



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/12/20
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/06/27
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/06/16
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/004100
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/050108
(30) Priorité/Priority: 2000/12/21 (00/16808) FR

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ C07K 14/35, A61K 39/04, C07H 5/02,
C07K 9/00

(71) Demandeur/Applicant:
INSTITUT PASTEUR, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
MARCHAL, GILLES, FR;
ROMAIN, FELIX, FR;
PESCHER, PASCALE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : GLYCOPEPTIDES IMMUNOGENES, CRIBLAGE, PREPARATION ET APPLICATIONS.

(54) Title: IMMUNOGENIC GLYCOPEPTIDES, SCREENING, PREPARATION AND USES

(57) **Abrégé/Abstract:**

Glycopeptides immunogènes issus de microorganismes pathogènes, utiles pour la vaccination et le diagnostic d'infections dues à de tels microorganismes pathogènes (bactéries ou champignons), ainsi que leurs procédés de sélection et de préparation. Lesdits glycopeptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par: a1) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 % d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides sont: présentés par une molécule de classe II du CMH, reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et b1) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a1), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
27 juin 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/050108 A3(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/35, 9/00, C07H 5/02, A61K 39/04

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES, 6
avenue de Messine, F-75008 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/04100

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :

20 décembre 2001 (20.12.2001)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

00/16808 21 décembre 2000 (21.12.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du
Docteur Roux, F-75724 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : MAR-
CHAL, Gilles [FR/FR]; 4 rue Francisco Ferrer, F-94200
IVRY-SUR-SEINE (FR). ROMAIN, Félix [FR/FR];
49 bis rue Dreyfus, F-91640 FONTENAY-LES-BRIIS
(FR). PESCHER, Pascale [FR/FR]; 124 rue Damrémont,
F-75018 PARIS (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 29 août 2002

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: IMMUNOGENIC GLYCOPEPTIDES, SCREENING, PREPARATION AND USES

(54) Titre : GLYCOPEPTIDES IMMUNOGENES, CRIBLAGE, PRÉPARATION ET APPLICATIONS.

(57) Abstract: The invention concerns immunogenic glycopeptides derived from pathogenic micro-organisms, useful for vaccination and diagnosis of infections caused by said pathogenic micro-organisms (bacteria or fungi), and methods for selecting them and preparing them. Said glycopeptides are selected in the group consisting of: a1) glycopeptides essentially consisting of a glycosylated T epitope, comprising 14 to 25 amino acids, among which at least a neutral amino acid is bound to a di- or to a trisaccharide (glycoside linkage) and at least 15 % among said amino acids are proline, one of the proline being located in position -1 to -4, relative to the position of said neutral amino acid, which glycopeptides are: exhibited by a class II MHC molecule, specifically identified by T CD+4 lymphocytes induced by immunisation with the native glycopeptide from which they are derived, but are not identified by the T CD+4 lymphocytes induced by immunisation with a non-glycosylated peptide of same sequence and capable of inducing a proliferation of said T CD+4 lymphocytes by which they are identified and the secretion of cytokines by said lymphocytes and b1) glycopeptides having a sequence of 15 to 39 amino acids including the sequence of the glycopeptide as defined in a1), excluding the glycopeptide of sequence SEQ ID NO:11.

(57) Abrégé : Glycopeptides immunogènes issus de microorganismes pathogènes, utiles pour la vaccination et le diagnostic d'infections dues à de tels microorganismes pathogènes (bactéries ou champignons), ainsi que leurs procédés de sélection et de préparation. Lesdits glycopeptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par: a1) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 % d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides sont: présentés par une molécule de classe II du CMH, reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et b1) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a1), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11.

WO 02/050108 A3

WO 02/050108 A3



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

GLYCOPEPTIDES IMMUNOGENES, CRIBLAGE, PRÉPARATION ET APPLICATIONS

La présente invention est relative à des glycopeptides immunogènes issus de microorganismes pathogènes, utiles pour la vaccination et le diagnostic d'infections dues à de tels microorganismes pathogènes (bactéries ou champignons), ainsi qu'à leurs procédés de sélection et de préparation.

Les moyens mis en oeuvre pour prévenir et traiter ces infections comprennent d'une part le dépistage permettant le suivi et le traitement de l'infection et d'autre part la vaccination.

Ces moyens sont illustrés ci-après en prenant comme exemple l'une des plus graves infections en médecine humaine : l'infection par *M. tuberculosis*. En effet, 5 à 10 % des personnes infectées par *M. tuberculosis* ayant une réponse immunitaire normale développent une maladie grave (tuberculose) ; cette fréquence est encore plus élevée chez les personnes ayant un déficit de leur réponse immunitaire (infection par le VIH, traitement par des immunodépresseurs, etc...).

Diagnostic

Parmi les différentes techniques actuellement disponibles, on peut citer :

- l'obtention de cultures pures de *M. tuberculosis*, qui est le moyen le plus rigoureux de faire le diagnostic de certitude de la tuberculose. C'est une technique moyennement sensible qui permet le diagnostic pour les 2/3 des cas de tuberculose pulmonaire. Les résultats ne sont disponibles qu'après un délai minimum de 3-4 semaines, quelquefois seulement après 2 mois de culture. L'utilisation de techniques de culture employant des précurseurs marqués permet de raccourcir ces délais qui restent cependant importants. Cette mise en évidence de *M. tuberculosis* par culture nécessite un prélèvement contenant des bacilles, parfois difficile à obtenir même pour la tuberculose pulmonaire où environ 1/3 des cas ne reçoit pas de confirmation biologique. Quelquefois cet examen nécessite une intervention médicale spécialisée (ponction lombaire du liquide

céphalo-rachidien ou biopsie ganglionnaire) pour des formes extra-pulmonaires de la maladie.

- les techniques microbiologiques basées sur la génétique moléculaire (PCR) se heurtent à la même nécessité d'obtenir un prélèvement contenant des bactéries.

5 Par ailleurs, du fait de la présence dans le prélèvement d'inhibiteurs de la réaction PCR dont l'origine est impossible à contrôler, ces techniques sont parfois inutilisables. Leur validation en pratique courante n'a pas été obtenue.

- il n'existe pas à l'heure actuelle de sérodiagnostic qui possède une sensibilité et une spécificité compatibles avec un usage diagnostique.

10 - la réaction à la tuberculine montre qu'un sujet est sensibilisé, a été infecté par *M. tuberculosis* ou a été vacciné par le BCG. La tuberculine est en effet un mélange d'antigènes de *M. tuberculosis* et est donc incapable de faire la différence entre une infection par *M. tuberculosis* et la vaccination par le BCG, du fait de réactions croisées très nombreuses entre les antigènes du vaccin et *M. tuberculosis*. D'autre part,
15 cette réaction à la tuberculine ne permet pas de distinguer une tuberculose, maladie active, d'une infection par *M. tuberculosis*.

Vaccin

La vaccination par le BCG permet de contrôler l'infection primaire (multiplication initiale de *M. tuberculosis*) mais surtout la dissémination secondaire de
20 ces bacilles. Elle contribue vraisemblablement à diminuer l'incidence des infections latentes contre lesquelles aucun traitement efficace n'est disponible actuellement. Le BCG a été utilisé pour vacciner plus de 3 milliards d'individus contre la tuberculose, sans effets secondaires particuliers. Lors de la vaccination par le BCG il y a une multiplication locale de ces bacilles de virulence atténuée. Une immunité cellulaire est induite. Elle se
25 traduit par une hypersensibilité de type retardé (HSR) dirigée contre les protéines ou antigènes de mycobactéries (réaction à la tuberculine) et par une résistance accrue à l'infection par *M. tuberculosis*. Ces deux réponses immunitaires (sensibilisation de type

HSR et résistance accrue) ont pour supports des lymphocytes T réagissant avec des antigènes de mycobactéries.

Le BCG protège bien contre les formes aiguës de l'infection (méningite tuberculeuse de l'enfant, par exemple). Son efficacité est plus variable chez l'adulte.

5 L'existence d'une réactivité croisée entre le BCG et d'autres mycobactéries n'appartenant pas au complexe *tuberculosis* ainsi que l'absence, dans le génome de BCG, de certains antigènes immunogènes de *Mycobacterium tuberculosis* ou un profil d'expression différent de ces antigènes au cours de l'infection pourraient expliquer l'efficacité variable du BCG.

10 En outre, le BCG est une souche vivante de virulence atténuée. Celle-ci possède donc un pouvoir pathogène résiduel qui en interdit l'utilisation chez les individus immunodéprimés, notamment chez les sujets reconnus pour être infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Pour lutter plus efficacement contre ces infections, il serait judicieux de
15 disposer d'outils diagnostiques et de vaccins, notamment d'un vaccin "sous-unité", et donc sans danger, à base d'antigènes protecteurs des microorganismes pathogènes responsables de ces infections.

Un certain nombre d'études ont été faites dans ce sens afin de trouver la ou les molécules de ces microorganismes pathogènes, susceptible(s) d'induire une forte
20 réponse immunitaire protectrice. Ainsi, J. Hess *et al.* (C.R. Acad. Sci. Paris, 1999, 322 : 953-958) ont fait le point sur les propriétés que devraient avoir des antigènes aptes à être utilisés comme vaccin contre la tuberculose. Dans cette revue, ils soulignent l'importance d'utiliser une combinaison d'antigènes préalablement sélectionnés plutôt qu'un antigène unique. Ils recommandent notamment de sélectionner ces antigènes sur la
25 base de critères tels que la présence de zones hautement conservées parmi les différentes souches, les différences dans le profil d'expression des gènes des souches virulentes et des souches atténuées, la réactivité vis-à-vis des cellules effectrices de la réponse

immunitaire (lymphocytes B, T CD4⁺, T CD8⁺), la capacité de ces antigènes à se lier à une majorité de molécules HLA du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Certains de ces antigènes sont présents soit sous forme d'antigènes de surface, comme les mannoprotéines de *C. albicans* (Buurman et al., *PNAS*, 1998, 95,7670-7675), soit sous forme d'antigènes sécrétés, chez *M. tuberculosis* : MPT59 (30 kDa), 85A (32 kDa), MPT64 (23 kDa), hsp71 (71 kDa), MPT51 (24 kDa), MPT63 (16 kDa) et ESAT-6 (6 kDa), (Andersen, *Infect. Immun.*, 1994, 62, 2536-2544 ; Horwitz et al., *PNAS*, 1995, 92, 1530-1534). Ces antigènes de *M. tuberculosis* ont déjà été proposés comme des candidats potentiels d'une composition vaccinale car reconnus préférentiellement par des lymphocytes T CD4⁺ (Andersen, et al., précité; Horwitz et al., précité).

Il a également été proposé d'isoler, à partir des antigènes de *M. tuberculosis*, des peptides contenant des épitopes capables d'être présentés par une molécule de classe II du CMH et d'être reconnus par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques ; de tels épitopes ont notamment été rapportés pour deux protéines : ESAT-6 (Olsen et al., *Eur. J. Immunol.*, 2000, 30, 1724-1732) et MPT-39 (Mustafa et al., *Inf. Immunol.*, 2000, 68, 3933-3940).

Plusieurs observations ont été précédemment faites par les Inventeurs (Romain et al., *Inf. Immun.*, 1993, 61, 742-750 ; Romain et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 5322-5326) :

- seules les bactéries vivantes sont susceptibles d'induire une immunité protectrice, les bactéries tuées induisant aussi une réponse immunitaire, mais sans protection ;
- il existe dans le milieu de culture, des protéines libérées par les bactéries, au cours de leur croissance et susceptibles d'être reconnues par le système immunitaire d'animaux vaccinés avec des bactéries vivantes, protéines qui ne sont pas ou très peu reconnues après immunisation par des bactéries tuées.

Grâce à ce double critère de sélection, deux protéines nouvelles ont été purifiées. Une protéine sécrétée par *M. tuberculosis*, dénommée Apa, ou MPT-32 ou complexe antigénique de 45/47 kDa, est le produit du gène Rv1860 (Laqueyrie et al. Infect. Immun. 1995, 63: 4003-4010). La seconde molécule est un peptide interne d'une sérine protéase putative codée par le gène Rv1796.

En utilisant la protéine Apa native comme antigène, les Inventeurs ont précédemment montré que cette protéine, qui ne représente que 2 % des protéines sécrétées par les bacilles du groupe de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis* et BCG) en culture, est un antigène immunodominant, reconnu de façon très efficace par les lymphocytes T CD4+ spécifiques provenant d'animaux infectés par *M. tuberculosis* ou vaccinés par le BCG (Romain et al., *Inf Immun.*, 1999, 67, 5567-5572 ; Horn et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 32023-32030).

Dans ces mêmes travaux, les Inventeurs ont également montré que la mannosylation de l'Apa était essentielle pour l'activité antigénique de cette protéine :

- la démannosylation de l'Apa obtenue par traitement de l'Apa native par l' α -mannosidase ou par l'acide trifluorométhane sulfonique (TFMS) ou bien par expression de l'Apa chez une bactérie incapable de glycosyler (*E. coli*) s'accompagne d'une perte d'antigénicité d'un facteur 100,

- l'Apa glycosylée, produite par *Mycobacterium smegmatis* qui a une composition globale en mannose légèrement différente de celle de l'Apa produite par *M. tuberculosis* a une activité antigénique diminuée d'environ un facteur 10.

Par ailleurs, il a été rapporté que cette molécule Apa de *M. tuberculosis* contient 6 à 9 résidus mannoses liés par une liaison glycosidique de type α -(1,2) à 4 résidus thréonine (T₁₀, T₁₈, T₂₇ et T₂₇₇) de la façon suivante : un di-mannose (T₁₀ et T₁₈), un mannose (T₂₇), un mannose, un di-mannose ou un tri-mannose (T₂₇₇), (Dobos et al., *J. Bacteriol.*, 1996, 178, 2498-2506). Il faut noter que cette structure osidique qui contient des mono-, di- ou tri-mannoses ressemble à celle des mannoprotéines de levure, en

particulier de *Candida albicans*, et est différente de celle des protéines de *F. meningosepticum* qui possèdent des chaînes oligomannosiques plus longues.

La perte de l'antigénicité de l'Apa, observée après démannosylation, pourrait être due à une diminution de la phagocytose et de l'apprêtement de cet antigène ou bien de la reconnaissance de celui-ci par les lymphocytes T CD4+. En effet, le récepteur au mannose des macrophages et des cellules dendritiques qui se lie spécifiquement aux hexoses, notamment des mannoprotéines de *C. albicans*, et des mannolipides comme le lipoarabinomannane des mycobactéries, joue un rôle dans la phagocytose et l'apprêtement des antigènes qui sont présentés à la surface de ces cellules sous forme d'un complexe peptide-molécule de classe II du CMH. (Stahl et al., *Current Opinion in Immunology*, 1998, **10**, 50-55). Il a aussi été montré qu'un peptide mannosylé (au niveau de résidus lysine en position N-terminale) était phagocyté et apprêté par les cellules dendritiques, de façon beaucoup plus efficace qu'un peptide non-glycosylé de même séquence (Tan et al., *Eur. J. Immunol.*, 1997, **27**, 2426-2435).

Dans le modèle du lysozyme de la poule, il a été montré que des peptides analogues glycosylés d'un peptide constituant un épitope T de cet antigène étaient capables d'induire des lymphocytes T CD4+ reconnaissant spécifiquement cet épitope glycosylé (Deck et al., *J. Immunol.*, 1995, **155**, 1074-1078). Toutefois, dans la mesure où de tels épitopes T glycosylés reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ n'ont pas été identifiés dans des antigènes natifs issus de microorganismes pathogènes (bactérie-champignon), l'importance de la glycosylation dans la reconnaissance des antigènes de ces microorganismes pathogènes par les lymphocytes T CD4+ reste à démontrer.

En outre, et ce malgré les données relatives à l'Apa de *M. tuberculosis* et les connaissances générales sur la glycosylation des antigènes, il n'a pas été possible jusqu'à présent de préparer des antigènes issus des protéines O-glycosylées de ces microorganismes pathogènes, aptes à être effectivement utilisables dans une composition immunogène ou vaccinale et/ou dans un test de diagnostic.

En effet :

- les protéines actives qui ne représentent qu'un faible pourcentage des protéines produites par ces microorganismes sont purifiées avec des rendements très faibles, par des procédés qui sont dangereux, du fait de la manipulation de grandes quantités de ces agents pathogènes,
- les protéines, produites dans des systèmes d'expression hétérologues (cellules eucaryotes ou bactéries incapables de glycosyler), ont une activité antigénique faible,
- les protéines produites dans des systèmes d'expression homologue comme *M. smegmatis* ont une activité antigénique acceptable mais elles sont produites en quantités insuffisantes par des procédés complexes.

En conséquence, les Inventeurs se sont donnés pour but de préparer des antigènes immunodominants, aptes à induire une réponse immunitaire protectrice humorale et/ou cellulaire, qui, d'une part, administrés seuls ou en combinaison avec d'autres antigènes, pourraient constituer un vaccin utilisable chez tous les individus, y compris les sujets immunodéprimés (disparition du risque lié à l'utilisation d'un vaccin vivant) et d'autre part pourraient être utilisés à des fins diagnostiques.

