



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

(11) 1025029 B1

(47) Date de délivrance : 10/10/2018

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 10/10/2018

(21) Numéro de demande : BE2017/5910

(22) Date de dépôt : 07/12/2017

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C07K 14/075, C12N 15/861, A61K 39/12, A61K 39/235

(30) Données de priorité :

09/12/2016 GB 1620968.6

(73) Titulaire(s) :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA
1330, RIXENSART
Belgique

(72) Inventeur(s) :

AMMENDOLA Virginia
80145 NAPLES
Italie

CAPONE Stefania
80145 NAPLES
Italie

COLLOCA Stefano
80145 NAPLES
Italie

FOLGORI Antonella
80145 NAPLES
Italie

MERONE Rosella
80145 NAPLES
Italie

(54) POLYNUCLEOTIDES ET POLYPEPTIDES D' ADENOVIRUS

(57) La présente invention concerne des séquences polynucléotidiques et polypeptidiques isolées, dérivées du nouvel adénovirus de chimpanzé ChAd157, ainsi que des polynucléotides recombinants, des vecteurs, des adénovirus, des cellules et des compositions comprenant lesdites séquences polynucléotidiques et polypeptidiques.

Figure 1A

	10	20	30	40	50	60	70	80																																																	
12_ChAd157	MKR	T	K	S	D	E	S	F	N	P	V	P	V	D	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T									
01_ChAd3	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
02_PanAd3	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
03_ChAd17	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
04_ChAd19	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
05_ChAd24	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
06_ChAd155	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
07_ChAd11	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
08_ChAd20	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
09_ChAd31	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
10_FanAd1	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T
11_PanAd2	MKR	R	K	T	S	D	E	S	N	P	V	V	P	V	F	L	T	P	F	V	S	D	F	E	S	P	G	V	L	S	I	N	L	A	E	P	L	V	T	Q	H	M	L	A	L	K	M	G	S	L	D	D	A	G	N	L	T

	90	100	110	120	130	140	150	160																																																	
12_ChAd157	Q	D	I	T	A	S	F	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	A	A	A	P	L	A	V	G	T	S	L	Q	H	A	K	L	T	A	T	K	G	P	L	V	S	E	G	K	L						
01_ChAd3	Q	D	I	T	A	S	F	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	A	A	A	P	L	A	V	G	T	S	L	Q	H	A	K	L	T	A	T	K	G	P	L	V	S	E	G	K	L						
02_PanAd3	Q	D	V	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A	P	L	A	V	G	T	S	L	Q	H	A	K	L	T	A	T	K	G	P	L	V	S	E	G	K	L
03_ChAd17	Q	D	I	T	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
04_ChAd19	Q	D	V	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																										
05_ChAd24	Q	D	V	T	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
06_ChAd155	Q	D	I	T	A	S	F	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
07_ChAd11	Q	D	V	T	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
08_ChAd20	Q	D	V	T	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
09_ChAd31	Q	D	I	T	A	S	F	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
10_PanAd1	Q	D	V	T	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									
11_PanAd2	Q	D	V	T	T	T	P	L	K	T	K	N	L	L	E	T	S	G	A	L	T	V	V	-	S	G	L	T	V	A	A	A																									

POLYNUCLEOTIDES ET POLYPEPTIDES D'ADENOVIRUS

DOMAINE DE L' INVENTION

La présente invention concerne des séquences 5 polynucléotidiques et polypeptidiques isolées, dérivées d'un nouvel adénovirus de chimpanzé ChAd157, ainsi que des polynucléotides recombinants, des vecteurs, des adénovirus, des cellules et des compositions comprenant lesdites séquences polynucléotidiques et 10 polypeptidiques.

CONTEXTE DE L' INVENTION

L'adénovirus a été largement utilisé dans des applications de transfert génique en raison de sa capacité à permettre un transfert de gènes très 15 efficace dans une variété de tissus cibles et d'une grande capacité de transgène. Classiquement, les gènes E1 d'adénovirus sont déletés et remplacés par une cassette transgénique constituée du promoteur choisi, d'une séquence d'ADNc du gène d'intérêt et d'un signal 20 poly A, résultant en un virus recombinant déficient pour sa réplication.

Les adénovirus recombinants sont utiles en thérapie génique et en tant que vaccins. Les vecteurs viraux basés sur des adénovirus de chimpanzé 25 représentent une alternative à l'utilisation de vecteurs adénoviraux d'origine humaine pour le développement de vaccins génétiques. Les adénovirus isolés de chimpanzés sont étroitement liés aux adénovirus isolés d'humains, tel que ceci est mis en 30 évidence par leur propagation efficace dans des cellules d'origine humaine. Cependant, étant donné que

les adénovirus humains et de chimpanzés sont de proches parents, une réactivité croisée sérologique entre les deux espèces virales est possible.

