	9,5/9,5/9,0

5 Le rapport protéine/PS6A final (en poids/poids) pour les conjugués résultants était :

PS6A-PD/LS001 et PS6A-PD/LS002 : 1,6/1 (PS6A dimensionné, lot E06)

PS6A-CRM197/025 : 1,3/1 (PS6A dimensionné, lot E03)

10 Conjugué PS6A<sub>AB</sub>-PhtD (lot 6A-PhtD106)

Dans un second procédé de conjugaison, PS6A a été lié à la protéine porteuse PhtD par l'intermédiaire d'un lieur - dihydrazide de l'acide adipique (ADH) ; ce conjugué a été nommé PS6A<sub>AB</sub>-PhtD.

15 Dérivaturation de PS6A

20 L'activation et le couplage ont été réalisés à 25 °C sous agitation continue dans un bain d'eau à température régulée. Le PS6A microfluidisé a été dilué pour obtenir une concentration finale en polysaccharide de 10 mg/ml dans de l'eau pour injection (WFI) et la solution a été ajustée à un pH de 6,0 ± 0,2 avec du HCl 0,1 N. Une solution de CDAP (100 mg/ml fraîchement préparée dans le mélange acetonitrile/WFI, 50/50) a été ajoutée pour atteindre le rapport CDAP/PS approprié (1/1, en poids/poids).

25 Le pH a été augmenté jusqu'au pH d'activation de 9,00 ± 0,05 par ajout de NaOH 0,2 M. Après 3 minutes, l'ADH a été ajouté pour atteindre le rapport ADH/PS approprié (8,9/1 en poids/poids) ; le pH a été ajusté au pH de couplage de 9,0. Le pH de la solution a été ajusté

pendant 1 heure. Le dérivé PS<sub>AAH</sub> a ensuite été dialysé contre du NaCl 0,2 M.

#### Couplage

5 De la PhtD à 7,5 mg/ml dans du NaCl 0,2 M a été ajoutée au dérivé PS6A<sub>AAH</sub> (PS6A avec le lieur ADH) afin d'atteindre un rapport PhtD/PS6A<sub>AAH</sub> de 3/1 (en poids/poids). Le pH a été ajusté à 5,0 ± 0,05 avec du HCl. La solution d'EDAC (50 mg/ml dans le Tris-HCl 0,1 M pH 7,5) a été ajoutée manuellement en 10 minutes (20 µl/minute) pour atteindre 0,5 mg d'EDAC/mg de PS6A<sub>AAH</sub>. La solution résultante a été mise en incubation pendant 45 minutes à température ambiante et sous agitation, tout en ajustant le pH. La solution a été neutralisée 10 par ajout de 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,5 et laissée 30 minutes à température ambiante.

15 Avant l'élution sur Sephacryl S400HR, le conjugué a été clarifié en utilisant un filtre 5 µm Minisart. Le conjugué résultant PS6A<sub>AAH</sub>-PhtD106 présentait un rapport final PhtD/PS6A de 2,84 (en poids/poids).

20 Un temps de rétention relatif cible a été choisi (RRT 150-1730 d'environ 0,50). Plusieurs conjugués (6A-PhtD004 (polysaccharide natif) et 6A-PhtD008 (polysaccharide dimensionné) (comme décrit ci-dessus) 25 ont été produits avec un polysaccharide dimensionné et ont été comparé au conjugué produit avec le PS6A natif.

#### Exemple 3 : évaluation préclinique des réponses anti-PS6A

30 Des groupes de 40 souris ont été immunisés IM au jour 0, 14 et 28 avec des formulations 14-valent (14V)

contenant des conjugués PS6A (à 1/10 de la dose pour les humains) en utilisant de l'AlPO<sub>4</sub> comme adjuvant. Les titres ELISA en IgG anti-PS6A et les titres d'opsonophagocyte (OP) ont été mesurés dans les sérum  
5 individuels collectés au jour 42.

La formulation 14V contenait les conjugués suivants :

1-PD, 3-PD, 4-PD, 5-PD, 6B-PD, 7F-PD, 9V-PD, 14-PD,  
18C-TT<sub>AH</sub>, 19A-dPly, 19F-DT, 22F-PhtD, 23F-PD. Le sérotype  
10 6A a été conjugué à PD, PhtD ou dPly servant de support.

Les résultats sont résumés sur la figure 1, réponse anti-PS6A par ELISA.

### Conclusions

15 Les titres ELISA en IgG anti-PS6A les plus élevés ont été obtenus avec le conjugué PS6A-PD produit avec un polysaccharide natif (1106 kDa). L'évaluation a montré une tendance vers une plus faible immunogénicité pour les conjugués contenant un polysaccharide dimensionné.  
20 En utilisant la PhtD comme support, un titre ELISA en IgG anti-PS plus faible a été observé avec le conjugué produit avec un polysaccharide dimensionné (14V (6A-PhtD/008 en utilisant le lot E01)). Ensuite, comme décrit dans les exemples suivants, un changement de cible de dimensionnement a été étudié pour produire un PS6A, avec une robustesse du procédé et de l'immunogénicité des conjugués résultants. Les expériences suivantes ont été mises en œuvre pour évaluer un polysaccharide dimensionné possédant un poids moléculaire plus élevé  
25 que le PS6A du lot E01.  
30

Exemple 4 : évaluation de conjugués PS6A dimensionné-CRM197

Pour chaque conjugué, les paramètres de la conjugaison sont présentés dans le tableau 4 (concentrations en PS6A et en support, rapport initial support/PS6A (en poids/poids), temps de couplage et rapport CDAP/PS6A (en poids/poids)).

Préparation des solutions

10       • Solution de CDAP

Juste avant l'activation, une solution de tétrafluoroborate de cyanodiaminopyridinium (CDAP) a été préparée à 100 mg/ml dans le mélange acetonitrile/eau pour injection (50/50 (en volume/volume)).

15

Activation

Le PS6A natif ou dimensionné a été dilué à une concentration définie et le pH de la solution a été ajusté à  $6,0 \pm 0,2$ . Au temps 0, la solution de CDAP a été ajoutée manuellement afin d'obtenir un rapport CDAP/PS6A (en poids/poids) défini.

Après 1,5 minute, le pH a été augmenté jusqu'à la valeur de pH d'activation par ajout de NaOH.

A 4,5 minutes, la solution de protéine (à une concentration et un tampon définis) a été ajoutée afin d'obtenir un rapport protéine/PS6A (en poids/poids) fixe. Le pH de la solution a été ajusté à la valeur du pH de couplage pendant une durée définie (temps de couplage - voir le tableau 4).

30       Au temps  $T = \text{temps de couplage} + 4 \text{ minutes } 30$ , une solution de glycine 2 M pH 9,0 a été ajoutée pour

désactiver la réaction. Après 30 minutes de désactivation, le conjugué a été directement injecté sur une colonne de purification ou laissé pendant une nuit sous agitation continue à une température de +2 à +8 °C 5 avant la purification.

#### Purification

Avant la purification, la solution de conjugué a été filtrée à travers une membrane de 5 µm ou 10 µm afin 10 d'éliminer les agrégats et les particules. Le conjugué a ensuite été purifié sur une colonne de Sephacryl S400HR (hauteur du lit : 100 cm +/- 10 cm) en utilisant du NaCl 150 mM comme éluant. Le conjugué a ensuite été stérilisé 15 par filtration sur une membrane de PVDF (poly(difluorure de vinylidène)) de 0,22 µm. La masse stérilisée (masse conjuguée) a été stockée à +2-8 °C jusqu'à la formulation.

#### Caractérisation

Le rapport protéine/polysaccharide final (en 20 poids/poids) sur le conjugué stérilisé a été déterminé par le rapport des concentrations de Lowry/résorcinol. L'antigénicité et la teneur en PS libre (polysaccharide) ont été déterminées en utilisant les procédés décrits ci-dessous dans le présent document. Les données sont 25 présentées dans le tableau 5.

#### Test d'antigénicité

Il a été attribué au polysaccharide natif une valeur 30 d'indice d'antigénicité de 100 %. Dans la mesure où la corrélation entre l'indice d'antigénicité et l'immunogénicité n'avait pas été établie, la

détermination de l'antigénicité du polysaccharide dimensionné a été réalisée sous la forme d'une valeur indicative. L'objectif était de maintenir cette valeur aussi élevée que possible. Cette valeur a été déterminée 5 par ELISA.

L'antigénicité du polysaccharide a été déterminée dans une ELISA de type sandwich (voir l'exemple 1 pour la mesure de l'antigénicité).