Ils ont trouvé que certains glycopeptides issus de microorganismes pathogènes synthétisant des glycoprotéines (et notamment les mycobactéries) présentent une activité antigénique au moins égale sinon supérieure à celle de la protéine native déglycosylée ou de la protéine recombinante produite dans *E. coli*.

C'est également un but de l'invention de développer des moyens simples à mettre en œuvre pour la production de ces glycopeptides en grandes quantités.

La présente invention a pour objet des glycopeptides immunogènes sélectionnés dans le groupe constitué par :

- a₁) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 %

d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides, issus d'un microorganisme pathogène sont :

- présentés par une molécule de classe II du CMH,
- 5 - reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et
- capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par
- 10 lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et

b₁) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a₁), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11, issu de l'Apa qui est décrit par Dobos et al. (*J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 2498-2506).

- 15 Ces glycopeptides constitués essentiellement par un épitope T glycosylé sont reconnus par des lymphocytes T CD4+ par l'intermédiaire de cet épitope T glycosylé. En effet, après immunisation avec des bacilles vivants du groupe de la tuberculose, les lymphocytes T spécifiques de ces glycopeptides sont beaucoup plus nombreux que les lymphocytes T spécifiques des peptides non glycosylés de même
- 20 séquence.

De manière avantageuse, lesdits glycopeptides ont une activité antigénique au moins 10 fois supérieure, de préférence au moins 30 fois supérieure, à celle d'un peptide témoin de même séquence.

Lesdits glycopeptides présentent les avantages suivants :

- 25 - induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire protectrice et éventuellement d'une réponse humorale, et utilisation possible comme antigènes chez les sujets immunodéprimés.

- activité antigénique au moins égale sinon supérieure aux antigènes classiques (culture desdits microorganismes vivants atténués, mélanges d'antigènes préparés à partir desdites cultures ou peptides non glycosylés) car ils sont reconnus par un nombre plus important de lymphocytes T spécifiques du microorganisme pathogène,

5 - spécificité très étroite, qui permet à la fois d'éliminer les problèmes de réactivités croisées avec d'autres microorganismes, notamment avec d'autres mycobactéries atypiques, et d'augmenter l'efficacité de la vaccination et du diagnostic des microorganismes pathogènes ; en effet, ils sont plus spécifiques étant donné que leurs résidus oligosaccharidiques, présents exclusivement dans lesdits microorganismes
10 pathogènes, participent de façon cruciale à la définition de l'épitope T reconnu par les lymphocytes T CD4⁺ ; ils constituent ainsi des antigènes spécifiques pour la vaccination et le diagnostic des infections par des organismes pathogènes aptes à O-glycosyler certaines de leurs protéines (bacilles du complexe de la tuberculose, *Flavobacterium meningosepti-*
cum, *Candida albicans...*),

15 - utilisation chez les sujets immunodéprimés car ils sont totalement apathogènes,

- production possible en grandes quantités,

- meilleure standardisation des doses actives et de l'efficacité du vaccin,

- facilités de stockage et d'utilisation,

20 Selon un mode de réalisation avantageux desdits glycopeptides, lesdits acides aminés neutres sont sélectionnés dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits glycopeptides contiennent de 1 à 7 résidus thréonine, liés à un di- ou à un trisaccharide.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux desdits glycopeptides, ledit di- ou tri-saccharide est un dimère ou un trimère d'hexose, de préférence un mannose.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux desdits glycopeptides, ladite liaison glycosidique est une liaison α -(1,2).

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux, lesdits glycopeptides sont issus d'un microorganisme pathogène apte à O-glycosyler des protéines, de préférence *Mycobacterium tuberculosis* ou *Candida albicans*.

Conformément à l'invention, lesdits glycopeptides sont, de préférence, issus :

- de la protéine Apa de *M. tuberculosis* (Genbank numéro X80268) ou
- de la protéine Rv1796 codée par le gène *Rv 1796*, en référence à l'annotation de la séquence du génome de *M. tuberculosis* de souche H37Rv (Banque Sanger).

De préférence, ledit glycopeptide est sélectionné dans le groupe constitué par :

- un glycopeptide de 39 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:1) est celle qui s'étend des positions 1 à 39 de la séquence de la protéine Apa et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 10, 18 et 27 de la SEQ ID NO:1 est lié à un di- ou trisaccharide par une liaison glycosidique,
- un glycopeptide de 26 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:2) est celle qui s'étend des positions 261 à 286 de la séquence de la protéine Apa (séquence C-terminale) et dans laquelle le résidu thréonine en position 17 de la SEQ ID NO:2 est lié à un di- ou tri-saccharide par une liaison glycosidique, et
- un glycopeptide de 35 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:3) est celle qui s'étend des positions 169 à 203 de la séquence de la protéine Rv 1796 et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 4, 5, 7, 13, 15, 23 et 25 de la SEQ ID NO:3 est lié à un di- ou trisaccharide par une liaison glycosidique.

L'invention a également pour objet un procédé de synthèse d'un glycopeptide tel que défini précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- préparation, en solution, d'acides aminés neutres glycosylés, liés à un di- ou à un trisaccharide par une liaison glycosidique,

- synthèse, sur support solide, du glycopeptide à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de la séquence peptidique dudit glycopeptide et des
5 acides aminés neutres glycosylés, obtenus précédemment, et

- coupure du glycopeptide du support solide.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre,
10 lorsque lesdits glycopeptides présentent les séquences suivantes (**T** représente une thréonine O-glycosylée, fonctionnalisée par 2 ou 3 résidus glycosidiques et Ac représente une fonction acétate) :

SEQ ID NO:1 :

H₂N-DPEPAPPVPTTAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPAAANT-CONH₂

15 SEQ ID NO:2 :

AcNH-PAPAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA-COOH

SEQ ID NO:3 :

AcNH-TIPTTETPPPPQTVTLSPVPPQTVTVIPAPPPEEG-CONH₂,

ledit procédé comprend les étapes suivantes :

20 i) préparation, en solution, de thréonines O-glycosylées fonctionnalisées par 2 ou 3 résidus glycosidiques,

ii) synthèse, sur support solide, des peptides correspondant aux séquences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 sus-mentionnées, à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de ces séquences et des thréonines O-glycosylées
25 obtenues lors de l'étape i),

iii) coupure des peptides du support solide, et

iv) introduction, par synthèse chimique, d'une fonction amide au niveau de l'extrémité C-terminale des peptides SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:3, et d'une fonction acétate au niveau de l'extrémité N-terminale des peptides SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

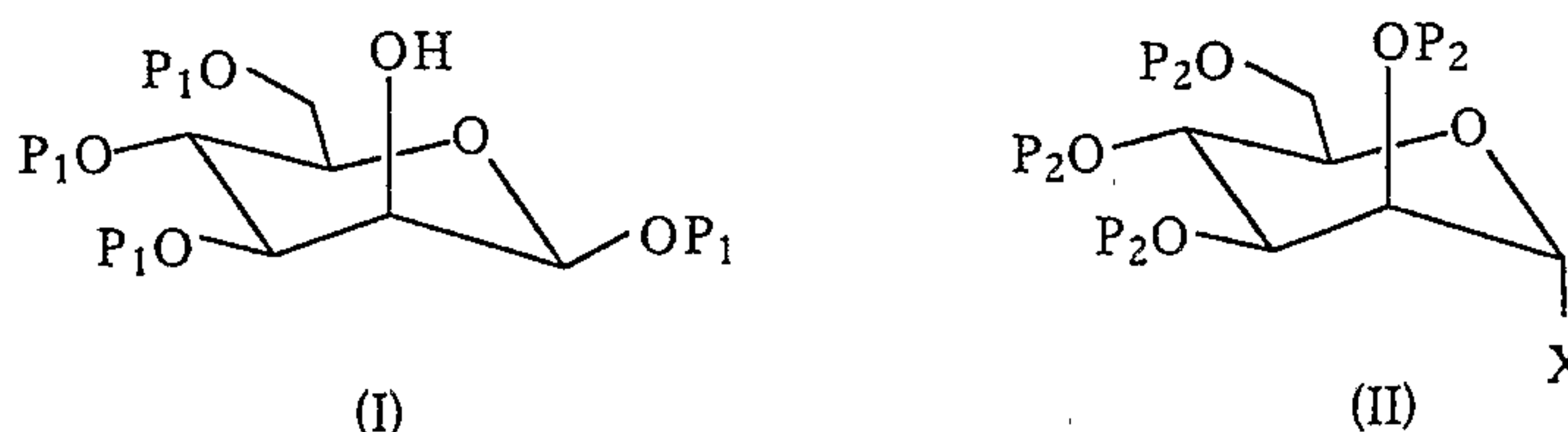
La synthèse des peptides SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 correspond donc à une synthèse peptidique classique en phase solide, au cours de laquelle sont introduits des acides aminés glycosylés. Comme connu dans le domaine de la synthèse peptidique en phase solide, les acides aminés utilisés sont convenablement protégés et, si nécessaire, activés avant d'être incorporés l'un après l'autre dans la séquence peptidique. De même, les hydroxyles présents au niveau des résidus glycosidiques portés par les thréonines doivent être convenablement protégés au cours de la synthèse peptidique.

Une fois la synthèse peptidique effectuée, les peptides sont séparés du support solide et déprotégés. Ils peuvent être purifiés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les résidus glycosidiques portés par les thréonines O-glycosylées préparées lors de l'étape i) sont des hexoses, de préférence des mannoses, les résidus mannose étant avantageusement reliés entre eux par des liaisons α -(1,2).

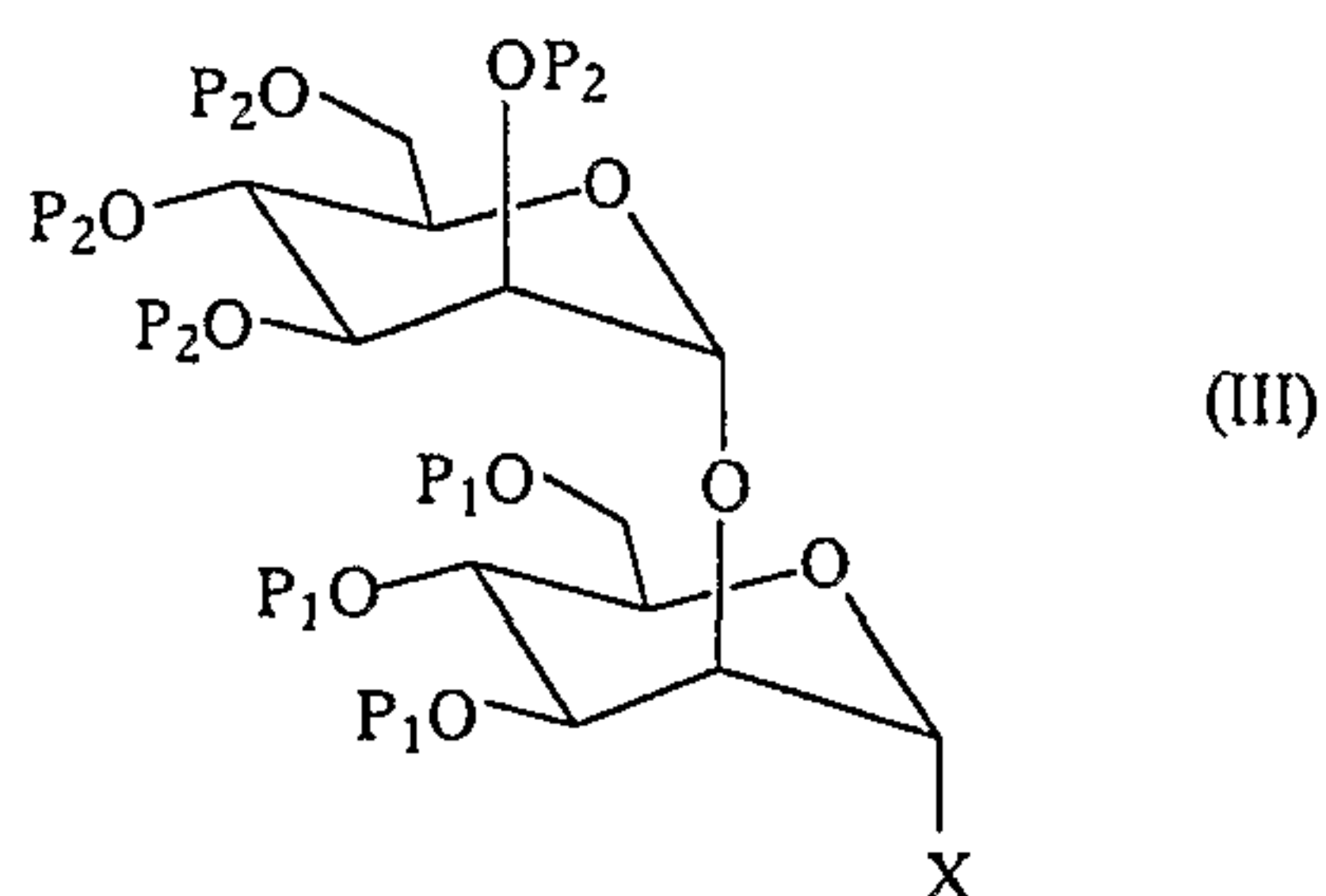
Selon une modalité avantageuse de cette disposition, les thréonines fonctionnalisées par des résidus mannose sont préparées comme suit :

a₂) préparation de dérivés du mannose de formules (I) et (II) :



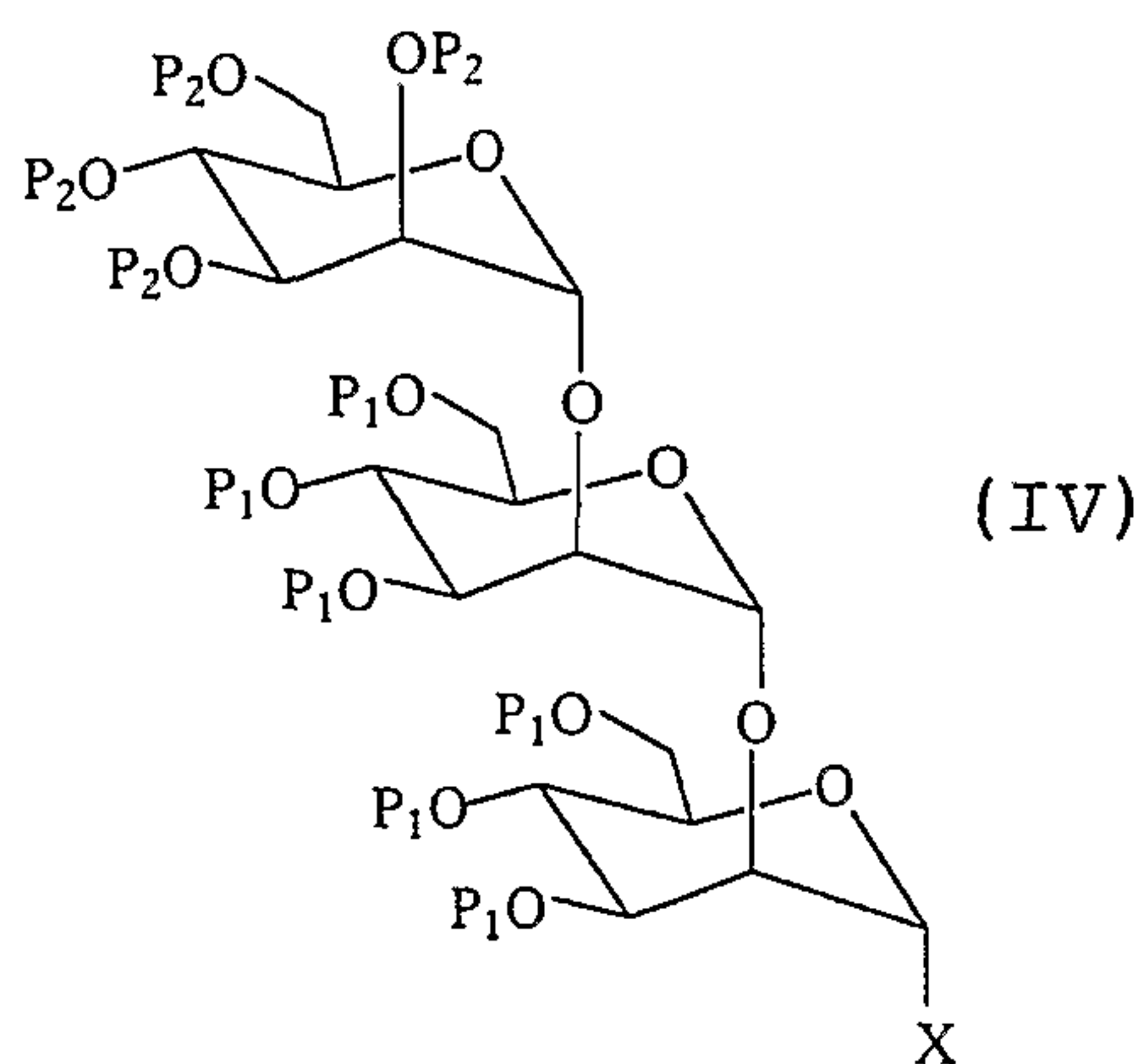
dans lesquelles P_1 et P_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent des groupes protecteurs d'une fonction hydroxyle, et X représente une fonction activée, telle qu'un atome de brome,

- b₂) réaction du dérivé de formule (I) avec le dérivé de formule (II), puis
 5 activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant deux résidus mannose et répondant à la formule (III) :