Il existe un besoin pour des vecteurs qui 5 délivrent efficacement des molécules à une cible et minimisent l'effet de l'immunité préexistante envers des sérotypes adénoviraux sélectionnés dans la population. Un aspect de l'immunité préexistante qui est observé chez les humains est l'immunité humorale, 10 qui peut résulter en la production et la persistance d'anticorps qui sont spécifiques des protéines adénovirales. La réponse humorale élicitée par l'adénovirus est principalement dirigée contre les trois protéines structurales majeures de la capsid : 15 la fibre, le penton et l'hexon.

RESUME DE L' INVENTION

La présente invention concerne un polynucléotide isolé, dans lequel le polynucléotide code pour un polypeptide sélectionné dans le groupe constitué de :

20 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ; et

25 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

30 L'invention concerne également un polynucléotide recombinant comprenant un polynucléotide sélectionné dans le groupe constitué de :

(a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ; et

5 (b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

10 L'invention concerne également un vecteur recombinant comprenant un polynucléotide sélectionné dans le groupe constitué de :

15 (a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ; et

20 (b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

L'invention concerne également un adénovirus recombinant comprenant au moins un polynucléotide ou un polypeptide sélectionné dans le groupe constitué de :

25 (a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ;

(b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente

une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1 ;

(c) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ; et

5 (d) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de
10 SEQ ID NO : 1.

La présente invention concerne également une composition comprenant au moins l'un de :

15 (a) un polynucléotide isolé qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ;

(b) un polynucléotide isolé qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO :
20 1 ;

(c) un polypeptide isolé ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ;

25 (d) un dérivé fonctionnel isolé d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides
30 aminés de SEQ ID NO : 1 ;

(e) un vecteur comprenant un polynucléotide tel que décrit en (a) ou (b) ci-dessus ; et

(f) un adénovirus recombinant comprenant un polynucléotide tel que décrit en (a) ou (b) ci-dessus, 5 et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention concerne également une cellule comprenant au moins l'un de :

10 (a) un polynucléotide isolé qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1,

15 (b) un polynucléotide isolé qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1 ;

(c) un vecteur comprenant un polynucléotide tel que décrit en (a) ou (b) ci-dessus, et

20 (d) un adénovirus recombinant comprenant un polynucléotide tel que décrit en (a) ou (b) ci-dessus.

L'invention concerne également un polypeptide adénoviral isolé, sélectionné dans le groupe constitué de :

25 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1 ; et

30 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur

toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figures 1A-1D - Alignement des séquences de la 5 protéine fibre des adénovirus simiens indiqués.

ChAd157 (SEQ ID NO : 1)
ChAd3 (SEQ ID NO : 27)
PanAd3 (SEQ ID NO : 28)
ChAd17 (SEQ ID NO : 29)
10 ChAd19 (SEQ ID NO : 30)
ChAd24 (SEQ ID NO : 31)
ChAd155 (SEQ ID NO : 7)
ChAd11 (SEQ ID NO : 32)
ChAd20 (SEQ ID NO : 33)
15 ChAd31 (SEQ ID NO : 34)
PanAd1 (SEQ ID NO : 35)
PanAd2 (SEQ ID NO : 36)

Figure 2 - Représentation schématique de la navette BAC du sous-groupe C

20 Figure 3 - Représentation schématique de la navette plasmidique du sous-groupe C

Figure 4 - Représentation schématique du vecteur pChAd157 ΔE1/Teto hCMV GAG

25 Figure 5 - Représentation schématique de la navette pARS SpeciesC Ad5orf6-2

Figure 6 - Représentation schématique du plasmide portant le ChAd157 RG

Figure 7 - Expression de transgènes par ChAd157/GAG, ChAd19/GAG et ChAd155/GAG

30 Figure 8 - Analyse par Western de lysats de cellules Hela infectées avec ChAd155/RG et ChAd157/RG

Figure 9 - Pouvoir immunologique de ChAd157/GAG, ChAd155/GAG et ChAd19 GAG chez des souris BALB/c

Figure 10 - Pouvoir immunologique de ChAd157/RG et ChAd155/RG chez des souris BALB/c

5 Figure 11 - Titres de neutralisation suivant la pré-immunisation de souris avec différents vecteurs ChAd

10 Figure 12 - ELISpot d'IFN γ suivant la vaccination de souris avec ChAd157/GAG après différents régimes de pré-immunisation