10 Teneur en PS libre par ELISA

Après la réaction du conjugué avec un sérum anti-support, le complexe a été précipité en utilisant du sulfate d'ammonium saturé (SAS). Après centrifugation, la teneur en PS06A libre a été obtenue par ELISA (anti-15 PS/anti-PS, voir la partie 2.8.1.2) sur le surnageant. Le pourcentage de PS libre a été calculé de manière proportionnelle par rapport à la teneur totale en PS mesurée par le procédé au résorcinol.

L'absence de conjugué dans le surnageant a 20 également été contrôlée par une ELISA  $\alpha$ -support/ $\alpha$ -PS06A.

25

30

33

20

5

5

10

5

10

Tableau 4 : Conditions du procédé pour les conjugués PS6A-CRM197 à une échelle de 50 mg

Conjugué	PS6A	Dissolution du PS (M de NaCl)	[mg/ml]	Tampon de dissolution du support	[mg/ml]
PS6A-CRM197/015	natif	2	5	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A-CRM197/016	natif	2	5	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A-CRM197/017	E01	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A-CRM197/018	E01	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A-CRM197/019	E01	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10

114

BE2016/5782

30  
25  
20  
15  
10

PS6A- CRM197/020	E01	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/021	E01	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/022	E03	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/023	E03	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/024	E03	2	10	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10

30  
20  
10  
0  
N  
50  
100  
50

116

BE2016/5782

Conjugué	Rapport initial (en poids/poids)	CDAP (mg/mg de PS)	Temps de couplage (minute)	pha/ phc/ phq	Remarque
PS6A- CRM197/015	1,5/1	1,5/1	60	9,5/9,5/9,0	50 mg
PS6A- CRM197/016	1,5/1	0,75/1	60	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/017	1,5/1	0,75/1	120	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/018	1,5/1	1,5/1	120	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/019	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/020	2/1	0,75/1	120	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/021	1,5/1	1,5/1	120	9,5/9,5/9	200 mg

30  
20  
10  
0  
50  
40  
30  
20  
10  
0

PS6A- CRM197/022	1,5/1	1,5/1	120	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/023	1,5/1	1,5/1	60	9,5/9,5/9	50 mg
PS6A- CRM197/024	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9	50 mg

Remarque : une désignation telle que « PS6A-CRM197/024 » indique le PS6A-CRM197 du lot 024

Tableau 5 : Caractérisation des conjugués PS6A-CRM197 à une échelle de PS de 50 mg

Conjugué	Rapport support/PS final (en poids/poids)	Polysaccharide libre par ELISA (en °C)	$\alpha$ PS/ $\alpha$ PS (en °C)	$\alpha$ prot/ $\alpha$ PS (en °C)	Rendement (%)	Remarque
PS6A- CRM197/015	0,91/1				58,8	Problème de filtration
PS6A- CRM197/016	0,65/1				45,1	

30  
25  
20  
15  
10  
5

118

BE2016/5782

PS6A- CRM197/017	1,23/1			28,2	pool resserré/ mauvaise séparation
PS6A- CRM197/018	1,33/1 (NF)			48,3	
PS6A- CRM197/019	1,10/1			50,2	
PS6A- CRM197/020	1,41/1			50,6	
PS6A- CRM197/021	1,42/1	0,8	35	125	45,4
PS6A- CRM197/022	1,11/1	1,1	23	67	Problème de filtration
PS6A- CRM197/023	1,24/1	0,8	27	98	61,4
PS6A- CRM197/024	1,19/1	1,3	31	95	65,3

Le premier ensemble de conjugués (PS6A-CRM197/015, PS6A-CRM197/016) a été produit avec le polysaccharide natif ( $M_w$  par MALLS de 990 kDa) et présentait des limitations en termes de rapport CRM/PS final à atteindre 5 et d'aptitude à la filtration des conjugués résultants (tableau 5).

Un deuxième ensemble de conjugués (PS6A-CRM197/017, PS6A-CRM197/018, PS6A-CRM197/019, PS6A-CRM197/020, PS6A-CRM197/021) a été produit en utilisant un 10 polysaccharide dimensionné (lot E01). En augmentant le rapport CDAP/PS et/ou le rapport initial CRM/PS, le rapport CRM/PS final et le rendement en polysaccharide souhaités ont pu être atteints. Les meilleures 15 conditions (PS6A-CRM197/021) ont été reproduites avec les nouveaux lots de polysaccharide dimensionné, mais ils avaient un poids moléculaire plus élevé (lot E03) que le précédent. Cependant, un problème de filtration a été observé. Il a été découvert qu'en réduisant le temps de couplage ou le rapport CDAP/PS6A, il était 20 possible de résoudre le problème de filtration.

Un troisième ensemble de conjugués (PS6A-CRM197/022, PS6A-CRM197/023, PS6A-CRM197/024) a été produit en utilisant un polysaccharide dimensionné de sérotype 6A (lot E03). Les meilleures conditions (PS6A-CRM197/024) 25 étaient les suivantes : concentration en polysaccharide de 10 mg/ml dans du NaCl 2 M, un rapport CDAP/PS de 1/1 (en poids/poids), une concentration en CRM de 10 mg/ml dans 10 mM de K/K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2, 0,2 M de NaCl, un rapport initial CRM/PS de 1,5/1 (en poids/poids), un pH pour 30 l'activation et le couplage de 9,5 et un temps de couplage de 120 minutes. Les conjugués résultants

présentaient un rapport CRM/PS final d'environ 1,2/1 (en poids/poids) pour un rendement global d'environ 65 %.

Exemple 5 : production de conjugués 6A dimensionné-

5 CRM197 à une échelle de 200 mg

Une augmentation jusqu'à une échelle de PS de 200 mg a été réalisée (tableau 6 et tableau 7).

10

15

20

25

30

25

20

10

5

2

1

Tableau 6 : Conditions du procédé pour les conjugués PS6A-CRM197 à une échelle de PS de

200 mg

Conjugué	Lot	Poids moléculaire estimé (kDa)*	Dissolution du PS (M de NaCl)	[mg/ml]	Lot	Tampon de dissolution du support	[mg/ml]
PS6A- CRM197/025	E03	968	2	10	CRM197 -012	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/026	E03	968	2	10	CRM197 -012	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/027	E03	968	2	10	CRM197 -009	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PS6A- CRM197/028	E07	929	2	10	CRM197 -014	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10

30  
25  
20  
15  
10  
5  
0

PSS6A- CRM197/029	E07	929	2	10	CRM197 -014	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10
PSS6A- CRM197/030	E08	1004	2	10	CRM197 -014	K/K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM pH7 2NaCl 0,2 M	10

\* Estimation réalisée en utilisant une courbe d'étalonnage de dextrans (voir le tableau A pour les données MALLS)

30  
25  
20  
15  
10  
5  
0

Conjugué	Rapport initial (en poids/poids)	CDAP (mg/mg de PS)	Temps de couplage (minute)	pha/pha/pha/pha
PS6A-CRM197/025	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9
PS6A-CRM197/026	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9
PS6A-CRM197/027	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9
PS6A-CRM197/028	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9
PS6A-CRM197/029	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9
PS6A-CRM197/030	1,5/1	1/1	120	9,5/9,5/9

Tableau 7 : caractérisation des conjugués PS6A-CRM à une échelle de PS de 200 mg

Conjugué	Rapport support/PS final (en poids/poids)	PS libre par ELISA (%) 4 °C	αPS/αPS (%) 4 °C	aprot/αPS (%) 4 °C	Rendement (%)
PS6A-CRM197/025	1,32/1	0,2	56	132	56,6
PS6A-CRM197/026	1,20/1	0,1	50	125	56,2
PS6A-CRM197/027	1,25/1	0,2	49	113	57,6
PS6A-CRM197/028	1,18/1		44	89	60,2
PS6A-CRM197/029	1,22/1		36	101	67,8
PS6A-CRM197/030	1,36/1		28	91	56,4

Remarque	E6A-417	PS 6A-	CRM197 / 025
----------	---------	--------	--------------

Les données obtenues à partir d'une échelle de PS de 200 mg étaient conformes aux données obtenues à petite échelle. Les conjugués résultants présentaient un rapport CRM/PS final situé entre 1,25 et 1,32/1, pour un rendement global en polysaccharide de 56 %. En termes de 5 stabilité, aucun problème n'est apparu dans les analyses HP-SEC ou en ce qui concerne la teneur en polysaccharide libre par ELISA (données non disponibles avec le procédé chimique).