- 10 dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II),

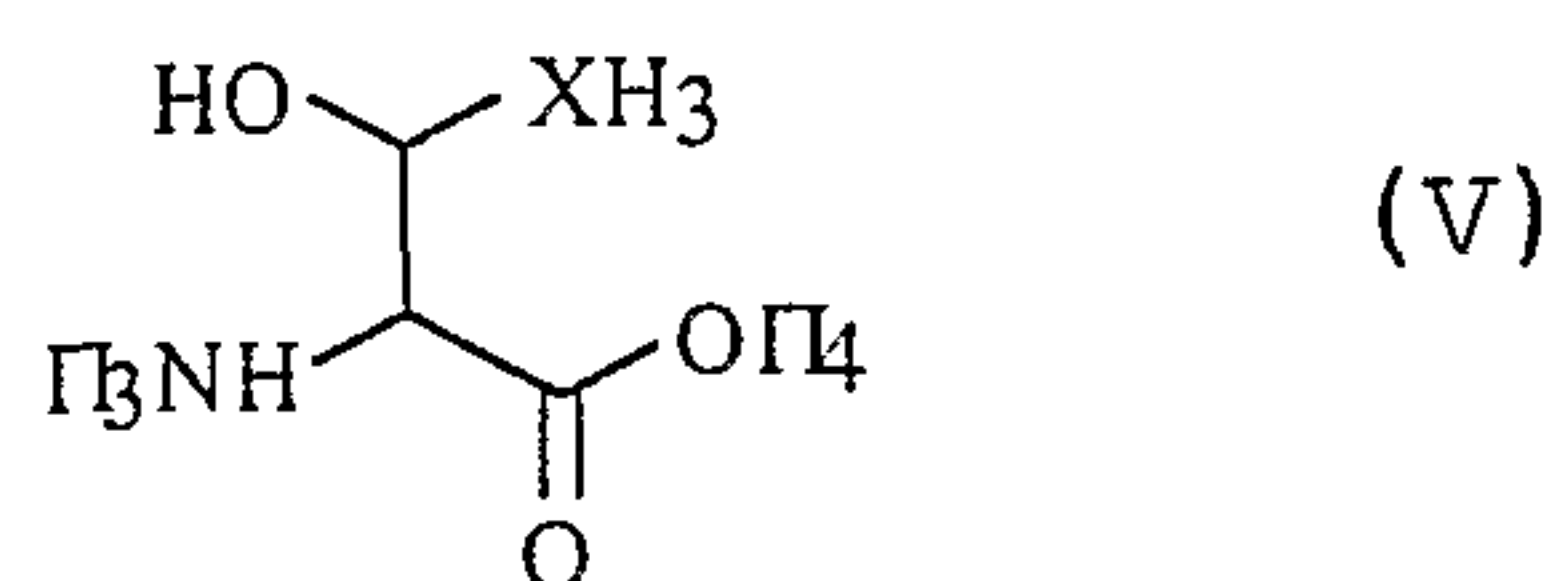
- c₂) éventuellement, réaction du composé de formule (III) avec un dérivé du mannose de formule (I) telle que définie en a₂), puis activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant trois résidus mannose et répondant
 15 à la formule (IV) :



dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II), et

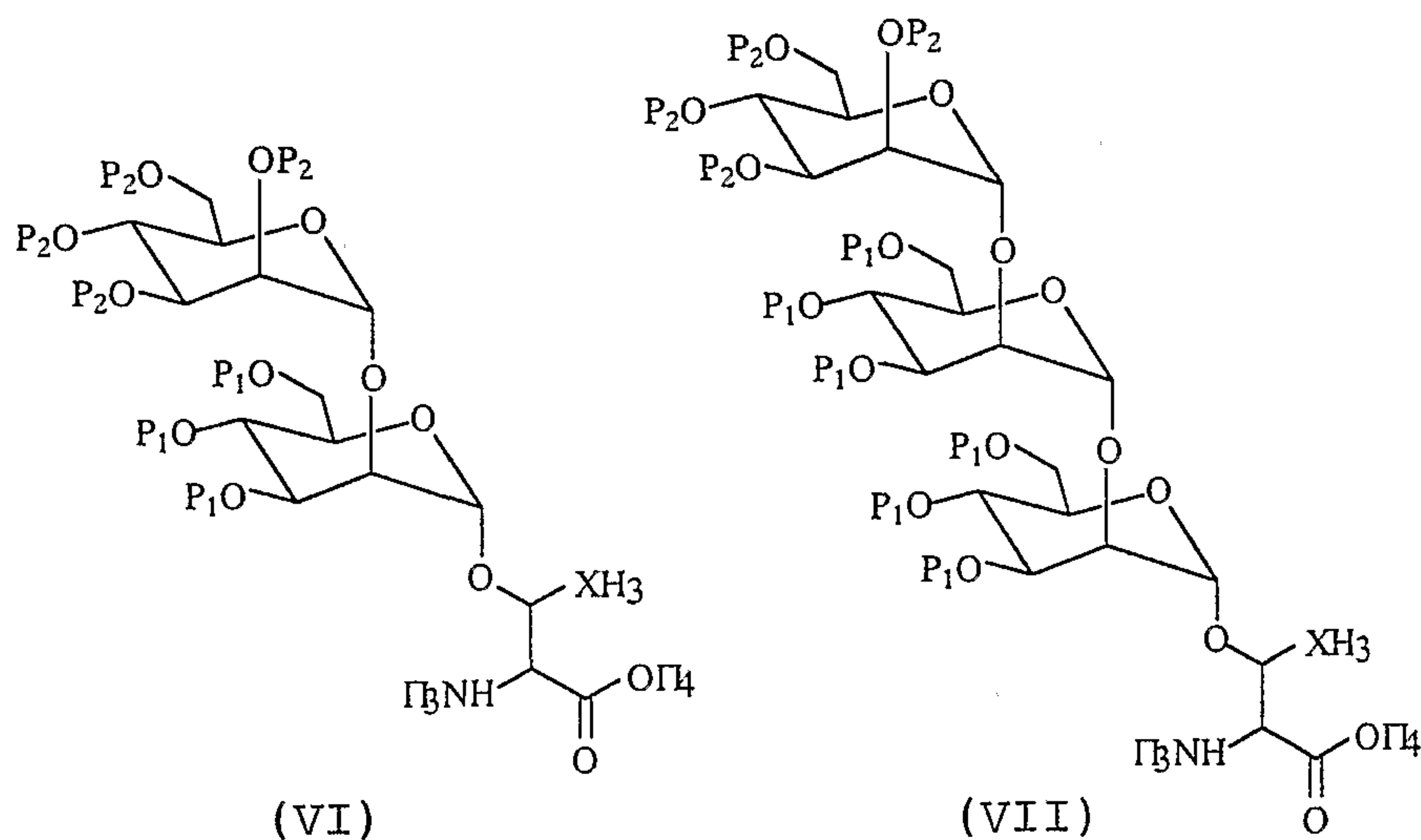
d₂) condensation du composé de formule (III) ou du composé de formule (IV) avec une thréonine convenablement protégée de formule (V) :

5



dans laquelle P_3 représente un groupe protecteur d'une fonction amine primaire et P_4 représente un groupe protecteur d'une fonction hydroxyle,

10 conduisant respectivement à l'obtention d'une thréonine glycosylée de formule (VI) ou (VII) :



15

dans lesquelles P_1 , P_2 , P_3 et P_4 sont tels que définis précédemment.

Les groupes protecteurs P_1 , P_2 , P_3 et P_4 peuvent être choisis parmi ceux décrits dans l'ouvrage *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. GREENE et P.G.M. WUTS, Seconde Edition, 1991, J. WILEY and Sons. A titre d'exemples et de façon

non-limitative, P_1 et P_2 peuvent représenter des groupes acétyle ou benzoyle, P_3 peut représenter un groupe Fmoc (fluorène-9-yl-méthoxycarbonyl) et P_4 peut représenter un groupe pentafluorophényle.

La présente invention a également pour objet un procédé de sélection et de criblage de glycopeptides immunogènes à partir de la séquence peptidique des protéines d'un microorganisme pathogène, qui peut avantageusement être mis en œuvre de façon concomitante au procédé de synthèse des glycopeptides conformes à l'invention, tel que défini ci-dessus, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a₃) recherche et sélection dans la séquence peptidique des dites protéines d'au moins une séquence de 14 à 25 acides aminés, contenant au moins un acide aminé neutre lié à un di- ou un trisaccharide et au moins 15% de proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre,

b₃) préparation du/des glycopeptide(s) sélectionné(s) à l'étape a₃), conformément au procédé de synthèse défini ci-dessus, et

c₃) sélection des glycopeptides dont l'activité antigénique est au moins 10 fois supérieure, de préférence au moins 30 fois supérieure à celle d'un peptide témoin de même séquence.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé de criblage, préalablement à l'étape a₃), il comprend une étape de présélection d'au moins une glycoprotéine antigénique.

Selon encore un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé de criblage, à l'étape c₃), l'activité antigénique dudit glycopeptide est évaluée par mesure de l'activation des lymphocytes T CD4+ d'animaux immunisés par ledit microorganisme pathogène atténué ou par une fraction antigénique dudit microorganisme pathogène.

L'activation des lymphocytes T peut-être mise en évidence par des techniques classiques d'immunologie telle que celles décrites dans *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). A

titre d'exemple on peut citer les tests de prolifération lymphocytaire, les dosages des cytokines (protéine ou ARNm) synthétisées par des lymphocytes T CD4+ activés (immunoessai (ELISA) ou réaction de polymérisation en chaîne de type RT-PCR) ou, dans le cas de *M. tuberculosis*, les tests d'hypersensibilité de type retardé.

5 La présente invention englobe également les glycopeptides susceptibles d'être obtenus par le procédé de sélection et de criblage tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un glycopeptide conforme à l'invention ou d'un glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11, pour la préparation d'une composition immunogène ou vaccinale ou d'un réactif de
10 diagnostic.

Les glycopeptides selon l'invention qui détectent de façon très spécifique l'immunité cellulaire et/ou humorale induite par l'infection par un microorganisme pathogène, en particulier *M. tuberculosis*, peuvent avantageusement être utilisés pour le diagnostic de la tuberculose par toute technique permettant la détection de
15 l'immunité cellulaire, cette technique étant en elle-même connue de l'homme du métier. A titre d'exemple, on peut citer les tests de prolifération de lymphocytes T et les dosages immunoenzymatiques de cytokines spécifiques des lymphocytes T CD4+, notamment l'INF- γ .

La présente invention a également pour objet une composition
20 immunogène apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide tel que défini ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Du fait de la coopération entre les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ ou les lymphocytes B dans la mise en place d'une réponse
25 immunitaire humorale ou cellulaire, les glycopeptides de l'invention peuvent avantageusement être utilisés comme protéine de transport (« *carrier* ») de tout autre antigène vaccinal pour augmenter l'efficacité de l'immunisation contre ledit antigène.

Cette association antigène-carrier permet avantageusement de faciliter la sélection et l'amplification des lymphocytes B et T spécifiques de l'antigène vaccinal.

La présente invention a également pour objet une composition vaccinale apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle
5 comprend au moins un glycopeptide tel que défini ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et éventuellement à au moins un adjuvant.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites compositions immunogène ou vaccinale, ledit glycopeptide est associé à une protéine ou un fragment de protéine comprenant au moins un épitope B, un épitope T de type CD4+ ou un épitope T
10 de type CD8+.

Au sens de la présente invention, on entend par épitope B, épitope T de type CD4⁺ et épitope T de type CD8⁺ relativement à la séquence d'une protéine ; le fragment de cette séquence qui est capable de se lier respectivement à un anticorps, à un récepteur T de lymphocytes CD4⁺ et à un récepteur T de lymphocytes CD8⁺.

15 Au sens de la présente invention on entend par association du glycopeptide à une protéine aussi bien le mélange que le couplage par tout moyen physique ou chimique, par exemple l'expression d'une fusion entre la séquence du glycopeptide et celle de la protéine ou du fragment de protéine.

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés ;
20 avantageusement, ils sont choisis dans le groupe constitué par l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

Ledit glycopeptide peut éventuellement être associé à tout autre moyen, en lui-même connu de l'homme du métier, permettant d'augmenter l'immunogénicité d'un peptide. A titre d'exemple on peut citer le couplage à un peptide porteur qui permet
25 l'obtention d'un peptide multimérisé ramifié, tel que celui décrit par Wilkinson et al., 1999, *Eur. J. Immunol.*, 29, 2788-2796.

La présente invention a également pour objet des anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre l'un ou plusieurs des glycopeptides selon la présente invention.

Selon un mode de réalisation avantageux desdits anticorps, ils sont
5 sélectionnés parmi les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux.

La présente invention a en outre pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les glycopeptides et les anticorps selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection
10 d'une infection par un microorganisme pathogène, caractérisé en qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon biologique d'un patient susceptible d'être infecté par ledit microorganisme pathogène, avec un réactif de diagnostic tel que défini ci-dessus (anticorps ou glycopeptides, selon le cas) et la détection de la formation d'un complexe anticorps et microorganisme présent dans l'échantillon biologique ou glycopeptide(s) et
15 anticorps présents dans l'échantillon.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, laquelle se réfère à des exemples de mise en œuvre de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

20 - la figure 1 illustre la mesure par un test d'hypersensibilité de type retardé, de l'activité antigénique de l'Apa native purifiée de *M. tuberculosis*, en fonction de la cinétique de digestion de la protéine Apa par l' α -mannosidase. Les résultats sont exprimés en unités de tuberculine par mg de protéine en fonction du temps en heures,

- la figure 2 illustre l'analyse par spectrométrie de masse de la composi-
25 tion en mannose des molécules d'Apa, en fonction de la cinétique de digestion de la protéine Apa par l' α -mannosidase. Le nombre de résidus mannose correspondant à chaque pic de la protéine Apa est indiqué et l'activité antigénique globale du produit de la digestion de l'Apa est indiquée aux différents temps étudiés,

- la figure 3 illustre la mesure par un test d'hypersensibilité de type retardé, de l'activité antigénique d'un glycopeptide, dénommé Lip, issu de la protéine Rv 1796 (SEQ ID NO:3). Les protéines standard purifiées de *M. tuberculosis* (PPD) sont utilisées comme témoin positif à la dose de 0,25 µg dans 0,1 ml. Le peptide Lip est utilisé
5 à la dose de 0,02 µg dans 0,1 ml. Les peptides Lip traités par l'α-mannosidase ou la subtilisine sont négatifs aux mêmes doses. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la réaction d'érythème,

- la figure 4 illustre l'activité antigénique du peptide Lip par un test *in vitro* de prolifération lymphocytaire. La reconnaissance par les lymphocytes T du peptide
10 Lip glycosylé (Lip natif) est comparée à celle du peptide déglycosylé (Lip + α-mannosidase) ou du peptide Lip associé à un anticorps anti-récepteur CD4+ des lymphocytes T (Lip + anti Cd4),

- la figure 5 illustre la mesure par un test d'hypersensibilité de type retardé de l'activité antigénique de l'Apa native purifiée de *M. tuberculosis* (Apa native)
15 ou de l'Apa recombinante déglycosylée produite dans *E. coli* (rApa *E. coli*), en fonction de l'immunisation des cobayes. Ceux-ci ont été immunisés au préalable par le BCG vivant injecté en intradermique ou par les plasmides pAG831 ou pAG832, contenant la séquence codante de l'Apa, placée sous le contrôle du promoteur précoce du cytomégalovirus. L'immunisation des cobayes par les plasmides conduit à une
20 sensibilisation pouvant être révélée par une réaction d'hypersensibilité de type retardé. Les deux types d'antigènes sont équivalents pour engendrer cette réaction, alors qu'après une immunisation par le BCG, seule l'Apa native glycosylée est antigénique.

- la figure 6 représente la préparation d'unités comportant deux ou trois résidus mannose reliés par des liaisons α-(1,2), et

25 - la figure 7 (7a et 7b) représente la préparation de thréonines fonctionnalisées par deux ou trois unités de mannose.

EXEMPLE 1 : Importance du nombre de résidus oligosaccharidiques dans l'antigénicité de la protéine Apa.

1. Matériels et méthodes

a) Déglycosylation ménagée de l'Apa par digestion à l' α -mannosidase

5 450 μ g de protéine Apa purifiée à partir du surnageant de culture de *M. tuberculosis*, selon le protocole décrit par Horn et al., précité sont dilués dans un volume de 450 μ l de tampon A (100 mM $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$, 2 mM ZnCl_2).

 Au temps initial, 75 μ l de la solution de protéine Apa sont prélevés, dilués dans 25 μ l de tampon A et congelés comme témoin. 125 μ l d' α -mannosidase à
10 1 mg/ml (3 UI/ml, Oxford Glycosciences) sont ensuite ajoutés au 375 μ l de la solution d'Apa et le volume réactionnel de 500 μ l est incubé à 37°C. Après 30 min, 1 h, 4 h, 16 h et 24 h, 100 μ l de la réaction sont prélevés et congelés à -20°C.

b) Purification des produits de digestion

 Les échantillons de 100 μ l sont chauffés 2 min à 90°C puis ils sont
15 refroidis brusquement, séchés par le vide et remis en suspension dans 300 μ l d'acide tri-fluoro-acétique à 0,1% dans l'eau (solution B).