DESCRIPTION DES SEQUENCES

SEQ ID NO : 1 - Séquence polypeptidique de la fibre de ChAd157

15 SEQ ID NO : 2 - Séquence polynucléotidique codant pour la fibre de ChAd157

SEQ ID NO : 3 - Séquence polypeptidique du penton de ChAd157

SEQ ID NO : 4 - Séquence polynucléotidique codant pour le penton de ChAd157

20 SEQ ID NO : 5 - Séquence polypeptidique de l'hexon de ChAd157

SEQ ID NO : 6 - Séquence polynucléotidique codant pour l'hexon de ChAd157

25 SEQ ID NO : 7 - Séquence polypeptidique de la fibre de ChAd155

SEQ ID NO : 8 - Séquence polynucléotidique codant pour la fibre de ChAd155

SEQ ID NO : 9 - Séquence polypeptidique du penton de ChAd155

30 SEQ ID NO : 10 - Séquence polynucléotidique codant pour le penton de ChAd155

SEQ ID NO : 11 - Séquence polypeptidique de l'hexon de ChAd155

SEQ ID NO : 12 - Séquence polynucléotidique codant pour l'hexon de ChAd155

5 SEQ ID NO : 13 - Séquence polynucléotidique codant pour ChAd155 de type sauvage

SEQ ID NO : 14 - Séquence polynucléotidique de la navette BAC de sous-groupe C (#1365)

10 SEQ ID NO : 15 - Séquence polynucléotidique de pChAd157ΔE1 Teto hCMV RpsLKana#1551

SEQ ID NO : 16 - Séquence polynucléotidique de Gag du VIH

SEQ ID NO : 17 - Séquence polynucléotidique de pChAd157 ΔE1/Teto hCMV GAG#1557

15 SEQ ID NO : 18 - Séquence polynucléotidique de l'amorce 1 Ad5orf6

SEQ ID NO : 19 - Séquence polynucléotidique de l'amorce 2 Ad5orf6

20 SEQ ID NO : 20 - Séquence polynucléotidique de l'amorce 1 Fibre-polyA E4

SEQ ID NO : 21 - Séquence polynucléotidique de l'amorce 2 Fibre-polyA E4

SEQ ID NO : 22 - Séquence polynucléotidique de ChAd157 ΔE1E4_Ad5E4orf6/Teto hCMV RpsL-Kana#1594

25 SEQ ID NO : 23 - séquence polynucléotidique de la glycoprotéine de la rage

SEQ ID NO : 24 - Séquence polynucléotidique de pChAd157 ΔE1E4_Ad5E4orf6/Teto hCMV RG#1559

30 SEQ ID NO : 25 - Séquence polynucléotidique de l'amorce CMFFor

SEQ ID NO : 26 - Séquence polynucléotidique de l'amorce CMFrev

SEQ ID NO : 27 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd3

5 SEQ ID NO : 28 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de PanAd3

SEQ ID NO : 29 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd17

10 SEQ ID NO : 30 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd19

SEQ ID NO : 31 - séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd24

SEQ ID NO : 32 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd11

15 SEQ ID NO : 33 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd20

SEQ ID NO : 34 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de ChAd31

20 SEQ ID NO : 35 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de PanAd1

SEQ ID NO : 36 - Séquence d'acides aminés pour la protéine fibre de PanAd2

SEQ ID NO : 37 - Séquence polynucléotidique de hCMV(teto)

25 SEQ ID NO : 38 - Séquence polynucléotidique du plasmide navette #1376 de sous-groupe C

SEQ ID NO : 39 - Séquence polynucléotidique de de
BGH polyA

SEQ ID NO : 40 - Séquence polynucléotidique de
30 pARS SpeciesC Ad5orf6-2

SEQ ID NO : 41 - Séquence polynucléotidique de la sonde CMVFAM-TAMRA

SEQ ID NO : 42 - Séquence polynucléotidique codant pour le promoteur du hCMV

5 **DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION**

Les vecteurs, les compositions et les procédés de la présente invention peuvent présenter une ou plusieurs des caractéristiques suivantes améliorées par rapport à l'état de l'art, comprenant de manière non limitative une productivité plus élevée, une 10 immunogénicité améliorée, une expression accrue de transgènes ou un profil distinct de réactivité croisée sérologique.

Les vecteurs, les compositions et les procédés de la présente invention peuvent présenter une combinaison de propriétés, comme la productivité, l'immunogénicité, 15 l'expression de transgènes et/ou la réactivité croisée sérologique, ce qui signifie qu'ils constituent une alternative de valeur aux approches connues.