Sur la base de ces résultats, d'autres lots (voir 10 le tableau 5 ci-dessous) ont été produits dans les conditions suivantes : concentration en polysaccharide de 10 mg/ml dans du NaCl 2 M, un rapport CDAP/PS de 1/1 (en poids/poids), une concentration en CRM de 10 mg/ml 15 dans 10 mM de K/K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2, 0,2 M de NaCl, un rapport initial CRM/PS de 1,5/1 (en poids/poids), un pH pour l'activation et le couplage de 9,5 et un temps de couplage de 120 minutes.

20 Exemple 6 : immunogénicité des conjugués de PS6A chez les souris

Différents conjugués de PS6A dimensionné ont été 25 évalués chez des souris Balb/c (sous la forme d'une formulation monovalente) : conjugués 6A-CRM197 (PS6A-CRM025), 6A-PD (PS6A-PDLS001(E06)), 6A-PD (PS6A-PDLS002(E06)), 6A-PhtD (PS6A-PhtD008) et 6A<sub>AS</sub>-PhtD (PS6A-PhtD106 (E04)), PS6A-PhtD (PS6A-PhtD100(E06)) produits avec un PS dimensionné.

34 souris Balb/c ont été immunisées trois fois (jour 30 0-14-28) avec 0,3 µg de différents conjugués de PS6A adsorbés sur AlPO<sub>4</sub>. Les titres en IgG anti-PS6A par ELISA

et les titres d'opsonophagocytose (OP) ont été mesurés dans des sérums individuels collectés au jour 42. Les résultats sont présentés sur les figures 2A et 2B. Une réponse en anticorps significativement plus élevée a été 5 induite par PS6A-AH-PhtD (CDAP/EDAC) et PS6A-CRM 025 (CDAP) en ELISA et OPA.

#### Exemple 7 : caractérisation de PS6A dimensionné

##### 10 Concentration en CRM197

###### Décongélation de CRM197

La masse purifiée est stockée à -20 °C à une concentration de 1,917 mg/ml dans 10 mM de K/K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2. 15 7,5 g de la masse purifiée ont été décongelés pendant une nuit à +2/+8 °C.

###### Concentration par UF

L'ultrafiltration a été réalisée à température 20 ambiante sur un dispositif centramate.

La membrane d'ultrafiltration était une membrane OMEGA medium screen de 0,09 m<sup>2</sup> avec une coupure à 10 kDa (2 membranes). Le débit de circulation était de 1200 ml/minute et la pression transmembranaire appliquée 25 pendant l'expérience était située entre 7 et 10 psi.

La masse de CRM197 a été 7,5 fois plus concentrée afin d'atteindre une concentration d'environ 15 mg/ml (cible pour la conjugaison > 10 mg/ml).

Filtration sur 0,22 µm

Après l'ultrafiltration, la masse concentrée a été stérilisée par filtration sur un filtre Millipack 20 (PVDF) de 0,22 µm à 20 ml/minute. Elle a ensuite été 5 stockée à -20 °C jusqu'à son utilisation dans le couplage.

Le PS6A dimensionné a été caractérisé par le test suivant : MALLS et teneur antigène par ELISA. La stabilité a été évaluée après deux mois à -70 °C (T = 0 comparé à T = 2 mois). Aucun problème de stabilité n'est 10 observé quand le PS6A dimensionné est stocké à -70 °C. Les résultats de la caractérisation du PS6A dimensionné sont résumés dans le tableau 8.

15

20

25

30

30  
20  
10  
0  
N  
G  
C  
O

Tableau 8 : Données de caractérisation et stabilité du PS6A dimensionné

Teneur en antigène par le résorcinol (valeur IP)	T = 0 15 487 µg/ml	T = 2 M à -70 °C /
Poids moléculaire moyen en poids par MALLS	302,1 kDa	288,8 kDa
Rayon quadratique moyen en poids par MALLS	27,7 nm	27,3 nm
Rapport de polydispersité ( $M_w/M_n$ ) par MALLS	1,102	1,136
Teneur en antigène par ELISA	22 250 µg/ml	22 911 µg/ml
Rapport ELISA/résorcinol (%)	144 %	148 %

Deux conjugués (D06ADJA001, D06ADJA002) ont été produits à une échelle de PS de 2 g en utilisant un lot de PS6A dimensionné et un lot comme support. Les conditions de la conjugaison sont décrites ci-après.

5 La réaction a été réalisée à 25 +/- 1 °C dans un bioréacteur de 1 l.

2 g de PS6A dimensionné ont été dilués à 10 mg/ml dans du NaCl 2 M et le pH de la solution a été ajusté à 6,0 +/- 0,2 avec une solution de HCl à 0,05 N.

10 A T = 0, 2 g de CDAP en solution (solution à 100 mg/ml dans le mélange CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 50/50) ont été ajoutés manuellement la solution (rapport CDAP/PS = 1,0/1 en poids/poids).

15 A T = 1 minute 30, le pH a été augmenté jusqu'à 9,5 +/- 0,05 par ajout de NaOH 0,5 N. Il a fallu environ 90 secondes pour atteindre le pH cible.

20 A T = 4 minutes 30, 3 g de CRM197 (solution à 10 mg/ml dans 10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2, 2 M de NaCl) ont été ajoutés à la solution de PS6A activé en une minute afin d'atteindre un rapport CRM197/PS6A de 1,5/1 en poids/poids. Le pH a été ajusté à 9,5 +/- 0,05 pendant 120 minutes.

25 A T = 124 minutes 30, 100 ml d'une solution de glycine 2 M pH 9,0 ont été ajoutés pour désactiver le conjugué (rapport Gly/PS = 7,5/1 en poids/poids). Après 30 minutes de désactivation, le pH du mélange a été ajusté à 6,5 +/- 0,2 en utilisant du HCl 5 N. Quand le pH s'est stabilisé, le conjugué a été laissé pendant une nuit sous agitation continue à +2/+8 °C avant 30 clarification and purification.

### Purification

Avant l'élution sur Sephacryl S400HR, le conjugué a été clarifié en utilisant un filtre 10 µm Kleenpack HDCII à 50 ml/minute.

5 Le conjugué ensuite été injecté sur une Sephacryl S400HR. L'élution a été réalisée avec une solution de NaCl à 0,15 M et le pool collecté était basé sur une valeur de Kd. Kd est le coefficient de distribution ( $Kd = (V_e - V_0) / (V_t - V)$ )  $V_e$  = volume d'élution,  
10  $V_0$  = volume mort,  $V_t$  = volume total de la colonne.

Les critères suivants ont été utilisés pour la collecte du pool : à partir d'une  $DO_{280nm} = 0,05$  UA jusqu'à une valeur de Kd de 0,28.

### 15 Stérilisation par filtration

Avant la filtration, la masse a été ramenée à température ambiante.

Les lots ont été filtrés sur une membrane de stérilisation Opticap 4" (1900 cm<sup>2</sup>, PVDF) à un débit de 20 ml/minute. Le filtre a été rincé avec un tampon au NaCl 0,15 M avant la filtration. Après la filtration, 200 ml de NaCl 0,15 M ont été passés à travers le filtre pour limiter la perte de matière. Aucun problème n'est apparu pendant la filtration.

25

### Evaluation préclinique

Des groupes de 48 souris Balb/c femelles (âgées de 4 semaines) ont été immunisés IM aux jours 0, 14 et 28 avec des formulations de conjugué adsorbé (AlPO<sub>4</sub>) 30 contenant 0,1 µg de D06ADJA001, D06ADJA002, PS6A-CRMLS001 (produit avec le PS6A dimensionné, lot E07),

PS6A-CRMLS002 (produit avec le PS6A dimensionné, lot E07) ou PS6A-PDLS001 (comme référence).

Les taux d'IgG anti-PS6A (figure 3A) et les titres d'opsono-phagocytose (figure 3B) ont été mesurés dans 5 des sérum individuels collectés au jour 42. Aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne les réponses en anticorps induites par le PS6A-CRM produit selon l'exemple 7, en comparaison avec le PS6A-CRM produit selon l'exemple 8 en ELISA et en OPA.