 Les produits de digestion de l'Apa sont séparés de l' α -mannosidase sur une colonne de chromatographie en phase inverse (Ressource RPC, Pharmacia), par un gradient de 0 à 90 % d'acétonitrile dans la solution B, en 90 min. L'Apa est éluée de la
20 colonne au temps $t = 68$ min, correspondant à $51,5\% \pm 0,5\%$ d'acétonitrile. Les fractions correspondant à l'Apa sont collectées, lyophilisées, remises en suspension dans une solution de butanol à 5% dans l'eau (solution C), puis séchées sous vide. Les échantillons purifiés sont alors remis en suspension dans 100 μ l de solution C.

c) Analyse biochimique des produits de digestion de l'Apa

25 La composition oligosaccharidique de chaque échantillon est analysée par spectrométrie de masse, dans les conditions décrites dans Horn et al., précité.

 Une mesure de l'absorption à 210 nm est effectuée afin d'évaluer la quantité relative de protéine présente dans chaque échantillon.

Ensuite, les échantillons sont séchés et leur concentration est ajustée à 1 mg/ml dans un tampon de titrage (tampon D : PBS, 0,9% NaCl, 0,05% Tween 80).

d) Titration biologique de l'activité antigénique des produits de digestion ménagée de l'Apa par l' α -mannosidase dans un test d'hypersensibilité de type retardé

5 L'activité antigénique est mesurée par un test d'hypersensibilité de type retardé sur des cobayes immunisés 3 mois auparavant par une injection intradermique de 2 mg de BCG vivant en 2 points d'injection.

Chaque échantillon est dilué à une concentration de 2 μ g/ml dans le tampon D et 100 μ l de cette dilution (0,2 μ g) sont injectés par voie intradermique à des
10 lots de 2 cobayes préalablement immunisés.

Les différents lots d'animaux sont les suivants :

- lot 1 : témoin négatif ayant reçu 100 μ l de tampon D
- lot 2 : Apa t=0
- lot 3 : Apa t=30 min
- 15 • lot 4 : Apa t=1h
- lot 5 : Apa t= 4h
- lot 6 Apa t= 16 h
- lot 7 Apa t= 24h
- lot 8 : témoin positif (0,25 μ g de protéines standard purifiées de
20 *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) correspondant à 10 unités de tuberculine (UT).

24 h après l'injection, la moyenne du diamètre de la réaction d'érythème est mesurée pour les différents lots d'animaux et le titre en tuberculine des échantillons est déterminé par rapport au standard PPD.

2. Résultats

25 Les résultats sont illustrés par les figures 1 et 2.

L'analyse de l'activité antigénique de l'Apa en fonction de la cinétique de digestion par l' α -mannosidase (figure 1) montre que l'activité antigénique de l'Apa est

progressivement perdue au cours de la digestion par l' α -mannosidase : 66% en 1 h, 86% en 4 h et 97 à 99% pour les digestions plus longues.

L'analyse de la composition en mannose des produits obtenus aux différents temps de digestion (figure 2) montre que :

- 5
- les molécules d'Apa natives possèdent 6 à 8 résidus mannose, et
 - les molécules d'Apa sur lesquelles persistent 3 à 6 résidus mannose perdent 86 % de leur activité antigénique.

Il a été montré que la composition en oligomannose de l'Apa est la suivante : un di-mannose (T_{10} et T_{18}), un mannose (T_{27}), un mannose, un di-mannose ou un
10 tri-mannose (T_{277}), Dobos et al., précité. En outre, l' α -mannosidase est une exomannosidase.

Par conséquent, les résultats indiquent que :

- la perte de 1 ou 2 des mannoses terminaux des 4 chaînes oligomannose de l'Apa entraîne une perte drastique de l'activité antigénique, et
- 15 • l'antigénicité de l'Apa est liée à la présence d'un di- ou d'un tri- mannose sur un ou plusieurs des résidus thréonine glycosylés.

EXEMPLE 2 : Mise en évidence du glycopeptide Lip de *M. tuberculosis*.

1. Matériels et méthodes

a) Purification du glycopeptide

20 **a1) Préparation du matériel brut**

Des bactéries de la souche de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) sont cultivées durant 20 jours sur un milieu synthétique de Sauton (Milieux de culture, H. Cassagne, 1961, Ed. Institut Pasteur, Tome 2, page 242). Les molécules sécrétées dans le milieu sont concentrées sur une membrane d'ultrafiltration (PM10, AMICON) de façon
25 à ne retenir que les molécules de masse moléculaire supérieure à 10 000 Da, puis elles sont lyophilisées. Il est obtenu environ 10 g de lyophilisat pour 60 litres de milieu de culture.

a2) Filtration moléculaire (étape 1)

Une colonne préparative est chargée avec la matrice Sup75 prepgrade Pharmacia. Cette colonne de 50x750 mm est équilibrée avec un tampon phosphate (50 mM $\text{PO}_4\text{Na}_2/\text{K}$, pH 7,1 ; 100 mM NaCl ; 4 % butanol) à un débit de 1 ml/min. Le matériel
5 brut précédent est repris dans le tampon d'équilibre à une concentration finale de 10 g pour 100 ml, clarifié par centrifugation à 43 000 g, durant 4h puis par filtration sur filtre 0,22 μm . Des injections de 13 ml sont effectuées et les différentes fractions détectées par leur absorbance à 280 nm sont concentrées sur membrane PM10 puis lyophilisées.

La fraction éluée entre 700 et 800 ml est très antigénique : on observe
10 une hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par du BCG vivant ; cette fraction est par contre peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

a3) Echange d'ions (étape 2)

Une colonne préparative Source 15Q Pharmacia (15 μm) de 24x250 mm
15 est équilibrée avec un tampon 20 mM Tris/HCl, pH 8, 4 % butanol, à un débit de 5 ml/min avec une pression maximale de 8 bars. Un gradient linéaire de NaCl de 0 à 150 mM dans le même tampon est appliqué après injection de 500 mg de la fraction précédente dissoute dans 10 ml du tampon initial. Les fractions éluées sont détectées par absorption à 280 nm, concentrées sur membrane PM10 puis lyophilisées.

La fraction éluée, entre 40 et 75 mM de NaCl est très antigénique : on
20 observe une hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par du BCG vivant ; cette fraction est par contre peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

a4) Phase inverse sur colonne C8 (étape 3)

Une colonne RPC (Reversed Phase Column) Resource 15RPC de
25 4,6x100 mm Pharmacia est équilibrée par un tampon 20 mM $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$, pH 6,5, à un débit de 1 ml/min. Un gradient non linéaire d'acétonitrile, compris entre 0 et 90 %, est appliqué après l'injection sur la colonne de 10 mg dans 2 ml de tampon de la fraction

précédente. Les fractions éluées sont détectées à 280 nm puis concentrées sous vide à 40°C avant d'être lyophilisées.

La fraction éluée entre les concentrations 18 et 22 % d'acétonitrile est très antigénique pour révéler une hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

a5) Phase inverse sur colonne C18 (étape 4)

Une colonne microbore phase inverse C18 (Browlec lab. 1x250 mm) est équilibrée par un tampon 20 mM CH₃COO⁻NH₄⁺, pH 6,5, à un débit de 1 ml/min. Un gradient non linéaire d'acétonitrile de 0 à 90 % est appliqué après injection sur la colonne de la fraction précédente.

Une fraction détectée seulement à 220 nm est éluée par une concentration d'environ 11 % d'acétonitrile. Cette fraction (3 mg) est très active pour révéler les réactions d'hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par des bactéries vivantes et peu active chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

b) Analyse biochimique du glycopeptide purifié

La fraction obtenue à l'étape finale de purification a été séquencée par une technique d'Edman modifiée (Applied Biosystems 473A), selon les instructions du fabricant.

La composition de chaque échantillon est analysée par spectrométrie de masse (spectromètre MALDI-TOF), dans les conditions décrites dans Horn et al., précité.

c) Digestion du glycopeptide par l' α -mannosidase.

9 μ g du glycopeptide purifié ci-dessus sont dissous dans 65 μ g de tampon 100 mM CH₃COO⁻Na⁺, pH 5 puis 3 μ l d'une solution à 1 mg/ml d' α -mannosidase (Oxford Glyco System), soit 90 mU d' α -mannosidase, sont ajoutés. La réaction est incubée 24h à 37°C de façon à obtenir une digestion totale, puis le produit obtenu est séché sous vide.

d) Digestion du peptide par la subtilisine

690 ng du glycopeptide purifié ci-dessus sont dissous dans 5 µl de tampon 100 mM carbonate d'ammonium, pH 8, puis 1 µl d'une solution de subtilisine à 100 µg/ml soit environ 100 ng est ajouté. La réaction est incubée 24h à 37°C puis le produit de la réaction est séché sous vide et repris dans le tampon de titrage (tampon D).

e) Titration biologique de l'activité antigénique du glycopeptide par un test d'hypersensibilité de type retardé

0,02 µg du glycopeptide purifié ci-dessus, non-digéré ou digéré par l'α-mannosidase ou la subtilisine sont injectés à des lots de cobayes préalablement immunisés, selon le protocole décrit à l'exemple 1. Les résultats sont exprimés par la valeur du diamètre de la réaction d'érythème. Le témoin est constitué par 0,25 µg de PPD correspondant à 10 UT.

f) Mesure de l'activité antigénique du glycopeptide par un test *in vitro* de prolifération lymphocytaire.

Les conditions du test sont celles décrites dans Horn et al., précité.

2. Résultats

a) Purification et analyse biochimique du glycopeptide Lip

La mesure de masse effectuée sur le glycopeptide purifié indique la présence de molécules complexes, vraisemblablement glycosylées par des mannoses étant donné la présence de mesures différant d'une valeur de 162 unités de masse. Une masse de 6951 Da qui correspond à la masse du peptide traité à l'α-mannosidase est retenue comme la masse minimale de ces molécules.

La séquence N-terminale du glycopeptide purifié indique la présence d'une séquence majoritaire TIPTT... et d'une séquence minoritaire IPTTE....

Ces résultats sont compatibles avec un glycopeptide mannosylé, dénommé Lip dont la séquence (SEQ ID NO:3) est celle d'un fragment N-terminal d'un peptide issu de la protéine codée par le gène Rv1796 de *M. tuberculosis* qui s'étend des

positions 169 à 239 de ladite protéine, en référence à l'annotation de la séquence du génome de *M. tuberculosis* de souche H37Rv de la banque de Sanger.

b) Mesure de l'activité antigénique du glycopeptide Lip par un test d'hypersensibilité de type retardé

5 Le glycopeptide est très actif pour révéler les réactions d'hypersensibilité de type retardé chez des cobayes immunisés par des bactéries vivantes, en revanche il est peu actif chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

10 L'activité antigénique du glycopeptide augmente au cours des étapes de purification :

- Etape 1 : La fraction obtenue a une activité de 180 000 (UT)/mg chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et de 10 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

15 - Etape 2 : La fraction obtenue a une activité de 900 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et de 30 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

- Etape 3 : La fraction purifiée a une activité supérieure à 1 000 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG vivant et inférieure à 30 000 UT/mg chez des cobayes immunisés par du BCG inactivé par la chaleur.

20 Les résultats illustrés à la figure 3 montrent que :

- l'action de l' α -mannosidase durant 24h à 37°C fait perdre plus de 95 % de l'activité antigénique : la fraction est passé d'une activité à 1 000 000 UT/mg à une activité inférieure à 30 000 UT/mg après déglycosylation,

25 - l'action de la subtilisine abolit l'activité antigénique, et
- à quantité équivalente de protéines, le glycopeptide Lip est au moins 10 fois plus actif que les protéines standard purifiées de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD).

- c) Mesure de l'activité antigénique du glycopeptide Lip par un test *in vitro* de prolifération lymphocytaire.

Les résultats illustrés à la figure 4 montrent que la prolifération des lymphocytes T est dépendante de la concentration de peptide. Cette prolifération est marginale lorsque les lymphocytes T sont traités par un anticorps dirigé contre les molécules CD4 ou lorsque le glycopeptide est traité à l' α -mannosidase.

EXEMPLE 3 : Mise en évidence du rôle des résidus oligosaccharidiques de l'Apa dans la définition d'épitopes T par immunisation avec de l'ADN nu codant pour la protéine Apa.

10 1. Matériel et Méthodes

- a) Construction d'un plasmide contenant la séquence codant pour la protéine Apa

Le plasmide pS65T (Clontech) contenant la séquence du promoteur précoce du cytomégalovirus est coupé par les enzymes de restriction NheI et BspEI, réparé par l'enzyme de Klenow puis ligaturé de façon à obtenir le plasmide pAG800.

15 Le plasmide pAG800 est coupé par l'enzyme ApaI et ligaturé avec l'oligonucléotide 12M48 (5' CAACGTTGGGCC 3'; SEQ ID NO:4) hybridé sur lui-même, pour donner le plasmide pAG802.

Un fragment de 875 paires de bases contenant la séquence codante de l'Apa dépourvue de la séquence signal est amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir du plasmide pLA34-2 (Laqueyrie., 1995, *Infect. Immun.*, 63, 4003-4010), en utilisant :

les oligonucléotides 22M42 (5'TCCCAAGCTTTTGGTAGCCG3', SEQ ID NO:5) et 33M44 (5'CTAGGATC CACCATGCCGGAGCCAGCGCCCCCG3', SEQ ID NO:6).

25 L'oligonucléotide 33M44 a été synthétisé de façon à contenir un site consensus d'initiation de la traduction de type Kozak (*Nucl. Acids Res.*, 1987, 15, 8125-8148). Le fragment obtenu par PCR est coupé par BamHI et EcoRV et inséré dans le plasmide pAG802 coupé par BglII et SmaI, pour obtenir le plasmide pAG803. Au cours de ces opérations la séquence d'oligonucléotide 5'CAAC GTTGGGCC3' est perdue ; cette

séquence, dénommée Psp1046I ISS, est considérée comme une séquence immunostimulante augmentant les réponses immunitaires de même que la séquence IL-12p40 ISS (Lipford GB et al., 1997, *Eur. J. Immunol.*, 27, 3420-3426).

Une séquence Psp1046 ISS est insérée au site BamHI du plasmide
5 pAG803 par clonage de l'oligonucléotide 25M45
(5'GATCCGGGGGGGAACGTTGGGGGGG3', SEQ ID NO:7) hybridé avec
l'oligonucléotide 25M46 (5'GATCCCCCCCCAACGTTCCCCCCCCG3', SEQ ID NO:8),
pour obtenir le plasmide pAG831.

Une séquence IL-12p40 ISS est insérée au site BamHI du plasmide
10 pAG803 par clonage de l'oligonucléotide 24M63
(5'AGCGCTATGACGTTCCAAGGGCCC3, SEQ ID NO:9) hybridé avec
l'oligonucléotide 24M64 (5'GGGCCCTTGGAACGTCATAGCGCT3', SEQ ID NO:10),
pour obtenir le plasmide pAG832.

Après transformation d'*Escherichia coli* de souche XL1 Blue, les
15 plasmides ci-dessus sont amplifiés dans le milieu de culture LB (Sambrook et al.,
Molecular cloning : A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
Spring Harbor, N.Y., 1989) contenant 25 µg/ml de kanamycine. Après une étape
préalable d'élimination de l'endotoxine par traitement des lysats bactériens avec du Triton
X-114 (1%), l'ADN plasmidique est purifié sur des colonnes filtres QIA MaxiPrep
20 (QIAGEN) selon les indications du fabricant.

b) Immunisation des cobayes avec les plasmides pAG831 et pAG832

Des cobayes (Hartley) pesant 300 à 400 g sont immunisés par
2 injections intradermiques dans les flancs avec 50 µg d'ADN des plasmides pAG831 ou
pAG832, préparés et purifiés comme indiqué précédemment.

25 Le témoin est constitué par un groupe de cobayes immunisés par du
BCG vivant dans les conditions décrites à l'exemple 1 ou à l'exemple 2.

c) Mesure de l'activité antigénique de la protéine Apa produite par des cellules eucaryotes chez les cobayes immunisés par de l'ADN nu, par un test d'hypersensibilité de type retardé

Un et deux mois après l'immunisation, les réactions d'hypersensibilité de type retardé sont mesurées vis-à-vis de la protéine Apa native ou de la protéine Apa recombinante, produite dans une souche de *Escherichia coli* transformée, purifiées selon le protocole décrit dans Horn et al., précité.

L'Apa native et l'Apa recombinante sont injectées en intradermique à la dose de 0,2 µg dans 100 µl de tampon de titrage (tampon D). L'activité antigénique est mesurée comme décrit à l'exemple 2.

2. Résultats

Les résultats illustrés par la figure 5 sont les suivants :

- les cobayes immunisés avec le plasmide pAG831 ou pAG832 contenant la séquence codante de l'Apa sous le contrôle d'un promoteur eucaryote développent, dans la très grande majorité des cas, une réponse immunitaire dirigée contre la protéine Apa native (anticorps et une réponse T de type CD4+ mesurable par un test d'hypersensibilité de type retardé ou par un test de prolifération *in vitro* des lymphocytes T lorsqu'ils sont mis en présence des antigènes). Chez les animaux répondant à l'antigène Apa natif, les réponses des lymphocytes T CD4⁺ vis-à-vis de l'antigène déglycosylé par voie enzymatique ou de l'antigène recombinant non-glycosylé provenant de *E. coli* sont de même intensité que les réponses observées avec l'antigène natif glycosylé.
- en revanche, les cobayes immunisés par le BCG vivant montrent une réaction d'hypersensibilité de type retardé uniquement en réponse à l'Apa native. Ces animaux ne développent aucune réaction ou développent une réaction fortement diminuée en réponse à l'Apa recombinante non-glycosylée produite dans *E. coli* comme indiqué précédemment.

Les enseignements de ces résultats sont les suivants :

1) Les résultats observés chez les animaux immunisés avec l'ADN nu codant l'Apa indiquent que la capacité de la protéine Apa à être phagocytée et présentée par les macrophages ou les cellules dendritiques est identique pour la protéine Apa native
5 ou recombinante (non glycosylée).

2) La combinaison des résultats ci-dessus avec les résultats observés chez les animaux immunisés avec du BCG vivant indique que l'absence de réponse à la protéine Apa déglycosylée n'est pas due à une diminution de sa capacité à être présentée par les macrophages ou les cellules dendritiques mais à une absence de reconnaissance
10 par les lymphocytes T CD4⁺. En conséquence, les résidus oligomannose des chaînes latérales des protéines Apa ou Lip sous forme native, telles que celles produites par *M. tuberculosis* ou par BCG vivant, jouent un rôle dans la constitution d'épitopes T reconnus par des lymphocytes T CD4⁺.

**EXEMPLE 4 : Préparation des peptides glycosylés SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et
15 SEQ ID NO:3.**

1) Préparation des synthons glycosylés 15, 16 et 19.

Préalablement à la synthèse peptidique, on prépare des synthons glycosylés, c'est-à-dire des thréonines fonctionnalisées par deux ou trois résidus mannoses.

• *Préparation des composés 5 et 8 (figure 6)*

20 La préparation des composés 5 et 8 est décrite, respectivement, par H. FRANZYK *et al.* dans *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 2883-2898 et par R.K. NESS *et al.* dans *J. Am. Chem. Soc. Perkin*, 1950, 72, 2200-2205.

Le mannose peracétylé commercial 1 (à savoir le 1,2,3,4,5-penta-O-acétyl- α -D-mannopyranose) est bromé en position anomérique par action du bromure
25 d'hydrogène dans l'acide acétique, comme décrit par A. LEVENE *et al.* dans *J. Biol. Chem.*, 1931, 90, 89-98. L'intermédiaire 2 activé est cyclisé en orthoester 3 dans un mélange de 2,6-diméthylpyridine/méthanol. L'ouverture régiosélective de l'orthoester par hydrolyse acide, à 0°C, dans un mélange acide trifluoroacétique

10% aqueux/ acétonitrile conduit au 1,3,4,6-tétra-O-acétyl- β -D-mannopyranose (5). Le régioisomère 4 est également isolé.

Le mannose commercial 6 est perbenzoylé en 7 par action du chlorure de benzoyle dans la pyridine. Ce dernier est activé en 8 par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique. Dans ce protocole et dans ceux qui suivent, d'autres méthodes d'activation que par l'action du bromure d'hydrogène pourraient toutefois être utilisées, telles qu'elles sont connues de l'Homme du métier.

- *Préparation des disaccharides 10 et 12 (figure 7a)*

La préparation des composés 10 et 12 est décrite, respectivement, par A. JANSSON *et al.* dans *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1992, 1699-1707 et par H. FRANZYK *et al.* (*ibid*). Les composés 2 et 5 sont condensés en présence de trifluorométhanesulfonate d'argent (ou tout autre promoteur de la réaction de condensation) dans le dichlorométhane pour conduire au disaccharide peracétylé 9, qui est ensuite activé en précurseur bromé 10 par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique. Suivant un protocole identique, les composés 5 et 8 sont condensés pour donner le composé 11, lui-même activé en 12.

- *Préparation du trisaccharide 18 (figure 7a)*

Le disaccharide activé 12 est condensé sur le monosaccharide accepteur 5, en présence de trifluorométhanesulfonate d'argent dans le dichlorométhane, pour conduire au trisaccharide peracétylé 17, qui est ensuite activé en précurseur bromé 18 par action du bromure d'hydrogène dans l'acide acétique.

- *Préparation des synthons 15 et 16, porteurs de deux unités mannose, et du synthon 19, porteur de trois unités mannose (figure 7b)*

Comme décrit par I. SCHON *et al.* dans *Synthesis*, 1986, 303-305, la fonction acide de la thréonine commerciale 13, dont la fonction amine primaire est protégée par un groupement Fmoc, est bloquée sous forme d'ester par action du pentafluorophénol (pfp) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) pour conduire au précurseur accepteur 14.

La préparation des synthons 15 et 16 est décrite, respectivement, par A. JANSSON *et al.* (*ibid*) et par H. FRANZYK *et al.* (*ibid*). La condensation du composé 14 avec les disaccharides activés 10 et 12, menée en présence de trifluorométhanesulfonate d'argent dans le dichlorométhane, conduit aux synthons 15 et 16, respectivement. Selon le même protocole, la condensation du composé 14 avec le trisaccharide activé 18 conduit au synthon 19.

2) Préparation des peptides glycosylés SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

Les peptides sont synthétisés en phase solide en utilisant la chimie Fmoc. La synthèse peptidique est effectuée sur un synthétiseur automatique, à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention des séquences souhaitées, en incorporant les synthons glycosylés, qui se présentent sous la forme d'esters activés de pentafluorophénol (synthons 15, 16 et 19).

En fonction des synthons utilisés, on obtient soit des peptides comportant des thréonines fonctionnalisées par deux résidus du mannose (incorporation des synthons 15 et/ou 16 lors de la synthèse peptidique), soit des peptides comportant des thréonines fonctionnalisées par trois résidus du mannose (incorporation du synthon 19 lors de la synthèse peptidique), soit des peptides comportant à la fois des thréonines fonctionnalisées par deux résidus du mannose et des thréonines fonctionnalisées par trois résidus du mannose (incorporation des synthons 19 et 15 et/ou 16 lors de la synthèse peptidique).

En fin de synthèse, après clivage des peptides du support solide à l'aide d'acide trifluoroacétique et déprotection des différents acides aminés et des fonctions hydroxyles des mannoses, les peptides sont purifiés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse. Leur structure est contrôlée par les techniques connues de l'Homme du métier, telles que la spectrométrie de masse et l'analyse en acides aminés.

Les fonctions amides (en position C-terminale des peptides SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:3) et acétates (en position N-terminale des peptides SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3) sont ensuite introduites par synthèse chimique, au moyen des techniques de chimie organique connues de l'Homme du métier.

5 **EXEMPLE 5 : Mise en évidence du rôle des résidus oligosaccharidiques de l'Apa dans la définition d'épitopes T par immunisation avec un peptide de l'Apa produit dans *E. coli***

1) **Matériel et Méthodes**

10 Un peptide correspondant aux positions 250 à 280 de l'Apa a été produit dans *E. coli*, sous forme d'une fusion avec un fragment de la cyclase de *Bordetella pertussis*, selon les techniques classiques de clonage, d'expression et de purification de protéines recombinantes dans *E.coli* qui sont bien connues de l'Homme du métier (cf par exemple, les protocoles décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

15 Trois groupes de 5 cobayes Hartley pesant 300 à 400 g ont été immunisés par 2 injections intradermiques à 1 mois d'intervalle, avec 20 µg de ce peptide de l'Apa purifié, dans 0,1 ml d'une solution d'adjuvant.

Trois groupes de 4 cobayes immunisés quatre mois auparavant par du BCG vivant, dans les conditions décrites à l'exemple 1 sont utilisés comme témoins.

20 Un et deux mois après l'immunisation, les réactions d'hypersensibilité de type retardé ont été mesurées vis-à-vis de la protéine Apa native, de la protéine Apa recombinante produite dans *E. coli* et de la protéine Apa déglycosylée préparée comme décrit à l'exemple 1, dans les conditions définies à l'exemple 3.

2) **Résultats**

25 Les réactions d'hypersensibilité de type retardé des cobayes immunisés, soit avec le peptide de fusion de l'Apa, soit avec le BCG vivant ont été mesurées vis-à-vis de la protéine Apa native, de la protéine Apa recombinante produite dans *E. coli* et de la

protéine Apa déglycosylée. Les résultats exprimés par le diamètre de la réaction d'érythème (mm) sont présentés dans le Tableau I ci-dessous :

Tableau I: Activité antigénique du peptide de fusion de l'Apa exprimé dans *E.coli*

antigène	BCG vivant	Peptide de fusion
Apa native	17-15-11-13	5-12-13-5-5
Apa recombinante <i>E. coli</i>	0 0 0 0	13-14-15-5-15
Apa déglycosylée	0 0 0 0	NT*

*NT: non-testé

5 Comme indiqué dans le Tableau I ci-dessus, les réactions d'hypersensibilité de type retardé observées chez les cobayes immunisés par le BCG vivant, sont importantes après injection de molécules Apa natives. Les réactions sont très faibles ou absentes après injection des molécules déglycosylées par voie chimique ou produites dans *E. coli*. A l'inverse pour les cobayes immunisés par les molécules
10 recombinantes correspondant à la fusion entre le fragment de la cyclase de *Bordetella pertussis* et le fragment interne de la molécule Apa, les sensibilisations sont identiques vis-à-vis des molécules natives ou déglycosylées.

Ces résultats montrent que les épitopes T glycosylés de la molécule Apa sont reconnus de façon élective par les cobayes immunisés par les bactéries vivantes. Ils
15 montrent aussi que l'absence ou la moindre reconnaissance par ces cobayes des molécules déglycosylées n'est pas liée à une moindre antigénicité intrinsèque de ces molécules.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les
20 variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT PASTEUR
 Marchal Gilles
 Romain Félix
 Pescher Pascale

<120> Glycopeptides immunogènes, criblage, préparation et applications

<130> Seq226FR86

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)

<223> liaison glycosidique à un di- ou un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)

<223> liaison glycosidique à un di-ou à un tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)

<223> liaison glycosidique à un di-ou à un tri-saccharide

<400> 1

Asp	Pro	Glu	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Pro	Pro
1				5					10					15	

Ser	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Pro
			20					25					30		

Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Asn	Thr
				35		

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<400> 2

Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr
1 5 10 15

Thr Pro Thr Pro Gln Arg Thr Leu Pro Ala
20 25

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)

<223> liaison glycosidique à un di- ou à un
tri-saccharide

<400> 3

Thr Ile Pro Thr Thr Glu Thr Pro Pro Pro Pro Gln Thr Val Thr Leu

WO 02/50108

PCT/FR01/04100

1	5	10	15
Ser	Pro	Val	Pro
Pro	Gln	Thr	Val
Thr	Val	Ile	Pro
Ala	Pro	Pro	Pro
20	25	30	
Glu	Glu	Gly	
35			

<210> 4
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)
 <223> liaison glycosidique à un mannose, un di-mannose
 ou un tri-mannose

<400> 4
 caacgttggg cc 12

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5
 tccaagctt ttggtagccg 20

<210> 6
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 6
 ctaggatcca ccatgccgga gccagcgccc ccg 33

<210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 7
 gatccggggg ggaacgttgg ggggg 25

<210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 8
 gatccccccc caacgttccc ccccg 25

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 9
 agcgctatga cgttccaagg gccc 24

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:linker

<400> 10
 gggcccttgg aacgtcatag cgct 24

<210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)
 <223> liaison glycosidique à un mannose, un di-mannose
 ou un tri-mannose

<400> 11
 Val Ala Pro Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Glu Pro Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ala Gly Glu Val Ala Pro Thr Pro Thr Thr Pro Thr
 20 25 30

Pro Gln Arg
 35

REVENDICATIONS

1°) Glycopeptides immunogènes sélectionnés dans le groupe constitué par :

5 a₁) des glycopeptides essentiellement constitués par un épitope T glycosylé, comprenant de 14 à 25 acides aminés, parmi lesquels au moins un acide aminé neutre est lié à un di- ou à un trisaccharide (liaison glycosidique) et au moins 15 % d'entre lesdits acides aminés sont des proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé neutre, lesquels glycopeptides, issus d'un microorganisme pathogène sont :

- 10 - présentés par une molécule de classe II du CMH,
- reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec la glycoprotéine native dont ils sont issus, mais ne sont pas reconnus par les lymphocytes T CD4+ induits par immunisation avec un peptide non glycosylé de même séquence et
15 - capables d'induire une prolifération desdits lymphocytes T CD4+ par lesquels ils sont reconnus et la sécrétion de cytokines par lesdits lymphocytes et

b₁) des glycopeptides qui présentent une séquence de 15 à 39 acides aminés incluant la séquence du glycopeptide tel que défini en a₁), à l'exclusion du glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11.

20 2°) Glycopeptides immunogènes selon la revendication 1, caractérisés en ce que ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.

3°) Glycopeptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce qu'ils contiennent de 1 à 7 résidus thréonine, liés à un di- ou à un
25 trisaccharide.

4°) Glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce que ledit di- ou tri-saccharide est un dimère ou un trimère d'hexose.

5°) Glycopeptides selon la revendication 4, caractérisés en ce que ledit hexose est un mannose.

6°) Glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisés en ce que ladite liaison glycosidique est une liaison α -(1,2).

5 7°) Glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisés en ce que ledit microorganisme pathogène est apte à O-glycosyler des protéines.

8°) Glycopeptides selon la revendication 7, caractérisés en ce que ledit microorganisme pathogène est *Mycobacterium tuberculosis* ou *Candida albicans*.

10 9°) Glycopeptides, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisés en ce qu'ils sont issus de la protéine Apa de *M. tuberculosis* (Genbank numéro X80268) ou de la protéine Rv1796 codée par le gène *Rv 1796*, en référence à l'annotation de la séquence du génome de *M. tuberculosis* de souche H37Rv.

15 10°) Glycopeptides selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- un glycopeptide de 39 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:1) est celle qui s'étend des positions 1 à 39 de la séquence de la protéine Apa et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 10, 18 et 27 de la SEQ ID NO:1 est lié à un di- ou tri-saccharide par une liaison glycosidique,

20 - un glycopeptide de 26 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:2) est celle qui s'étend des positions 261 à 286 de la séquence de la protéine Apa (séquence C-terminale) et dans laquelle le résidu thréonine en position 17 de la SEQ ID NO:2 est lié à un di- ou trisaccharide par une liaison glycosidique, et

25 - un glycopeptide de 35 acides aminés dont la séquence (SEQ ID NO:3) est celle qui s'étend des positions 169 à 203 de la séquence de la protéine Rv 1796 et dans laquelle au moins un des résidus thréonine en position 4, 5, 7, 13, 15, 23 et 25 de la SEQ ID NO:3 est lié à un di- ou tri-saccharide par une liaison glycosidique.

11°) Procédé de synthèse d'un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- préparation, en solution, d'acides aminés neutres glycosylés, liés à un di- ou à un trisaccharide par une liaison glycosidique,

5 - synthèse, sur support solide, du glycopeptide à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de la séquence peptidique dudit glycopeptide et des acides aminés neutres, obtenus précédemment, et

- coupure du glycopeptide du support solide.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit acide
10 aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.

13°) Procédé de préparation selon la revendication 12, caractérisé en ce que lorsque lesdits glycopeptides présentent les séquences suivantes (**T** représente une thréonine O-glycosylée fonctionnalisée par 2 ou 3 résidus glycosidiques et Ac représente une fonction acétate) :

15 SEQ ID NO:1 :

H₂N-DPEPAPPVPTTAASPPSTAAAPPAPATPVAPPPPAANT-CONH₂

SEQ ID NO:2 :

AcNH-PAPAPAPAGEVAPTPTTPTPQRTLPA-COOH

SEQ ID NO:3 :

20 AcNH-TIPTTETPPPPQTVTLSPVPPQTVTVIPAPPPEEG-CONH₂,

ledit procédé comprend les étapes suivantes :

i) préparation, en solution, de thréonines O-glycosylées fonctionnalisées par 2 ou 3 résidus glycosidiques,

25 ii) synthèse, sur support solide, des peptides correspondant aux séquences SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 sus-mentionnées, à l'aide des acides aminés nécessaires à l'obtention de ces séquences et des thréonines O-glycosylées obtenues lors de l'étape i),

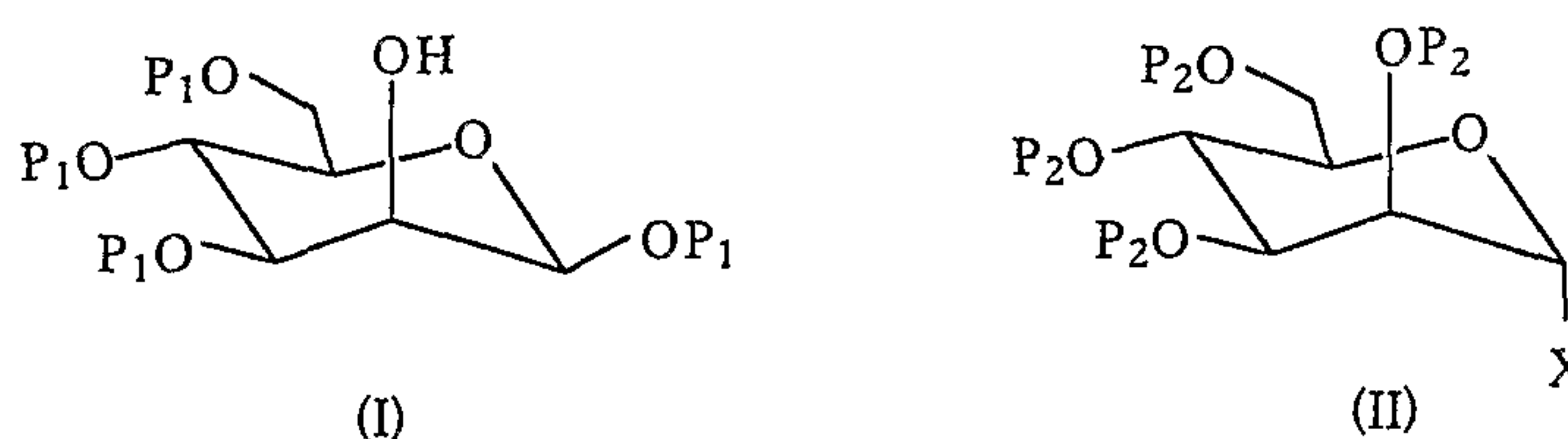
iii) coupure des peptides du support solide, et

iv) introduction, par synthèse chimique, d'une fonction amide au niveau de l'extrémité C-terminale des peptides SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:3, et d'une fonction acétate au niveau de l'extrémité N-terminale des peptides SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3.