10

Exemple 8 : préparation d'un conjugué 6A

Un conjugué 6A dimensionné (lot E06AADJA059) a été produit à une échelle de PS de 15 g dans un réacteur de 15 l en utilisant les paramètres de conjugaison 6A dimensionnée produit à une échelle de PS de 200 mg (voir l'exemple 5). Le conjugué a ensuite été purifié sur une colonne de Sephacryl S400HR (colonne BPG450 (GE Healthcare)) en utilisant du NaCl 150 mM comme éluant. Le conjugué a ensuite été stérilisé par filtration sur 20 une membrane en PDVF de 0,22 µm et stocké à 2-8 °C. Le conjugué a été concentré (5x) et soumis à une diafiltration (10 volumes de diafiltration) contre WFI (eau pour injection) en utilisant une membrane 10 kDa MWCO OMEGA PES (T-series, PALL). Le rétentat a ensuite 25 été filtré sur une membrane de 0,22 µm.

30

SEQ ID NO. 1: MetLysLeuIysThrLeuAlaLeuSerLeuLeuAlaAlaGlyValLeuAlaGly  
 CysSerSerHisSerSerAsnMetAlaAsnThrGlnMetLysSerAspLysIle  
 IleIleAlaAlaHisArgGlyAlaSerGlyTyrLeuProGluHisThrLeuGluSerLysAla  
 LeuAlaPheAlaGlnGlnAlaAspTyrLeuGluGlnAspLeuAlaMetThrLysAspGly  
 ArgLeuValValIleHisAspHisPheLeuAspGlyLeuThrAspValAlaLysLysPhe  
 ProHisArgHisArgLysAspGlyArgTyrTyrValIleAspPheThrLeuLysGluIle  
 5 GlnSerLeuGluMetThrGluAsnPheGluThrLysAspGlyLysGlnAlaGlnValTyr  
 ProAsnArgPheProLeuTrpLysSerHisPheArgIleHisThrPheGluAspGluIle  
 GluPhelleGlnGlyLeuGluLysSerThrGlyLysLysValGlyIleTyrProGluIle  
 LysAlaProTrpPheHisHisGlnAsnGlyLysAspIleAlaAlaGluThrLeuLysVal  
 LeuLysLysTyrGlyTyrAspLysLysThrAspMetValTyrLeuGlnThrPheAspPhe  
 10 AsnGluLeuLysArgIleLysThrGluLeuLeuProGlnMetGlyMetAspLeuLysLeu  
 ValGlnLeuIleAlaTyrThrAspTrpLysGluThrGlnGluLysAspProLysGlyTyr  
 TrpValAsnTyrAsnTyrAspTrpMetPheLysProGlyAlaMetAlaGluValValLys  
 TyrAlaAspGlyValGlyProGlyTrpTyrMetLeuValAsnLysGluGluSerLysPro  
 AspAsnIleValTyrThrProLeuValLysGluLeuAlaGlnTyrAsnValGluValHis  
 ProTyrThrValArgLysAspAlaLeuProGluPhePheThrAspValAsnGlnMetTyr  
 AspAlaLeuLeuAsnLysSerGlyAlaThrGlyValPheThrAspPheProAspThrGly  
 ValGluPheLeuLysGlyIleLys

SEQ ID NO. 2: MetAspProSerSerHisSerSerAsnMetAlaAsnThrGlnMetLysSerAspLysIle  
 15 IleIleAlaHisArgGlyAlaSerGlyTyrLeuProGluHisThrLeuGluSerLysAla  
 LeuAlaPheAlaGlnGlnAlaAspTyrLeuGluGlnAspLeuAlaMetThrLysAspGly  
 ArgLeuValValIleHisAspHisPheLeuAspGlyLeuThrAspValAlaLysLysPhe  
 ProHisArgHisArgLysAspGlyArgTyrTyrValIleAspPheThrLeuLysGluIle  
 GlnSerLeuGluMetThrGluAsnPheGluThrLysAspGlyLysGlnAlaGlnValTyr  
 ProAsnArgPheProLeuTrpLysSerHisPheArgIleHisThrPheGluAspGluIle  
 GluPhelleGlnGlyLeuGluLysSerThrGlyLysLysValGlyIleTyrProGluIle  
 LysAlaProTrpPheHisHisGlnAsnGlyLysAspIleAlaAlaGluThrLeuLysVal  
 LeuLysLysTyrGlyTyrAspLysLysThrAspMetValTyrLeuGlnThrPheAspPhe  
 20 AsnGluLeuLysArgIleLysThrGluLeuLeuProGlnMetGlyMetAspLeuLysLeu  
 ValGlnLeuIleAlaTyrThrAspTrpLysGluThrGlnGluLysAspProLysGlyTyr  
 TrpValAsnTyrAsnTyrAspTrpMetPheLysProGlyAlaMetAlaGluValValLys  
 TyrAlaAspGlyValGlyProGlyTrpTyrMetLeuValAsnLysGluGluSerLysPro  
 AspAsnIleValTyrThrProLeuValLysGluLeuAlaGlnTyrAsnValGluValHis  
 ProTyrThrValArgLysAspAlaLeuProGluPhePheThrAspValAsnGlnMetTyr  
 AspAlaLeuLeuAsnLysSerGlyAlaThrGlyValPheThrAspPheProAspThrGly  
 25 ValGluPheLeuLysGlyIleLys

SEQ ID NO. 3: SerSerHisSerSerAsnMetAlaAsnThr

REVENDICATIONS

1. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne ( $M_w$ ) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 5 210 et 400, 210 et 370, 220 et 360, 230 et 350, 240 et 340, 240 et 320, 240 et 310 ou 250 et 310 kDa.
2. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon la revendication 1, qui a été dimensionné par une technique 10 de dimensionnement mécanique.
3. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon la revendication 1 ou la revendication 2, conjugué à une protéine porteuse (par exemple, CRM-197).
- 15 4. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon la revendication 3, dans lequel le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué directement à la protéine porteuse.
- 20 5. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'une quelconque des revendications 3 à 4, dans lequel le polysaccharide 6A est conjugué à la protéine porteuse ou à un lieur en utilisant la chimie au CDAP.
- 25 6. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel le polysaccharide capsulaire de sérotype 6A (PS6A) est conjugué à la protéine porteuse ou à un lieur en

utilisant la chimie au CDAP avec un rapport CDAP/PS6A situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, ou de 1/1.

7. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'une 5 quelconque des revendications 3 à 6, dans lequel le polysaccharide capsulaire de sérotype 6A est conjugué à la protéine porteuse ou au lieu en utilisant la chimie au CDAP, dans laquelle la réaction est réalisée avec un temps de couplage situé entre 50 et 130 minutes, 60 et 10 130 minutes ou 110 et 130 minutes.

8. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, dans lequel le rapport protéine porteuse sur polysaccharide capsulaire 15 de sérotype 6A est situé entre 5/1 et 1/5, 4/1 et 1/1 ou 2/1 et 1/1, 1,5/1 et 1/1, 1,4/1 et 1,3/1 (par exemple, 1,2/1, 1,5/1) (en poids/poids).

9. Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'une 20 quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel le polysaccharide capsulaire 6A est dimensionné d'un facteur d'au plus x5.

10. Procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de 25 sérotype 6A comprenant la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse ou à un lieu en utilisant la chimie au CDAP avec un rapport CDAP/PS situé entre 1/2 et 3/1, 1/1,5 et 2/1, ou de 1/1.

30 11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel la réaction est réalisée avec un temps de couplage situé

entre 50 et 130 minutes, 60 et 130 minutes ou 110 et 130 minutes.

12. Procédé de préparation d'un conjugué de polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de 5 sérotype 6A comprenant (a) la conjugaison d'un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A à une protéine porteuse et (b) une diafiltration contre une solution présentant une concentration en NaCl inférieure à 150 mM.

10 13. Composition immunogène comprenant un polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A obtenu par un 15 procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 conjugué à une protéine porteuse.

14. Composition immunogène selon la revendication 13, comprenant 10 ou plus de 10, 11 ou plus de 11, 12 ou plus de 12, 13 ou plus de 13, 14 ou plus de 14, 15 ou 20 plus de 15, ou 16 ou plus de 16 conjugués de polysaccharide capsulaire provenant de différents sérotypes de *S. pneumoniae*.

15. Composition immunogène selon la revendication 13 ou la revendication 14, comprenant 1 ou plus de 1 25 conjugué de polysaccharide capsulaire natif provenant de *S. pneumoniae*.

16. Composition immunogène selon la revendication 15, comprenant un polysaccharide capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B.

30 17. Composition immunogène selon la revendication 15 ou la revendication 16, comprenant un polysaccharide

capsulaire natif de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 23F.

18. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, qui comprend un 5 polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 500 et 1800, 900 et 1660 ou 1000 et 1400 kDa.

19. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 18, qui comprend un 10 polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 23F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 500 et 1500, 600 et 1500, 700 et 1300, 900 et 1250, 800 et 1100 ou 900 et 1000 kDa.

20. Composition immunogène selon l'une quelconque 15 des revendications 13 à 19, qui comprend un polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* :  
(a) de sérotype 1 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 200 et 800, 250 et 600, ou 300 et 400 kDa ; (b) de sérotype 4 présentant une taille 20 moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 500, 60 et 300, 70 et 150, ou 75 et 125 kDa ; (c) de sérotype 5 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 100 et 1000, 100 et 700, 100 et 350, ou 150 et 300 kDa ; (d) de sérotype 7F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 25 1000, 100 et 750, 150 et 500, ou 200 et 300 kDa ; (e) de sérotype 9V présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 500, 200 et 400, ou 250 et 300 kDa ; (f) de sérotype 14 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 150 et 30 500, ou 200 et 250 kDa ; (g) de sérotype 18C présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 50 et

750, 50 et 500, 50 et 190, 50 et 150 ou 80 et 110 kDa (h) de sérotype 19F présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 1000, 100 et 750, 100 et 500, 100 et 190 ou 120 et 180 kDa ; et/ou (i) de sérotype 19A 5 présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 800 kDa, 110 et 700, 110 et 300, 120 et 200, 130 et 180, 140 et 160 ou 80 et 130 kDa.

21. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 20, qui comprend en outre un 10 sérotype 22F capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* présentant une taille moyenne ( $M_w$ ) située entre 50 et 800 kDa, 110 et 700 kDa, 110 et 300, 120 et 200, 130 et 180, 150 et 170, 100 et 190, 100 et 150, 95 et 125 ou 100 et 115 kDa.

15 22. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 21, comprenant 2, 3, 4, 5 ou 6 protéines porteuses différentes.

23. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 22, dans laquelle une ou 20 plusieurs ou toutes les protéines porteuses sont choisies dans le groupe constitué par : l'anatoxine diphtérique (DT), CRM197, l'anatoxine tétnique (TT), le fragment C de TT, dPly, PhtA, PhtB, PhtD, PhtE, PhtDE OmpC, PorB et la protéine D de *Haemophilus influenzae*.

25 24. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 23, dans laquelle le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6B est conjugué à une protéine porteuse (par exemple, la protéine D) différente de la protéine 30 porteuse à laquelle le polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est conjugué.

25. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 24, comprenant un saccharide de sérotype 1 conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 4 conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 5 conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 6B conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 7F conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 9V conjugué à la protéine D, un saccharide de sérotype 14 conjugué à la protéine D et un saccharide de sérotype 23F conjugué à la protéine D.

26. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 25, comprenant le sérotype 19F conjugué à l'anatoxine diphtérique.

27. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 26, dans laquelle la composition comprend un saccharide capsulaire 18C conjugué à l'anatoxine tétanique (TT), facultativement dans laquelle 18C est le seul saccharide dans la composition conjugué à l'anatoxine tétanique (TT), facultativement par l'intermédiaire d'un lieur ADH.

28. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 27, comprenant en outre un ou plusieurs saccharides capsulaires de *S. pneumoniae* d'un ou de plusieurs sérotypes choisis parmi le sérotype 33F, le sérotype 15 et le sérotype 12F, conjugués à une ou plusieurs protéines porteuses.

29. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 28, dans laquelle la dose du conjugué de saccharides 6A est située entre 1 et 10 µg, 1 et 5 µg, ou 1 et 3 µg de saccharide (par exemple, 2 µg).

30. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 29, qui comprend en outre une ou plusieurs protéines de *S. pneumoniae*, conjuguées ou non conjuguées, choisies parmi : la famille des triades 5 polyhistidine (PhtX), la famille des protéines se liant à la choline (CbpX), les CbpX tronquées, la famille des LytX, les LytX tronquées, les protéines chimères CbpX tronquée-LytX tronquée, la pneumolysine détoxifiée (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 et Sp133.

10 31. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 30, qui comprend en outre un adjuvant.

15 32. Composition immunogène selon la revendication 31, dans laquelle l'adjuvant comprend (pour une dose de 0,5 ml) 100 à 750, 200 à 500 ou 300 à 400 µg d'Al (aluminium) sous forme de phosphate d'aluminium.

33. Vaccin comprenant la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 32 et un excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

20 34. Procédé de préparation du vaccin selon la revendication 33, qui comprend l'étape de mélange de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 32 avec un excipient ou support pharmaceutiquement acceptable.

25 35. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 32 ou vaccin selon la revendication 33, pour son utilisation dans le traitement ou la prévention d'une maladie provoquée par une infection par *Streptococcus pneumoniae*.

30 36. Utilisation de la composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 12 à 32 ou du vaccin

selon la revendication 33, dans la fabrication d'un médicament pour le traitement ou la prévention d'une maladie provoquée par une infection par *Streptococcus pneumoniae*.

Figure 1: Evaluation de conjugués PS6A dans une formulation 14V AIPO4 dans le modèle de souris Balb/c avec co-administration d'Infanrix Hexa. ELISA anti-PS6A.

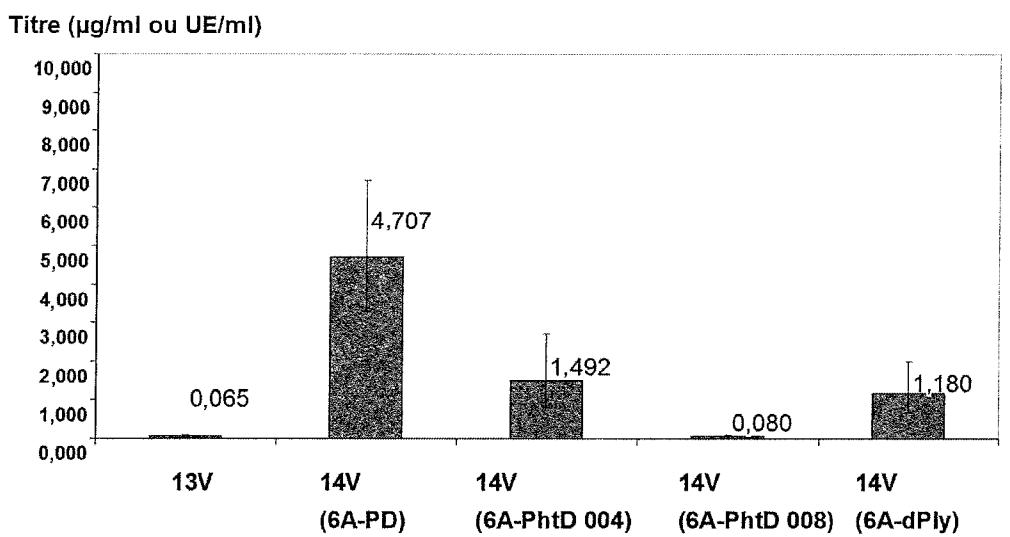
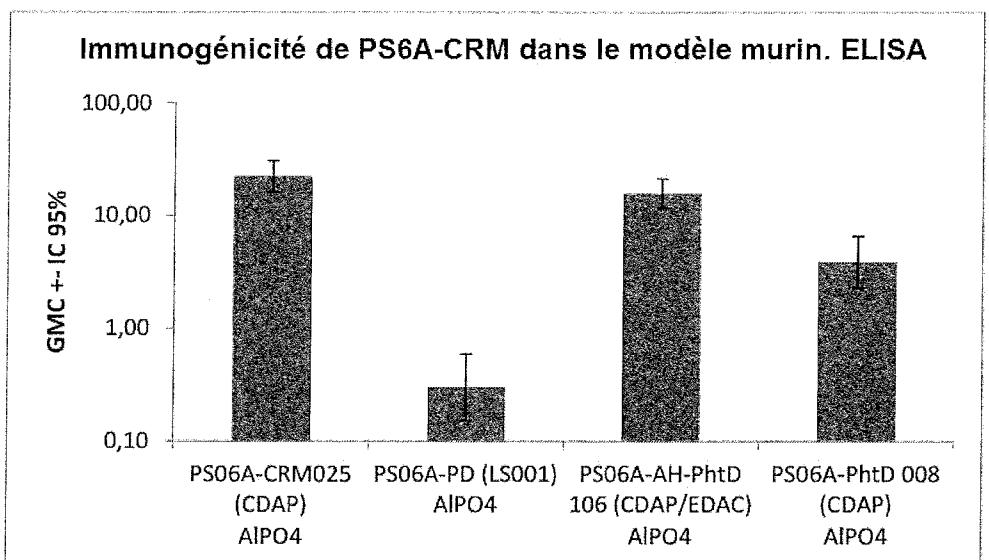
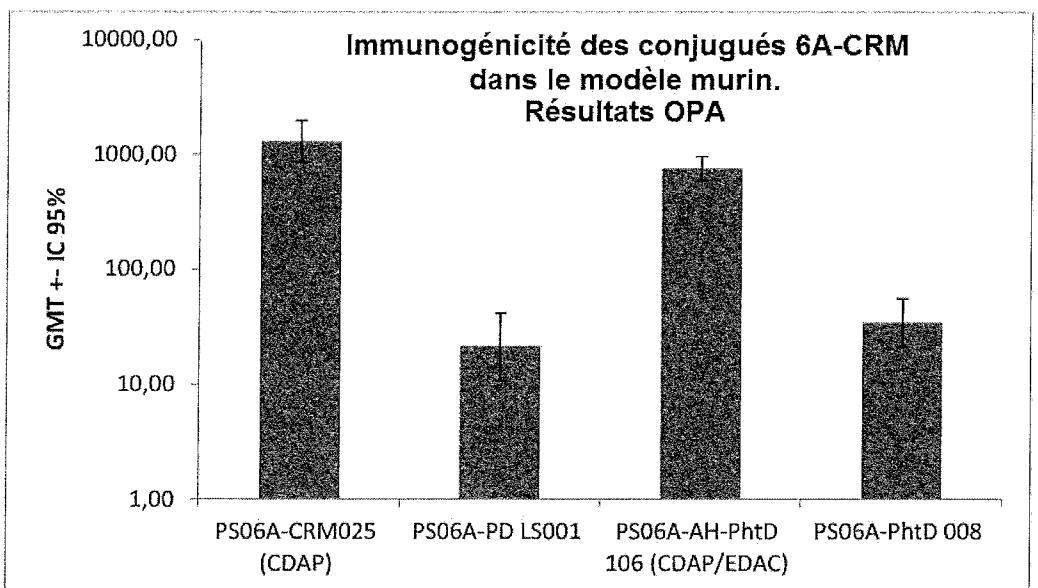