14°) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que lesdits
5 résidus glycosidiques portés par les thréonines sont des hexoses, de préférence des mannoses.

15°) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les thréonines fonctionnalisées par des résidus mannose sont préparées par les étapes suivantes :

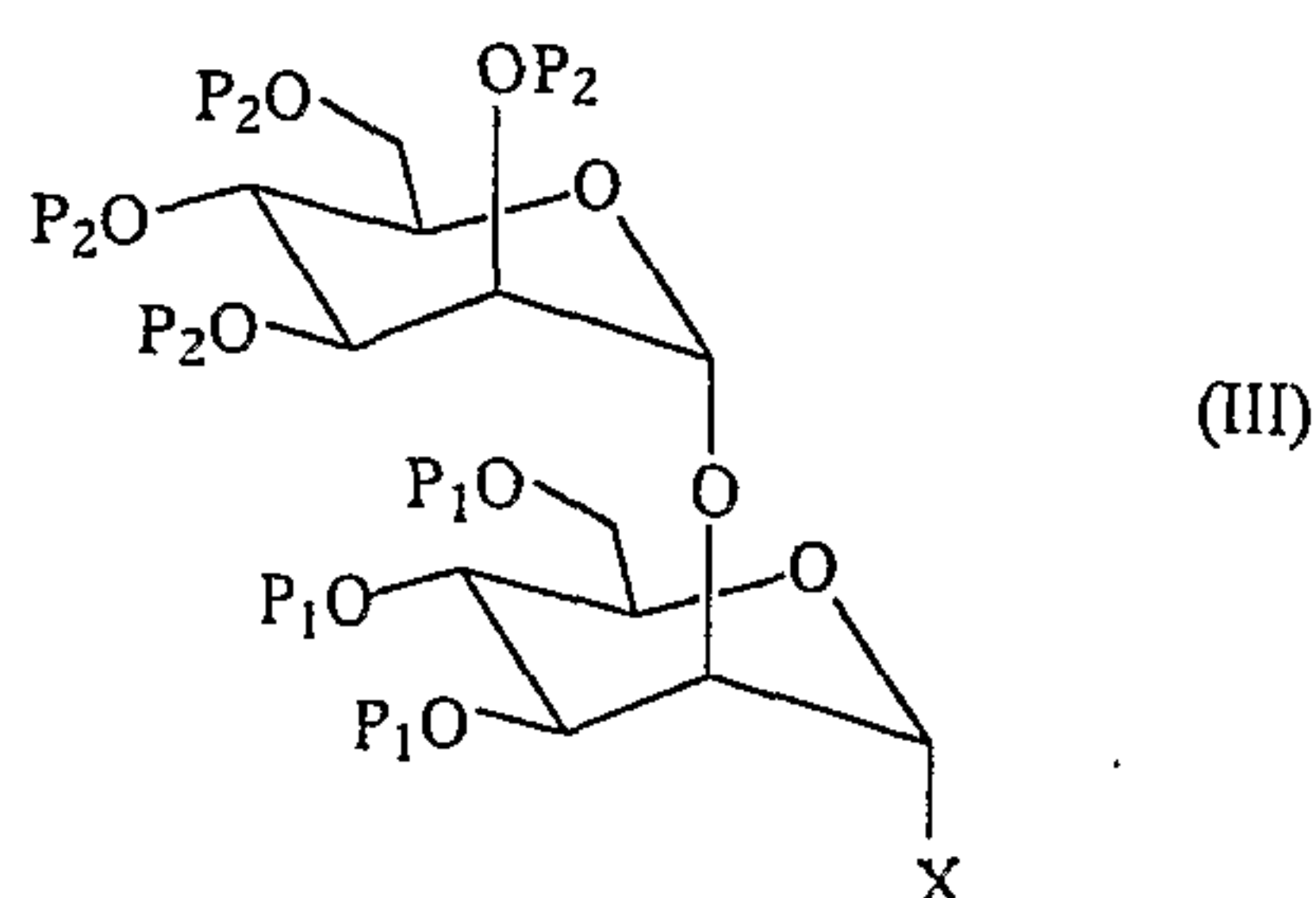
10 a₂) préparation de dérivés du mannose de formules (I) et (II) :



15 dans lesquelles P₁ et P₂, qui peuvent être identiques ou différents, représentent des groupes protecteurs d'une fonction hydroxyle, et X représente une fonction activée, telle qu'un atome de brome,

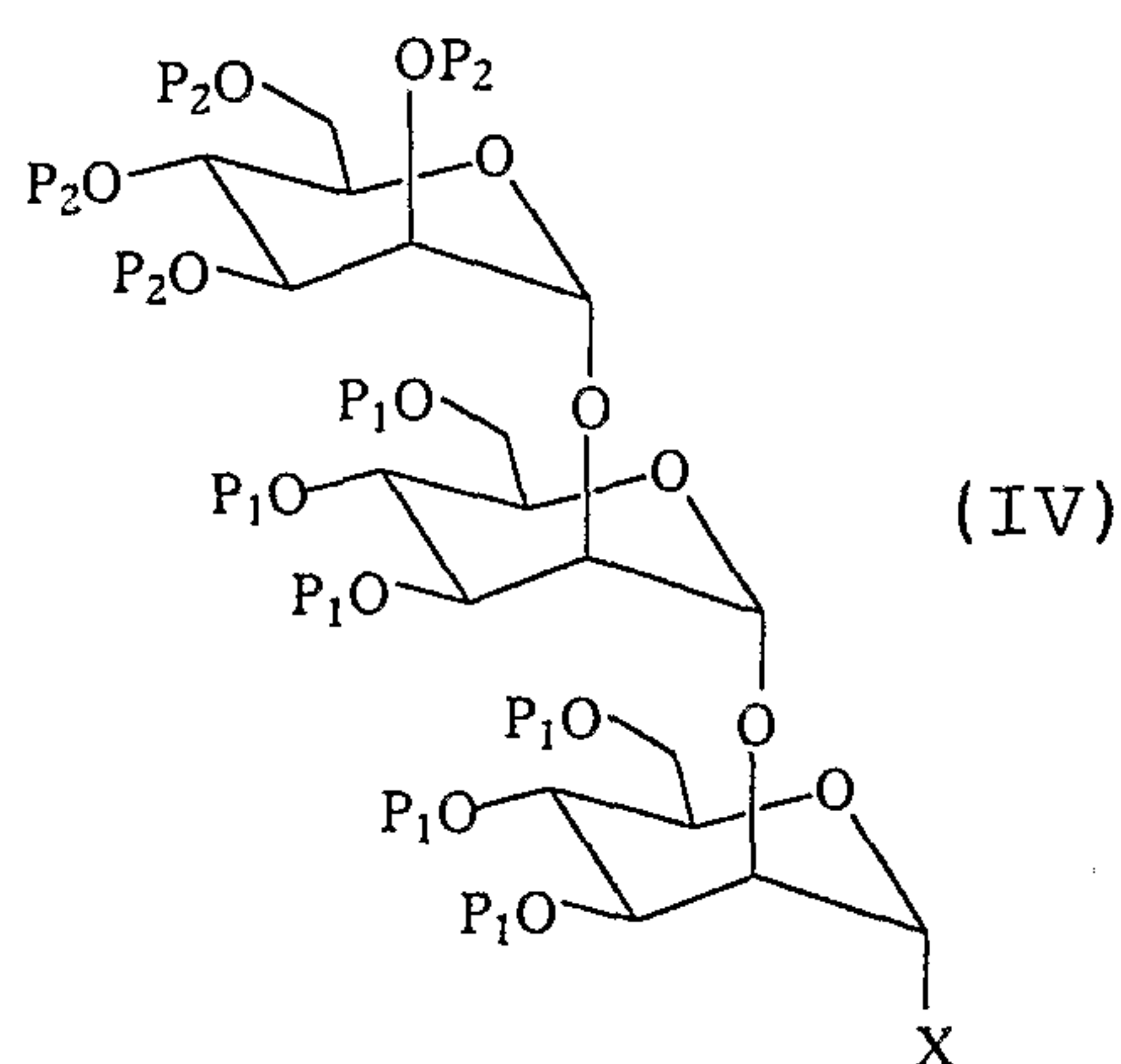
b₂) réaction du dérivé de formule (I) avec le dérivé de formule (II), puis activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant deux résidus mannose et répondant à la formule (III) :

20



dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II),

- 5 c₂) éventuellement, réaction du composé de formule (III) avec un dérivé du mannose de formule (I) telle que définie en a₂), puis activation du composé obtenu, conduisant à l'obtention d'un dérivé activé comportant trois résidus mannose et répondant à la formule (IV) :

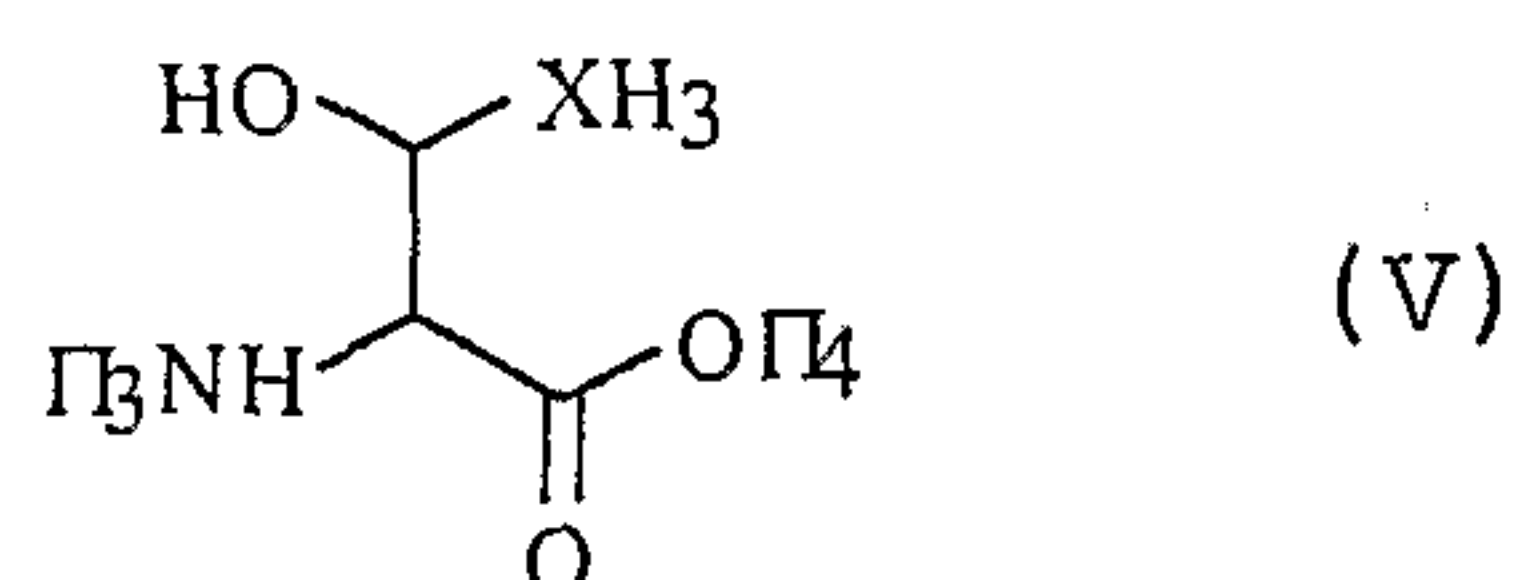


10

dans laquelle P_1 , P_2 et X sont tels que définis en rapport avec les formules (I) et (II), et

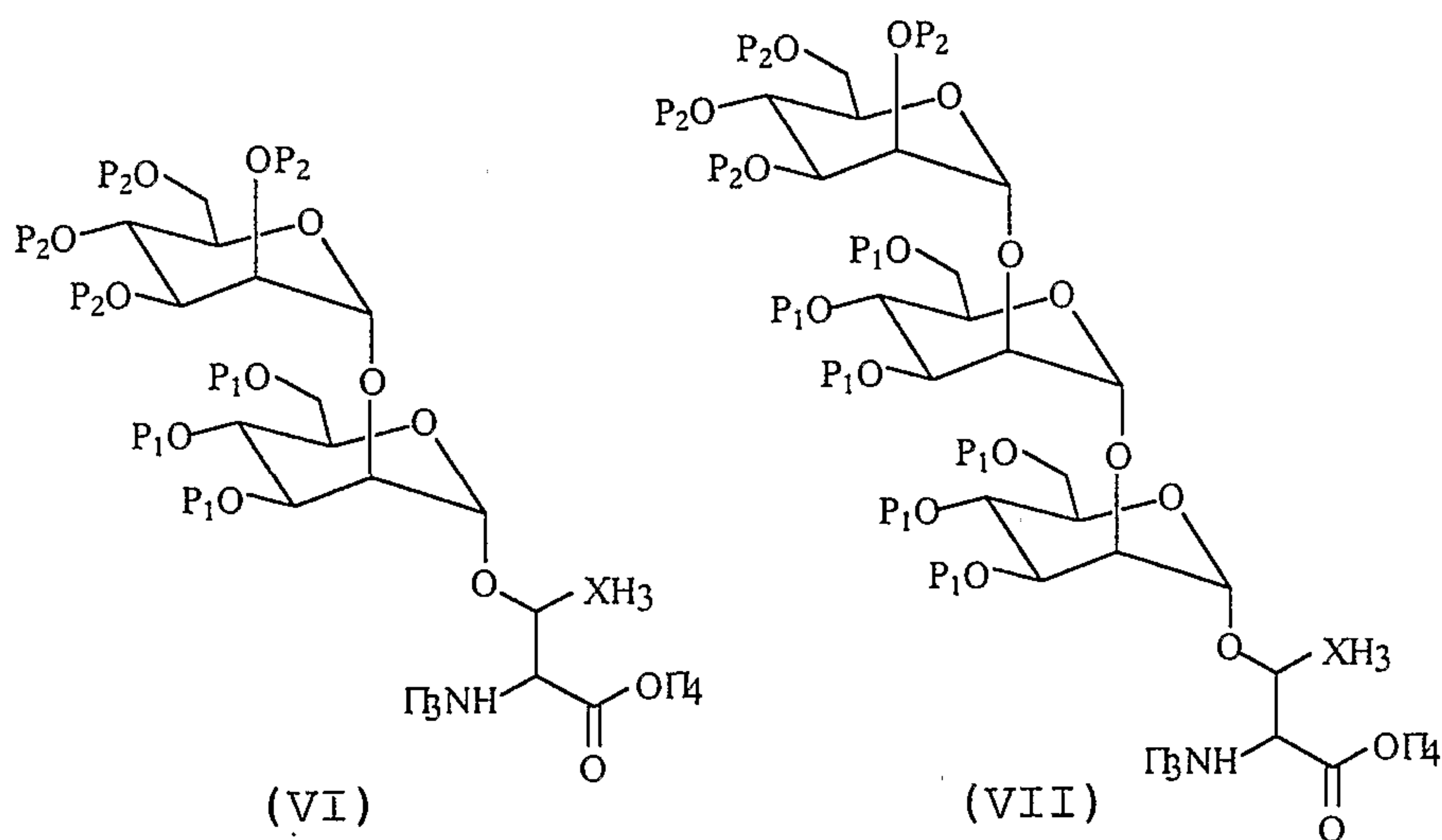
- d₂) condensation du composé de formule (III) ou du composé de formule (IV) avec une thréonine convenablement protégée de formule (V) :

15



dans laquelle P_3 représente un groupe protecteur d'une fonction amine primaire et P_4 représente un groupe protecteur d'une fonction hydroxyle,

conduisant respectivement à l'obtention d'une thréonine glycosylée de formule (VI) ou (VII) :



5

dans lesquelles P_1 , P_2 , P_3 et P_4 sont tels que définis précédemment.

16°) Procédé de sélection et de criblage de glycopeptides antigéniques à partir de la séquence peptidique des protéines d'un microorganisme pathogène, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- 10 a₃) recherche et sélection dans la séquence peptidique desdites protéines d'au moins une séquence de 14 à 25 acides aminés, contenant au moins un acide aminé neutre lié à un di- ou un trisaccharide et au moins 15 % de proline, l'une des proline étant située en position -1 à -4, relativement à la position dudit acide aminé,
- b₃) préparation du/des glycopeptide(s) sélectionné(s) à l'étape a₃)
- 15 conformément au procédé selon les revendications 11 à 15, et
- c₃) sélection des glycopeptides dont l'activité antigénique est au moins 10 fois supérieure, de préférence au moins 30 fois supérieure, à celle d'un peptide témoin de même séquence.

17°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a₃), il comprend une étape de présélection d'au moins une glycoprotéine antigénique.

18°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit acide aminé neutre est sélectionné dans le groupe constitué par la sérine et la thréonine.

19°) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que, à l'étape c₃), l'activité antigénique dudit glycopeptide est évaluée par mesure de l'activation des lymphocytes T CD4+ d'animaux immunisés par ledit microorganisme pathogène atténué ou par une fraction antigénique dudit microorganisme pathogène.

20°) Glycopeptide, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 19.

21°) Utilisation d'au moins un glycopeptide sélectionné dans le groupe constitué par les glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20 ou un glycopeptide de séquence SEQ ID NO:11, pour la préparation d'une composition immunogène ou vaccinale ou d'un réactif de diagnostic.

22°) Composition immunogène apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

23°) Composition vaccinale apte à induire une immunité humorale et/ou cellulaire, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement à au moins un adjuvant.

24°) Composition immunogène ou vaccinale selon la revendication 22 ou la revendication 23, caractérisée en ce que ledit glycopeptide est associé à une protéine ou un fragment de protéine comprenant au moins un épitope B, un épitope T de type CD4+ ou un épitope T de type CD8+.

25°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre l'un ou plusieurs des glycopeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20.

26°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un glycopeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou 20 ou un anticorps
5 selon la revendication 25.

27°) Procédé de détection d'une infection par un microorganisme pathogène, caractérisé en qu'il comprend la mise en contact d'un échantillon biologique d'un patient susceptible d'être infecté par ledit microorganisme pathogène, avec un réactif de diagnostic selon la revendication 26 et la détection de la formation d'un complexe
10 anticorps-microorganisme présent dans l'échantillon biologique ou glycopeptide(s)-anticorps présents dans l'échantillon.