Figure 1

(A)



(B)

**Figure 2**

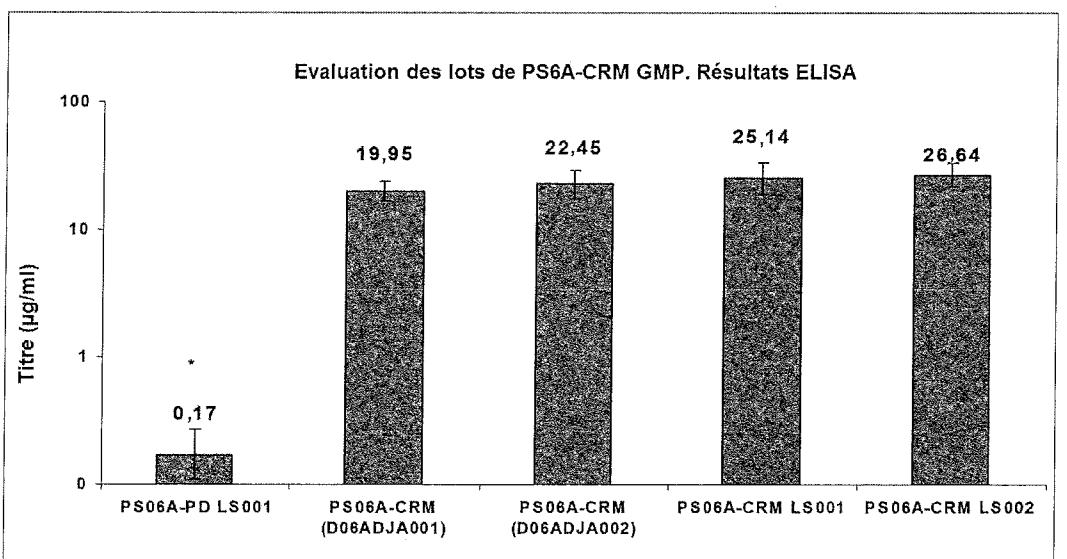


Figure 3A

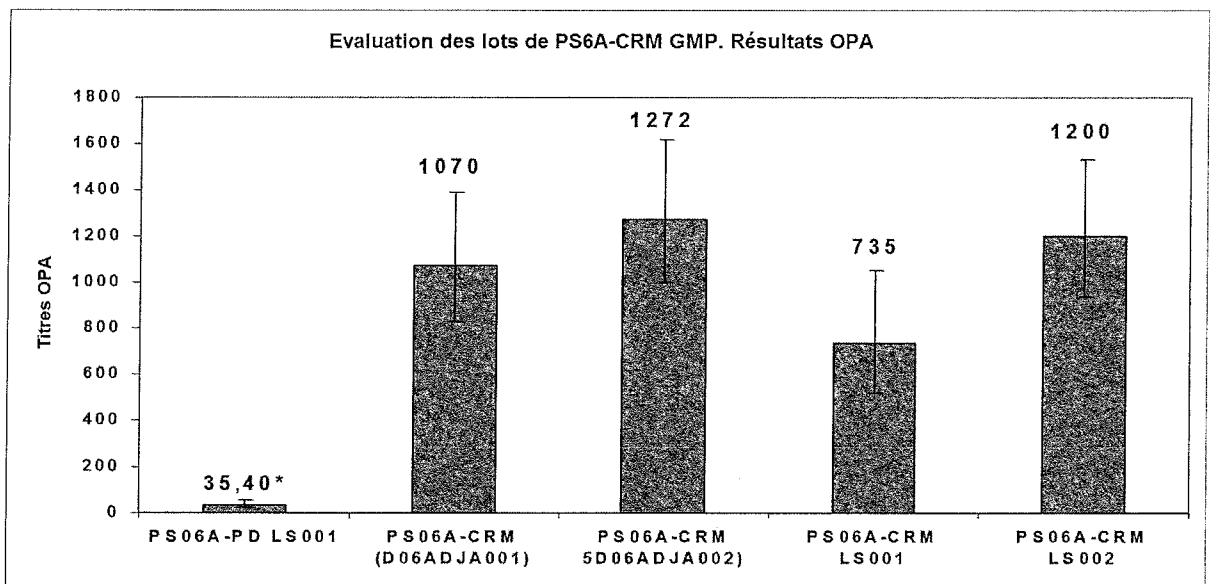


Figure 3B

ABRÉGÉVACCIN

La présente invention concerne le domaine des vaccins à conjugués de saccharides capsulaires pneumococciques. Plus précisément, la présente invention concerne des polysaccharides capsulaires dimensionnés de 5 *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, en particulier des polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A dont la taille moyenne (par exemple,  $M_w$ ) est située entre 100 et 1000 kDa, conjugués de manière appropriée à une protéine porteuse.

10



Numéro de la demande nationale

**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 11382  
BE 201605782**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	ABSENCE D'UNITE D'INVENTION voir feuille supplémentaire B ----- WO 2011/110241 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; DUVIVIER PIER) 15 septembre 2011 (2011-09-15) * voir le document en entier et en particulier pages 6-11 et les revendications. *-----	1-39	INV. C07K14/505 A61K38/00 A61K39/09 A61K39/00 A61K47/64
X	WO 2009/000826 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; HERMAND PHILI) 31 décembre 2008 (2008-12-31) * voir le document en entier et en particulier pages 5-13 et les revendications. *-----	1-39	
X	WO 2007/071707 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; GARCON NATHAL) 28 juin 2007 (2007-06-28) * voir le document en entier et en particulier pages 4-12 et les revendications. *-----	1-39	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
X	WO 2014/060383 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]) 24 avril 2014 (2014-04-24) * voir le document en entier et en particulier pages 36-52, Exemple 21 et les revendications. *-----	1-39	A61K C07K
X	US 2015/202309 A1 (EMINI EMILIO ANTHONY [US] ET AL) 23 juillet 2015 (2015-07-23) * voir le document en entier et en particulier les paragraphes 54 et 75. *-----	1-39	
1	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
	31 août 2017	Ury, Alain	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-entrée P : document intercalaire			

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

BO 11382  
BE 201605782

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

**1. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 180 et 400 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

---

**2. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 210 et 400 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

---

**3. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 210 et 370 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

---

**4. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 220 et 360 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

---

**5. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 230 et 350 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

BO 11382  
BE 201605782

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

\*\*\*

**6. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 240 et 340 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

\*\*\*

**7. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 240 et 320 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

\*\*\*

**8. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 240 et 310 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

\*\*\*

**9. revendications: 1-39(en partie)**

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 250 et 310 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

\*\*\*

La recherche a été limitée au premier sujet.