1/9

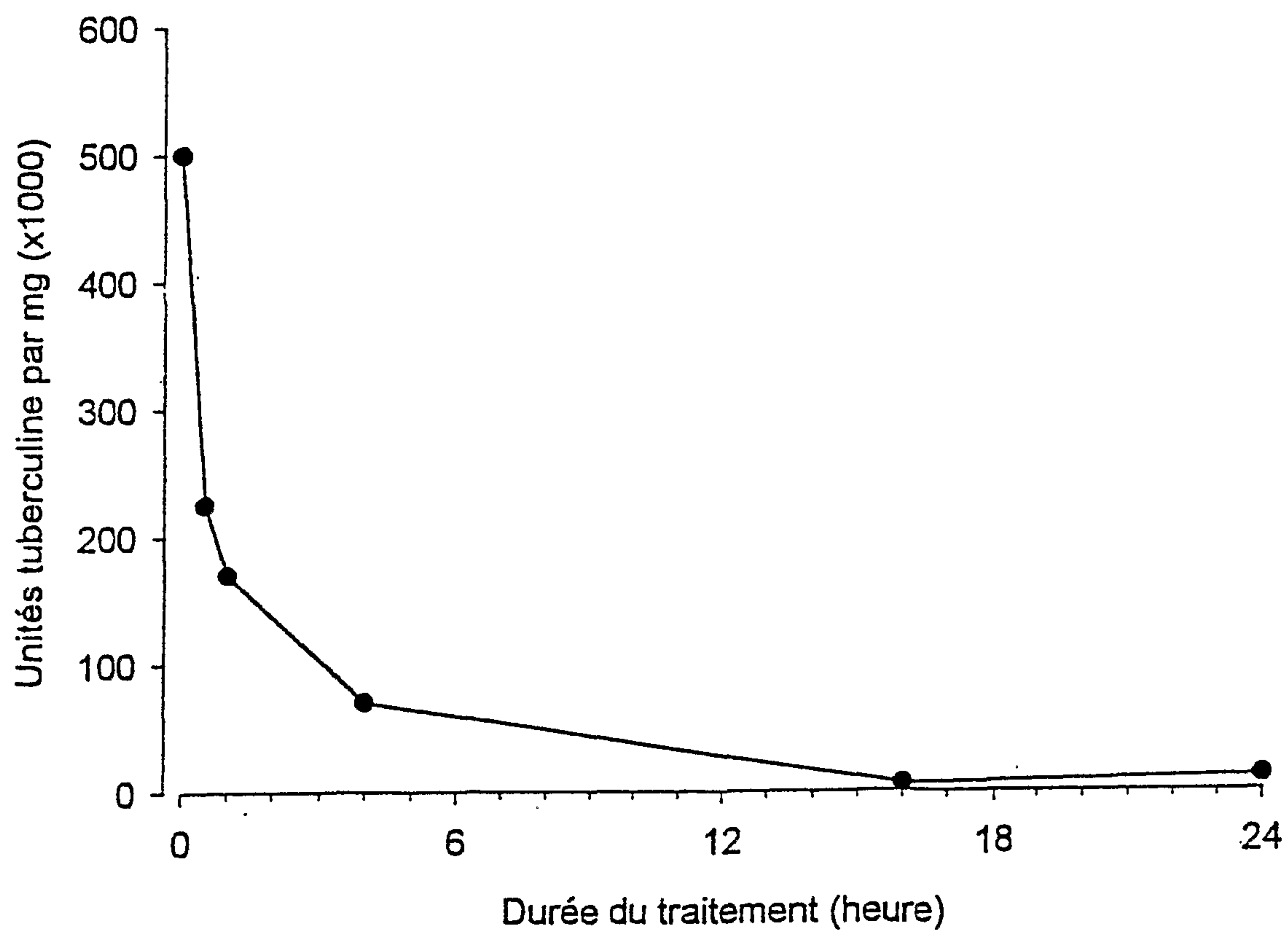


FIGURE 1

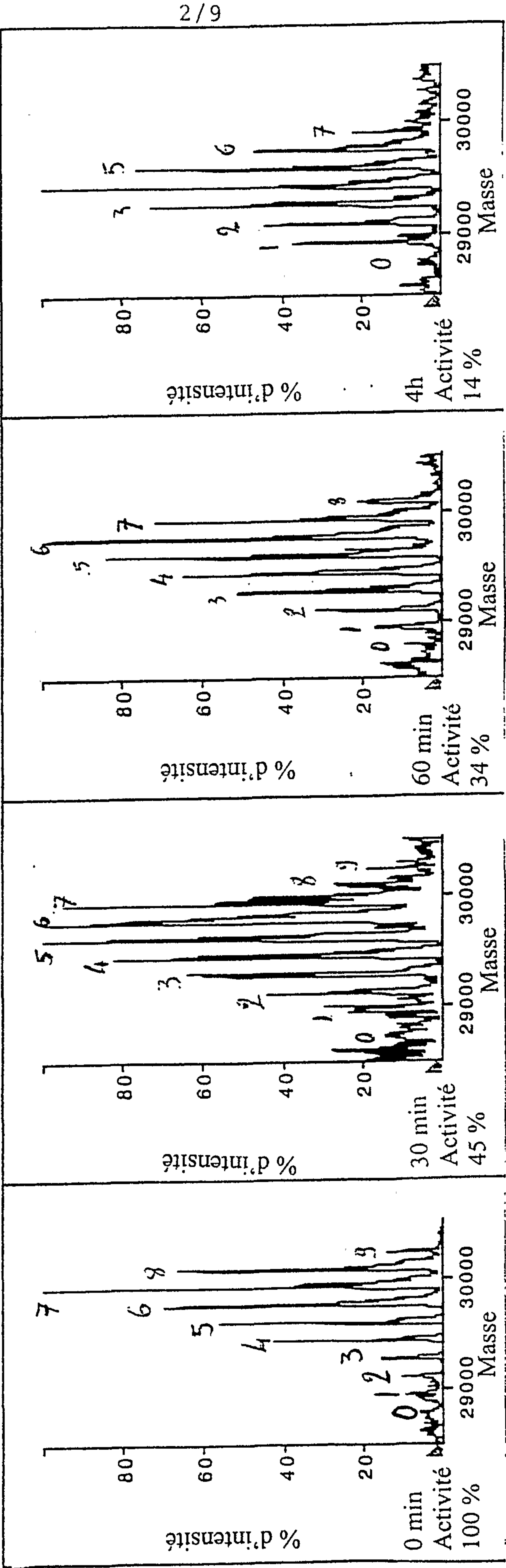


FIGURE 2.1

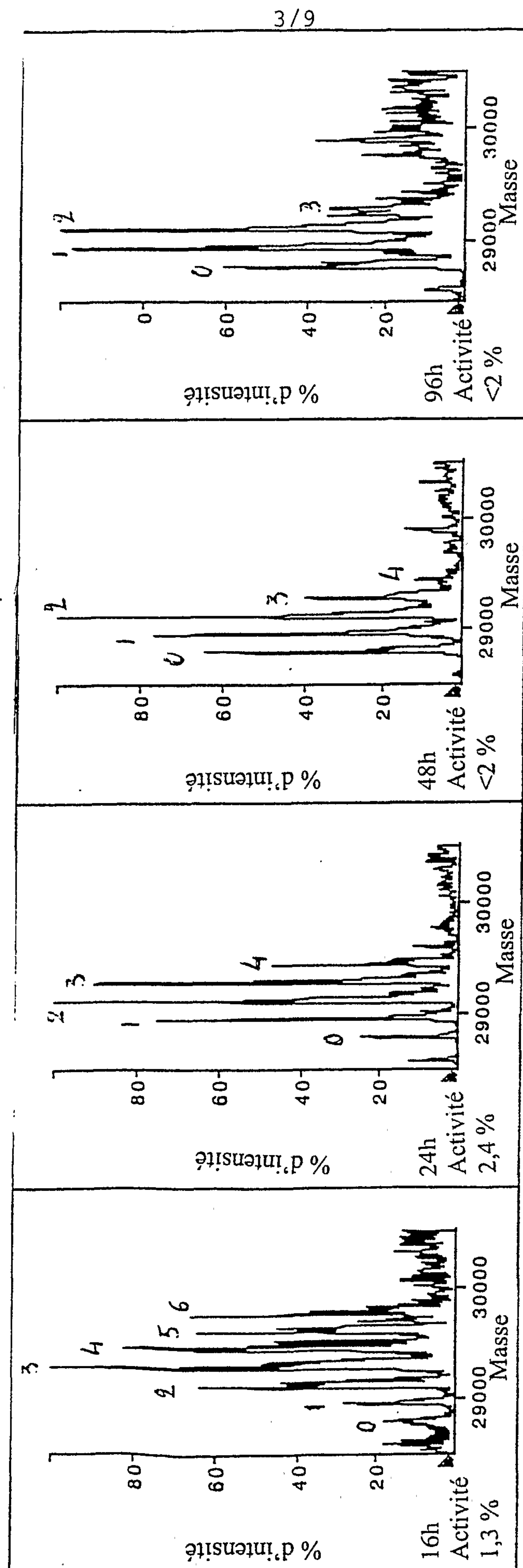


FIGURE 2.2

4/9

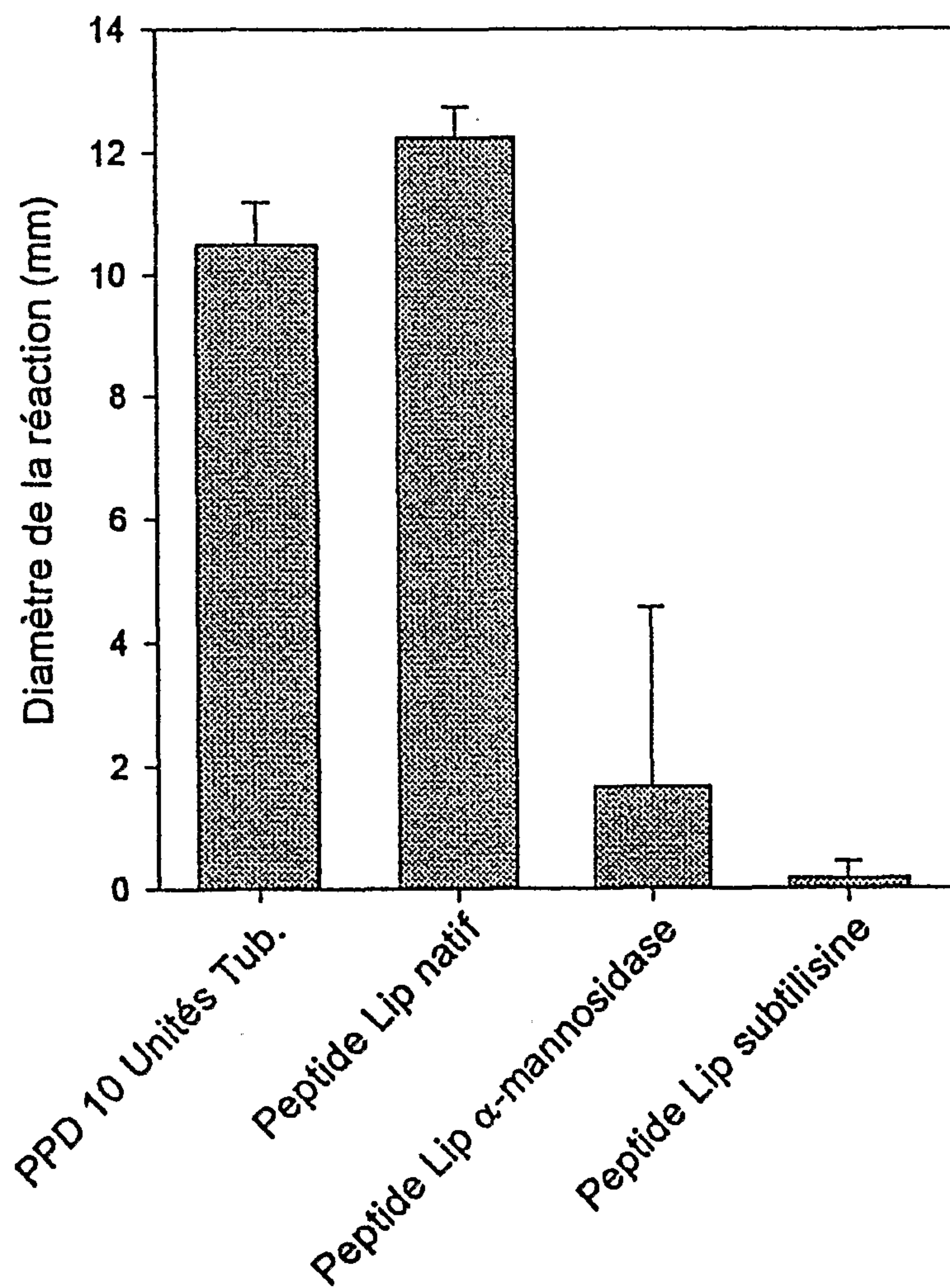


FIGURE 3

5/9

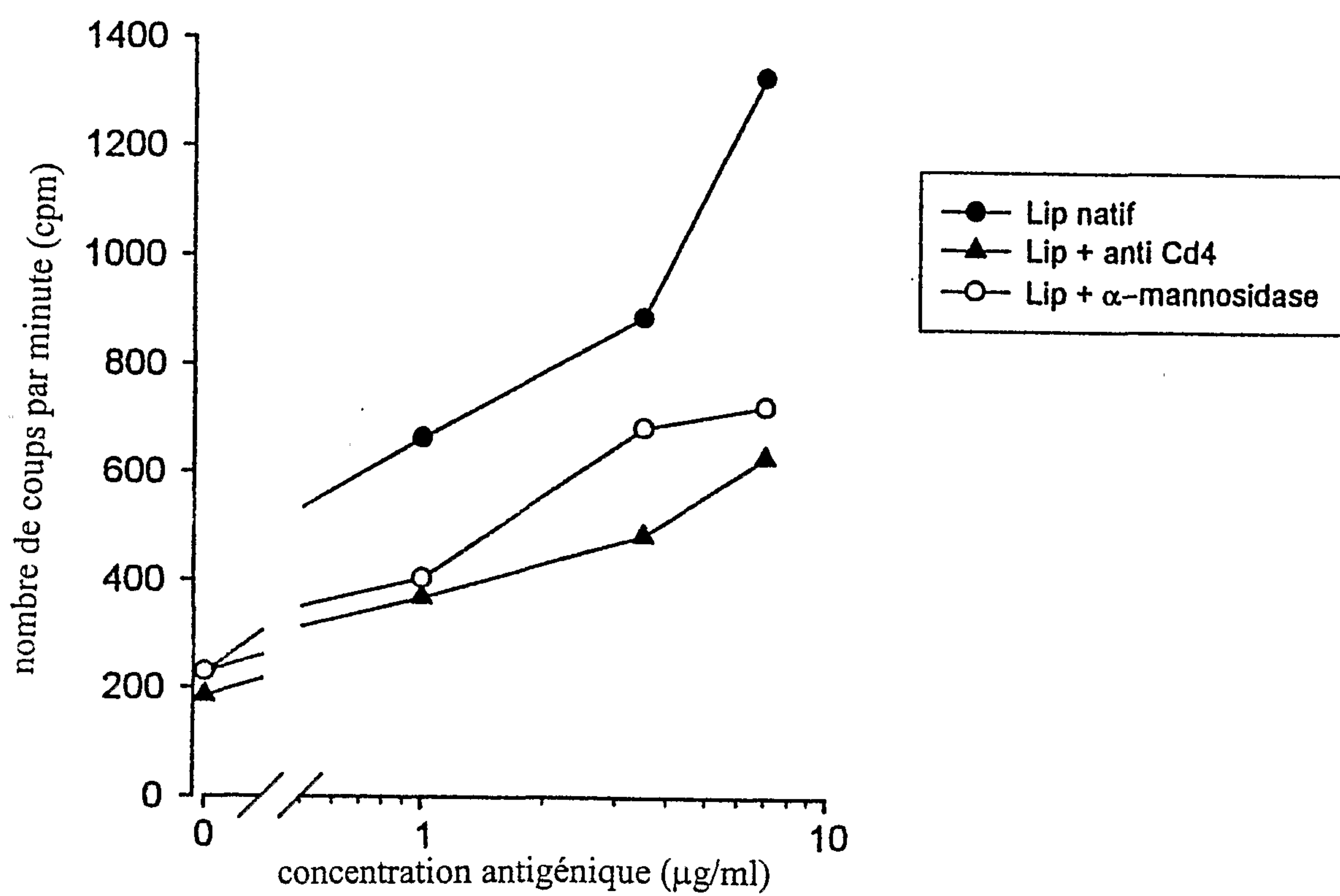


FIGURE 4

6/9

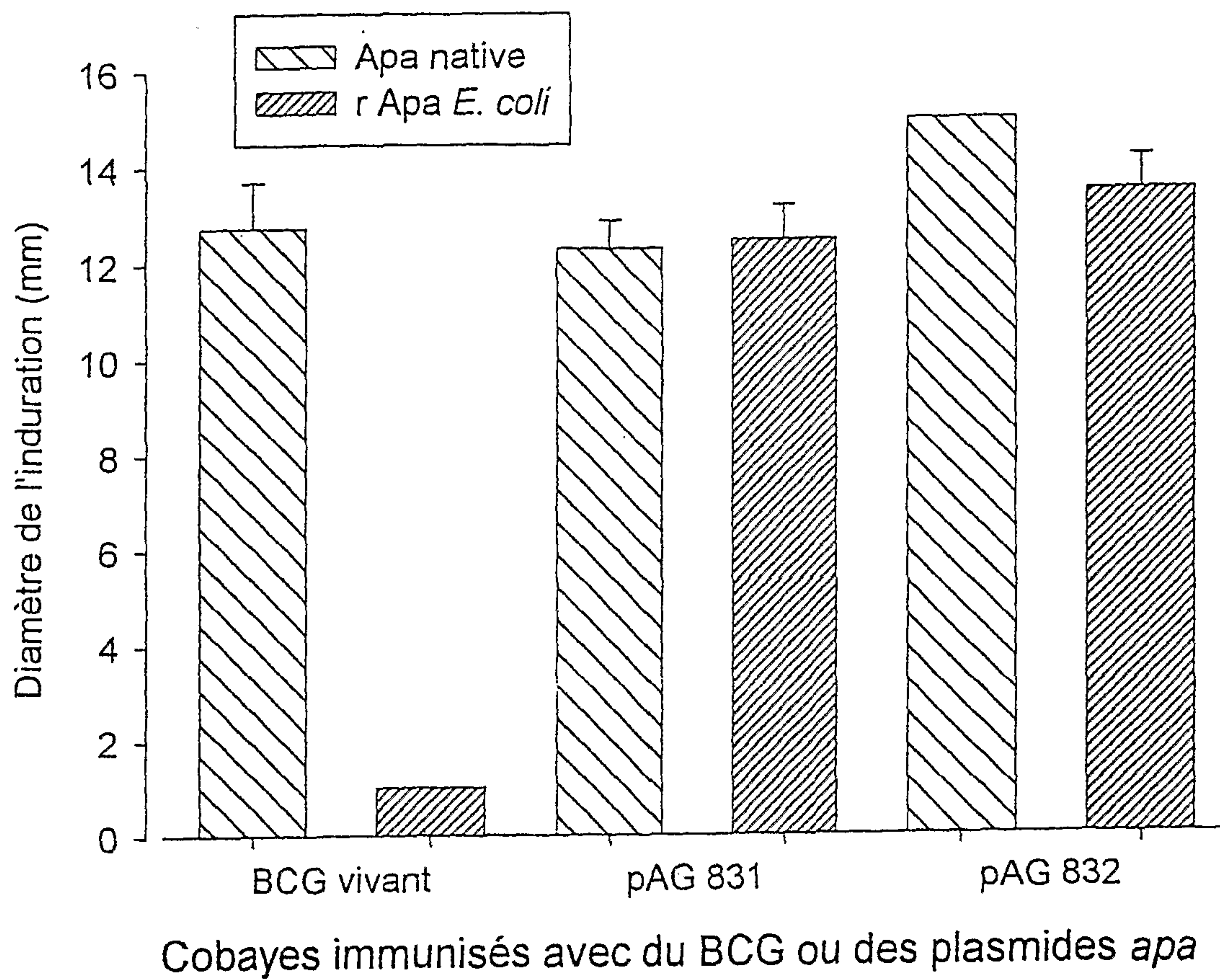


FIGURE 5

7/9

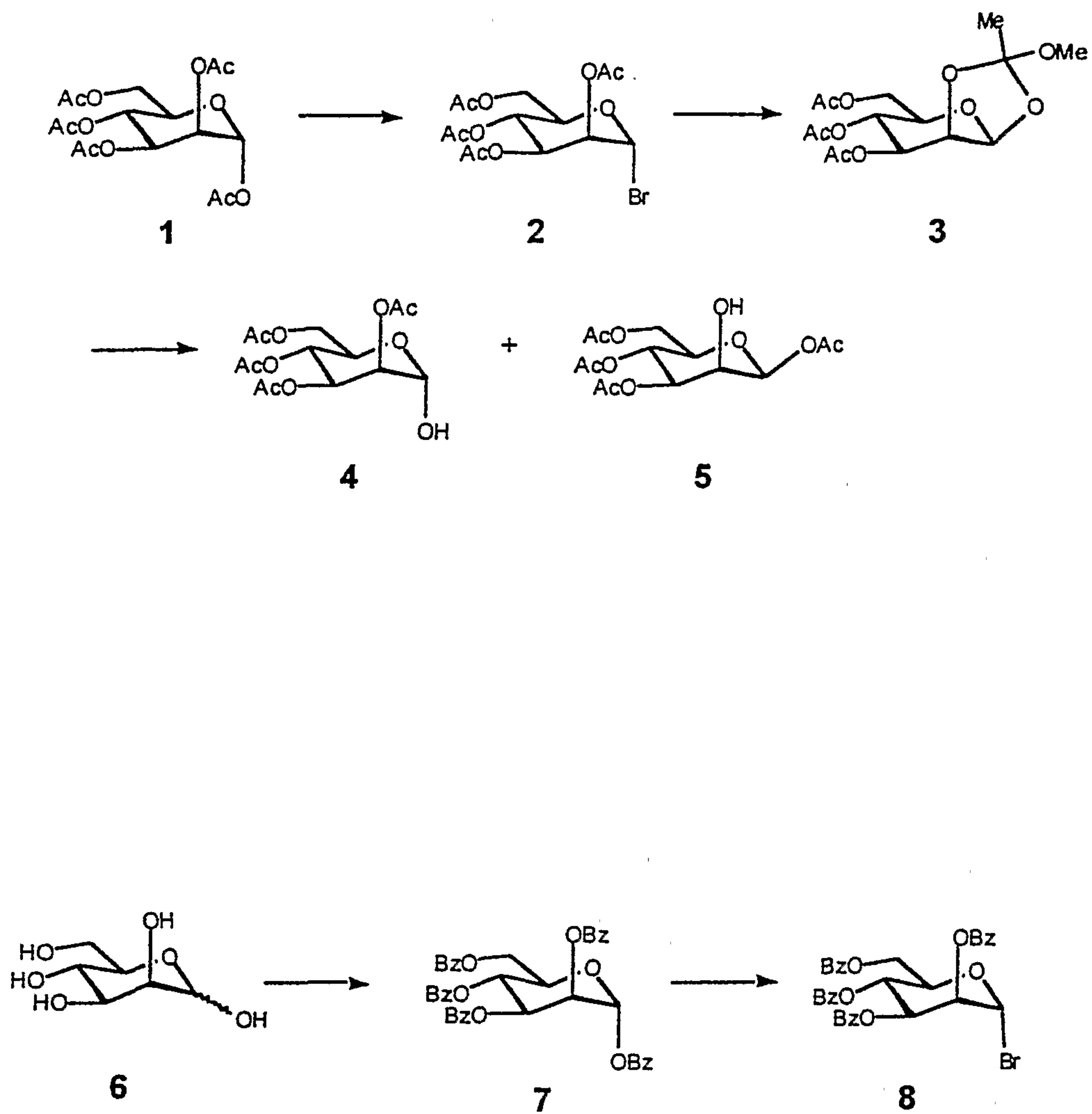


FIGURE 6

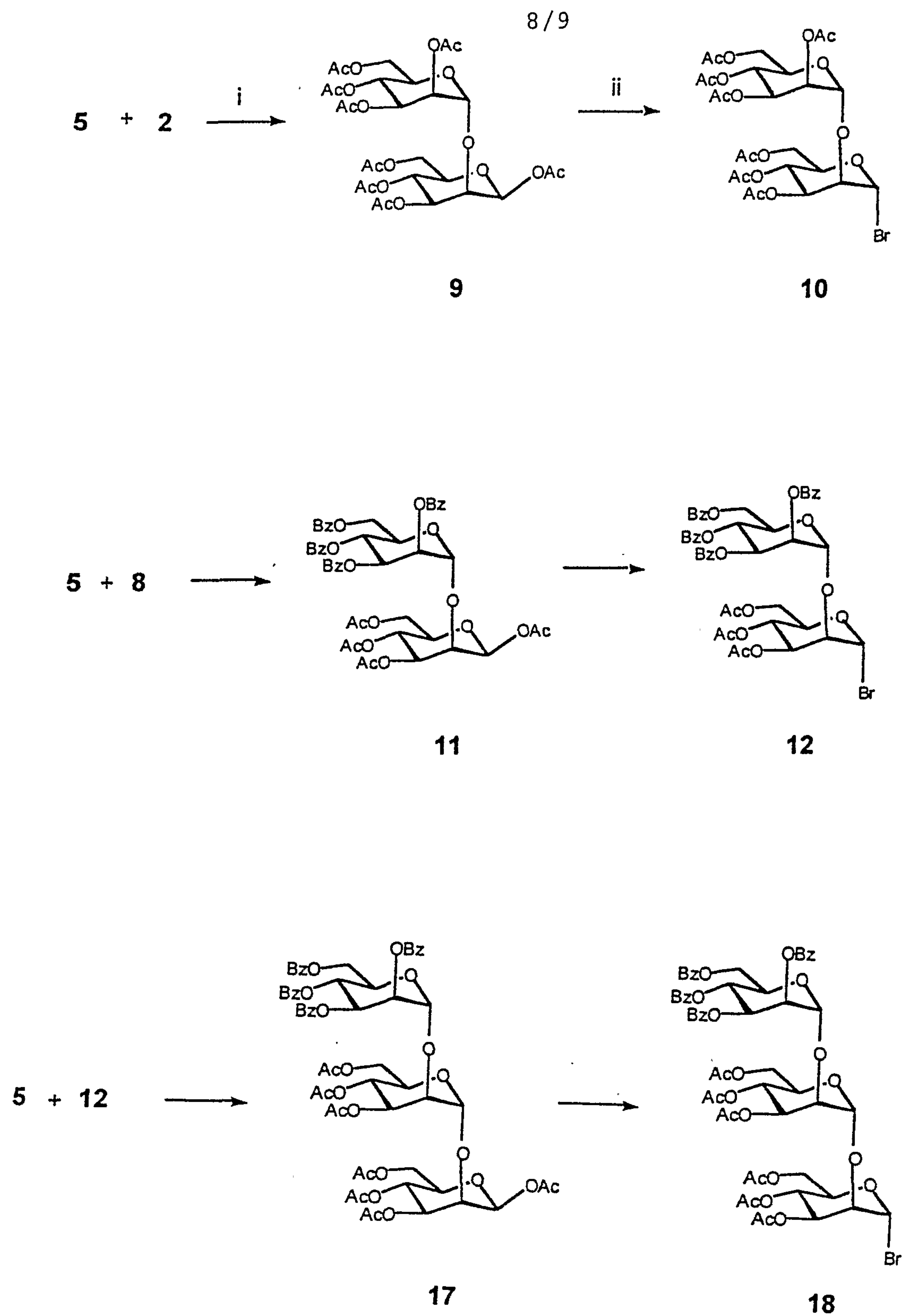


FIGURE 7a

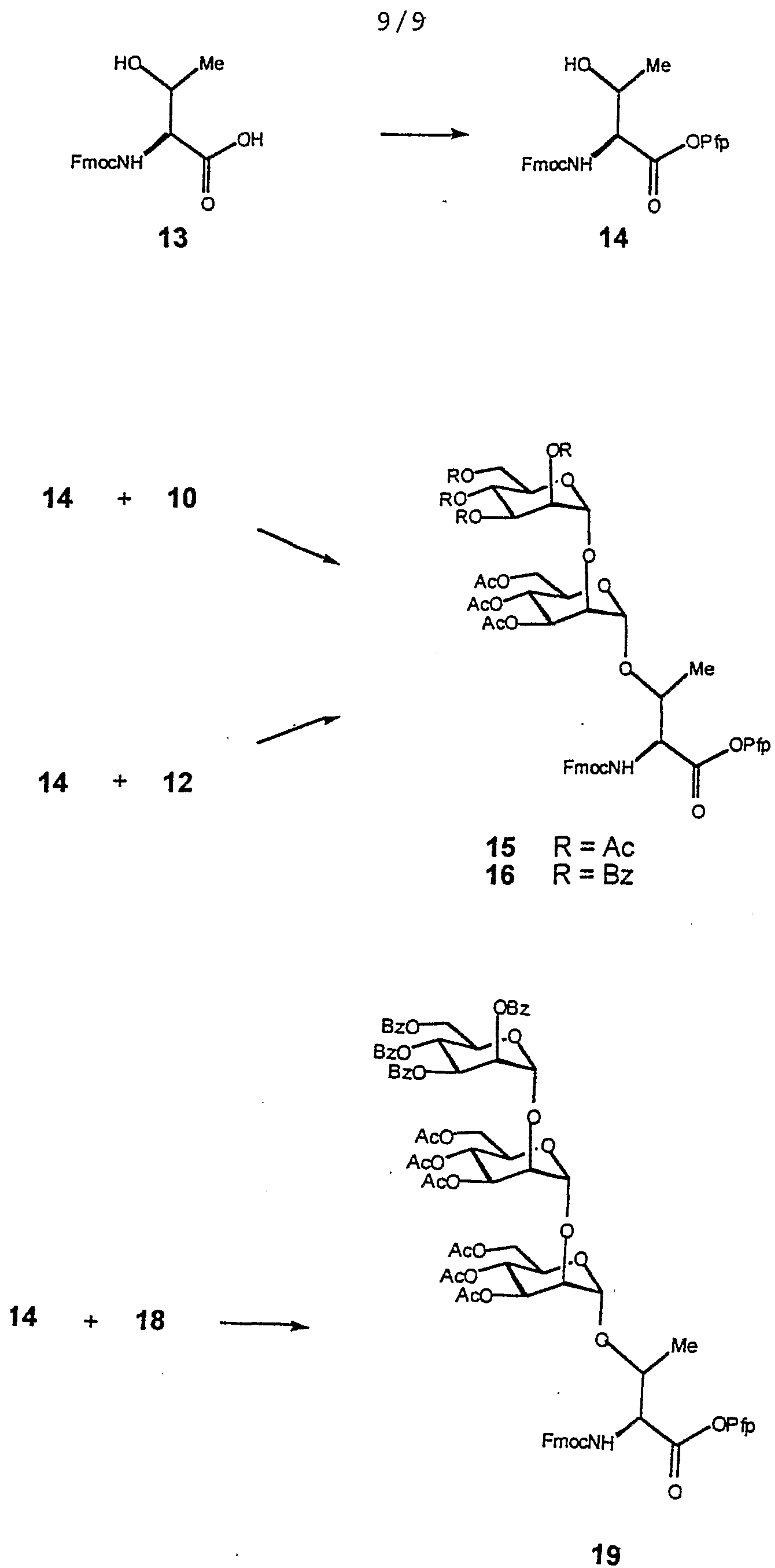


FIGURE 7b