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

BO 11382  
BE 201605782

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31-08-2017

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO 2011110241	A1	15-09-2011	AU 2010348155 A1 BR 112012022359 A2 CA 2791915 A1 CN 102869375 A EA 201290690 A1 EP 2544710 A1 JP 2013521315 A KR 20130018759 A SG 183475 A1 US 2012321658 A1 WO 2011110241 A1	01-11-2012 05-07-2016 15-09-2011 09-01-2013 30-04-2013 16-01-2013 10-06-2013 25-02-2013 27-09-2012 20-12-2012 15-09-2011
-----	-----	-----	-----	
WO 2009000826	A1	31-12-2008	AU 2008267208 A1 AU 2008267210 A1 BR PI0813307 A2 BR PI0813644 A2 CA 2690707 A1 CA 2690708 A1 CA 2690710 A1 CN 101784282 A CN 101883583 A CN 104873965 A CY 1116901 T1 DK 2167121 T3 EA 200901576 A1 EA 200901578 A1 EA 201391788 A1 EP 2167120 A2 EP 2167121 A1 EP 2170379 A2 EP 2687228 A2 ES 2552366 T3 ES 2626662 T3 HR P20151122 T1 HU E026853 T2 JP 5476295 B2 JP 5489993 B2 JP 5848790 B2 JP 2010531329 A JP 2010531330 A JP 2010531331 A JP 2014139192 A KR 20100045445 A KR 20100045446 A PT 2167121 E SI 2167121 T1	31-12-2008 31-12-2008 23-12-2014 23-12-2014 31-12-2008 31-12-2008 31-12-2008 21-07-2010 10-11-2010 02-09-2015 05-04-2017 23-11-2015 30-06-2010 30-08-2010 29-08-2014 31-03-2010 31-03-2010 07-04-2010 22-01-2014 27-11-2015 25-07-2017 20-11-2015 29-08-2016 23-04-2014 14-05-2014 27-01-2016 24-09-2010 24-09-2010 24-09-2010 31-07-2014 03-05-2010 03-05-2010 02-12-2015 31-12-2015

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

BO 11382  
BE 201605782

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31-08-2017

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		US 2010183662 A1	22-07-2010
		US 2010209450 A1	19-08-2010
		US 2010239604 A1	23-09-2010
		WO 2009000824 A2	31-12-2008
		WO 2009000825 A2	31-12-2008
		WO 2009000826 A1	31-12-2008
<hr/>			
WO 2007071707 A2 28-06-2007	AR 058592 A1	13-02-2008	
	AR 058706 A1	20-02-2008	
	AR 058707 A1	20-02-2008	
	AT 520415 T	15-09-2011	
	AU 2006327036 A1	28-06-2007	
	AU 2006327040 A1	28-06-2007	
	AU 2006327041 A1	28-06-2007	
	AU 2010241281 A1	25-11-2010	
	BR P10620163 A2	01-11-2011	
	BR P10620193 A2	01-11-2011	
	BR P10620460 A2	16-11-2011	
	CA 2633772 A1	28-06-2007	
	CA 2634885 A1	28-06-2007	
	CA 2634887 A1	28-06-2007	
	CA 2808919 A1	28-06-2007	
	CA 2816182 A1	28-06-2007	
	CL 2013002106 A1	07-03-2014	
	CN 101374548 A	25-02-2009	
	CN 101378778 A	04-03-2009	
	CN 101378779 A	04-03-2009	
	CN 103251940 A	21-08-2013	
	CN 103585623 A	19-02-2014	
	CR 10119 A	29-07-2008	
	CR 10122 A	21-08-2008	
	CY 1112677 T1	10-02-2016	
	CY 1116407 T1	08-02-2017	
	CY 1118345 T1	28-06-2017	
	CY 1118535 T1	12-07-2017	
	DK 1962899 T3	31-10-2011	
	DK 1968631 T3	15-06-2015	
	DK 1973564 T3	16-01-2017	
	DK 2384765 T3	09-01-2017	
	EA 200801344 A1	30-12-2008	
	EA 200801367 A1	30-12-2008	
	EA 200801374 A1	30-12-2008	
	EP 1962899 A2	03-09-2008	
	EP 1968631 A2	17-09-2008	
	EP 1973564 A2	01-10-2008	
	EP 2382986 A2	02-11-2011	

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

BO 11382  
BE 201605782

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31-08-2017

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		EP 2384765 A2	09-11-2011
		EP 2402025 A2	04-01-2012
		EP 3017827 A1	11-05-2016
		EP 3020411 A1	18-05-2016
		EP 3130348 A1	15-02-2017
		ES 2539795 T3	06-07-2015
		ES 2614938 T3	02-06-2017
		ES 2630759 T3	23-08-2017
		HK 1120230 A1	09-12-2011
		HR P20110685 T1	31-10-2011
		HR P20161681 T1	13-01-2017
		HR P20161682 T1	27-01-2017
		IL 191911 A	24-09-2015
		IL 191913 A	31-07-2012
		IL 192084 A	28-11-2013
		JO 2813 B	15-09-2014
		JP 5461838 B2	02-04-2014
		JP 5579387 B2	27-08-2014
		JP 5600337 B2	01-10-2014
		JP 5615323 B2	29-10-2014
		JP 5749689 B2	15-07-2015
		JP 5792920 B2	14-10-2015
		JP 5849125 B2	27-01-2016
		JP 2009520759 A	28-05-2009
		JP 2009520760 A	28-05-2009
		JP 2009520761 A	28-05-2009
		JP 2012211165 A	01-11-2012
		JP 2012229228 A	22-11-2012
		JP 2012232985 A	29-11-2012
		JP 2014205673 A	30-10-2014
		KR 20080081060 A	05-09-2008
		KR 20080081061 A	05-09-2008
		KR 20080081063 A	05-09-2008
		KR 20130103831 A	24-09-2013
		KR 20140036327 A	25-03-2014
		LT 1973564 T	27-12-2016
		LT 2384765 T	10-01-2017
		MA 30062 B1	01-12-2008
		MA 30065 B1	01-12-2008
		MA 30066 B1	01-12-2008
		MY 147495 A	14-12-2012
		MY 148141 A	15-03-2013
		MY 150719 A	28-02-2014
		MY 160199 A	28-02-2017
		NZ 569076 A	26-08-2011
		NZ 569077 A	26-08-2011

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

BO 11382  
BE 201605782

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31-08-2017

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		NZ 569168 A	24-02-2012
		NZ 596500 A	31-05-2013
		PE 10582007 A1	27-11-2007
		PE 13052007 A1	14-12-2007
		PH 12014502544 A1	14-12-2015
		PL 1973564 T3	28-04-2017
		PL 2384765 T3	31-05-2017
		PT 1962899 E	19-10-2011
		PT 1968631 E	20-07-2015
		PT 1973564 T	24-01-2017
		PT 2384765 T	06-02-2017
		SG 168517 A1	28-02-2011
		SI 1962899 T1	30-11-2011
		SI 1968631 T1	31-07-2015
		SI 1973564 T1	28-02-2017
		SI 2384765 T1	31-03-2017
		TW 1415622 B	21-11-2013
		TW 200738257 A	16-10-2007
		TW 201350129 A	16-12-2013
		US 2009010959 A1	08-01-2009
		US 2009017059 A1	15-01-2009
		US 2009017072 A1	15-01-2009
		US 2010074922 A1	25-03-2010
		US 2015190521 A1	09-07-2015
		US 2015265702 A1	24-09-2015
		US 2016243219 A1	25-08-2016
		WO 2007071707 A2	28-06-2007
		WO 2007071710 A2	28-06-2007
		WO 2007071711 A2	28-06-2007
-----	-----	-----	-----
WO 2014060383 A1 24-04-2014		AU 2013331781 A1	07-05-2015
		AU 2013333975 A1	07-05-2015
		CA 2888300 A1	24-04-2014
		CA 2888310 A1	24-04-2014
		CA 2888321 A1	24-04-2014
		CN 104853768 A	19-08-2015
		CN 104968366 A	07-10-2015
		EA 201590490 A1	30-10-2015
		EA 201590491 A1	29-01-2016
		EP 2908854 A2	26-08-2015
		EP 2908855 A1	26-08-2015
		EP 2908856 A1	26-08-2015
		JP 2015534962 A	07-12-2015
		JP 2015534964 A	07-12-2015
		JP 2015536312 A	21-12-2015
		KR 20150058571 A	28-05-2015

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

BO 11382  
BE 201605782

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

31-08-2017

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		KR 20150072444 A	29-06-2015
		SG 11201502634T A	28-05-2015
		SG 11201502635S A	28-05-2015
		WO 2014060383 A1	24-04-2014
		WO 2014060385 A1	24-04-2014
		WO 2014060389 A2	24-04-2014
<hr/>			
US 2015202309 A1	23-07-2015	AR 099445 A1	27-07-2016
		AU 2015208821 A1	07-07-2016
		CA 2937186 A1	30-07-2015
		CN 106102770 A	09-11-2016
		EP 3096785 A2	30-11-2016
		JP 2017509656 A	06-04-2017
		KR 20160098507 A	18-08-2016
		PE 10952016 A1	26-10-2016
		PH 12016501243 A1	15-08-2016
		SG 11201604728X A	30-08-2016
		TW 201531299 A	16-08-2015
		US 2015202309 A1	23-07-2015
		WO 2015110941 A2	30-07-2015
<hr/>			



## OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11382	Date du dépôt (jour/mois/année) 19.10.2016	Date de priorité (jour/mois/année) 21.10.2015	Demande n° BE201605782
-----------------------	---	--	---------------------------

Classification internationale des brevets (CIB)

INV. C07K14/505 A61K38/00 A61K39/09 A61K39/00 A61K47/64

Déposant

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

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

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

	Examinateur Ury, Alain
--	---------------------------

## OPINION ÉCRITE

Demande n°  
BE201605782

---

### 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° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

---

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- l'ensemble de la demande  
 les revendications nos. 1-39(en partie)

parce que :

- la demande ou les revendications nos. en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue d'effectuer une recherche :
- les revendications, la description, ou les dessins ou les revendications nos. en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable :
- les revendications, ou les revendications nos en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable :
- il n'a pas été établi de rapport de recherche pour toute la demande ou pour les revendications nos. 1-39(en partie) en question.
- une opinion valable n'a pas pu être formulée en l'absence d'un listage, le cas échéant sous format conforme à la norme internationale (OMPI ST.25), des séquences de nucléotides ou d'acides aminés.
- une opinion valable n'a pas pu être formulée en l'absence des tableaux relatifs au listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés, ou ceux-ci n'étant pas fournis sous forme électronique selon la norme internationale (OMPI ST.25).
- Voir le cadre supplémentaire pour de plus amples détails.

---

**Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention**

---

1. Il est estimé que l'exigence d'unité de l'invention n'est pas satisfaite pour les raisons suivantes :

**voir feuille séparée**

2. La présente opinion a été établie à partir des parties suivantes de la demande :

- toutes les parties de la demande  
 les parties relatives aux revendications nos (voir Rapport de Recherche)

---

**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	
	Non : Revendications	1-39(en partie)
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-39(en partie)
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-39(en partie)
	Non : Revendications	

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 WO 2011/110241 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; DUVIVIER PIER) 15 septembre 2011 (2011-09-15)
- D2 WO 2009/000826 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; HERMAND PHILI) 31 décembre 2008 (2008-12-31)
- D3 WO 2007/071707 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; GARCON NATHAL) 28 juin 2007 (2007-06-28)
- D4 WO 2014/060383 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]) 24 avril 2014 (2014-04-24)
- D5 US 2015/202309 A1 (EMINI EMILIO ANTHONY [US] ET AL) 23 juillet 2015 (2015-07-23)

1 **Ad point IV**

**Absence d'unité de l'invention**

- 1.1 On considère qu'il existe 9 inventions couvertes par les revendications. Les raisons pour lesquelles les inventions ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général sont les suivantes:
- L'objet commun qui lie entre elles les variantes dans le cadre des présentes revendication 1-39 est :
- Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A conjugué à une protéine porteuse (par exemple CRM-197), les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.
- Cet objet commun ne comprend pas un seul concept inventif général, basé sur des éléments techniques particuliers communs ou correspondants.
- En effet les documents D1-D5 (voir les passages cités dans le rapport de recherche) divulguent chacun des polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A conjugué à une protéine porteuse (par exemple CRM-197), les procédés de préparation, compositions

immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants. Les polysaccharides dimensionnés ont des tailles supérieures à 100, 200 ou 300 kDa et sont obtenus par dimensionnement mécanique du type microfluidisation ou sonication.

Le concept général commun liant les inventions 1-9 n'étant pas nouveau au vu de chacun des document D1-D5, lesdites inventions ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général.

Dans la mesure où il n'existe entre les objets des inventions aucun autre lien technique portant sur une ou plusieurs caractéristiques techniques particulières identiques ou correspondantes, l'exigence d'unité de l'invention n'est donc plus observée.

Par conséquent, la présente demande ne satisfait pas aux exigences d'unité de l'invention.

1.2 Les différentes inventions sont les suivantes.

Invention 1: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 180 et 400 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 2: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 210 et 400 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 3: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 210 et 370 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 4: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 220 et 360 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 5: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 230 et 350 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 6: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 240 et 340 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 7: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 240 et 320 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 8: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 240 et 310 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Invention 9: revendications: 1-39(en partie)

Polysaccharide capsulaire dimensionné de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A, dans lequel la taille moyenne (Mw) du polysaccharide capsulaire de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A est située entre 250 et 310 kDa ainsi que les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

1.3 Au vu de D1-D5 le problème objectif peut être considéré comme étant la fourniture de polysaccharides capsulaires dimensionnés de tailles alternatives provenant de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A conjugués à une protéine porteuse (par exemple CRM-197), les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants.

Chacune des inventions mentionnées représente une solution indépendante à ce même problème.

1.4 Invention recherchée et faisant l'objet du présent rapport: Invention 1.

2 **Ad point V**

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

2.1 La présente invention 1 ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-39 n'étant pas nouveau.

En effet les documents D1-D5 (voir les passages cités dans le rapport de recherche) divulguent chacun des compositions et vaccins comprenant des polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A conjugués à une protéine porteuse (par exemple CRM-197, PD etc...), les procédés de préparation, compositions immunogènes, vaccins et procédés d'immunisation correspondants. Les polysaccharides dimensionnés ont des tailles supérieures à 100, 200 ou 300 kDa et sont obtenus par dimensionnement mécanique du type microfluidisation ou sonication. Les polysaccharides dimensionnés peuvent être de différents types, combiné entre eux et conjugués à différentes protéines porteuses.

Les tailles supérieures à 100, 200 ou 300 kDa entrent dans le cadre de la présent invention 1, à savoir entre 180 et 400 kDa. A noter également que les méthodes de dimensionnement mentionnées dans D1-D5 sont bien connues pour donner des tailles moyennes (Mw) de polysaccharides entrant dans l'intervalle défini dans l'invention 1.

En conséquence, D1-D5, chacun pris isolément anticipe l'objet des présentes revendications.

**2.2 La présente invention 1 ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1-39 n'impliquant pas d'activité inventive.**

D1-D5 (voir ci-dessus) pris séparément peuvent chacun être considérés comme état de la technique le plus proche de l'objet des présentes revendications.

Pour peu qu'une différence puisse être mise en évidence entre certaines parties des revendications ou de la description et cet art antérieur, le problème que la présente invention se proposerait alors de résoudre serait la mise à disposition de polysaccharides capsulaires dimensionnés de *Streptococcus pneumoniae* de sérotype 6A de taille moyenne différente et conjugués à des protéines porteuses.

La solution proposée ne serait pas considérée comme impliquant une activité inventive dans la mesure où aucun effet avantageux n'est montré dans la demande pour les seuls PS6A dimensionnés obtenus et entrant dans le cadre de l'invention 1 (entre 180 et 400 kDa). Ces PS6A dimensionnés sont de taille 302,1 et 288,8 kDa (voir Tableau 8, page 128) et ne présentent aucun effet surprenant ni même avantageux.

La caractéristique de taille représente une des options que l'homme du métier sélectionnerait, selon le cas, parmi plusieurs possibilités évidentes, afin de résoudre le problème posé, sans faire preuve d'esprit inventif. Il est rappelé qu'une telle sélection ne peut être considérée comme inventive que si elle produit des effets inattendus ou présente des propriétés inattendues.

Cependant, aucun effet ni aucune propriété de ce genre ne sont mentionnés dans la demande.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1-39 n'implique pas d'activité inventive.