20

Adénovirus

Les adénovirus ont une morphologie caractéristique avec une capsid icosaédrique comprenant trois protéines majeures, l'hexon (II), la base du penton 25 (III) et une fibre à bouton (IV), conjointement à un certain nombre d'autres protéines mineures, VI, VIII, IX, IIIa et IVa2. Le génome du virus est un ADN double-brin linéaire. L'ADN viral est intimement associé à la protéine VII très basique et à un petit peptide pX 30 (anciennement dénommé mu). Une autre protéine, V, est empaquetée avec ce complexe ADN-protéine et fournit un

lien structural avec la capsidé via la protéine VI. Le virus contient également une protéase codée par le virus, qui est nécessaire pour traiter une partie des protéines structurales et produire le virus infectieux 5 mature.

Le génome d'adénovirus est bien caractérisé. L'organisation globale du génome adénoviral est généralement conservée concernant les cadres de lecture ouverts spécifiques positionnés de manière similaire, 10 e.g. l'emplacement des gènes E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 et L5 de chaque virus. Chaque extrémité du génome adénoviral comprend une séquence connue en tant que séquence répétée inversée terminale (ITR), qui est nécessaire pour la réplication virale. Le virus 15 comprend également une protéase codée par le virus, qui est nécessaire pour traiter une partie des protéines structurales requises pour produire les virions infectieux. La structure du génome adénoviral est décrite en se basant sur l'ordre dans lequel les gènes 20 viraux sont exprimés suivant la transduction de la cellule hôte. Plus spécifiquement, on fait référence aux gènes viraux comme aux gènes précoce (E) ou tardifs (L) selon que la transcription se produit avant ou après le début de la réplication de l'ADN. Dans la 25 phase précoce de la transduction, les gènes E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4 de l'adénovirus sont exprimés pour préparer la cellule hôte pour la réplication virale. Durant la phase tardive d'infection, l'expression des gènes tardifs L1-L5, qui codent pour les composants 30 structuraux des particules virales, est activée.

Les adénovirus sont spécifiques de l'espèce et des sérotypes différents, i.e. des types de virus qui ne sont pas neutralisés de manière croisée par des anticorps, ont été isolés d'une variété d'espèces de mammifères. Par exemple, plus de 50 sérotypes ont été isolés d'humains qui sont divisés en 6 sous-groupes (A-F ; B est sous-divisé en B1 et B2) en fonction de l'homologie de séquence et de leur capacité à agglutiner les globules rouges (Tatsis and Ertl Molecular Therapy (2004) 10 : 616, 629-629). De nombreux adénovirus ont été isolés de simiens non humains tels que les chimpanzés, les bonobos, les macaques rhésus et les gorilles, et ils sont classés dans les mêmes groupes humains en fonction des relations phylogénétiques basées sur les séquences des hexons ou des fibres (Colloca et al. (2012) Science Translational Medicine 4 : 1-9 ; Roy et al. (2004) Virology 324 : 361-372 ; Roy et al. (2010) Journal of Gene Medicine 13 : 17-25).

WO2005071093 décrit des adénovirus de chimpanzé, y compris ChAd19. WO2016198621 (PCT/EP2016/063329) décrit les adénovirus de chimpanzé ChAd155, et est intégré au présent document à titre de référence pour les fins de définition des vecteurs dérivés de ChAd155.

25

Protéines de capsidé adénovirale incluant la protéine fibre et polynucléotides codant pour ces protéines

30 Comme souligné ci-dessus, la capsidé adénovirale comprend trois protéines majeures, l'hexon, le penton et la fibre. L'hexon représente la majorité des composants structuraux de la capsidé, qui est

constituée de 240 capsomères d'hexon trimériques et de 12 bases du penton. L'hexon a trois doubles tonneaux conservés, alors que le dessus présente trois tours, chaque tour contenant une boucle de chaque sous-unité 5 qui forme la plupart de la capsid. La base de l'hexon est hautement conservée entre les sérotypes adénoviraux, alors que les boucles de surface sont variables (Tatsis and Ertl Molecular Therapy (2004) 10 : 616,629-629).

Le penton est une autre protéine de capsid 10 adénovirale qui forme une base pentamérique à laquelle la fibre s'attache. La protéine de fibre trimérique dépasse de la base du penton au niveau de chacun des 12 sommets de la capsid et est une structure de type tige à bouton. Une différence remarquable dans la surface 15 des capsides adénovirales par rapport à celles de la plupart des autres virus icosaédriques est la présence de la longue et fine protéine fibre. Le rôle principal de la protéine fibre est la fixation de la capsid virale à la surface de la cellule via son interaction 20 avec un récepteur cellulaire.

Les protéines fibres de nombreux sérotypes d'adénovirus partagent une architecture commune : une queue N-terminale, une tige centrale constituée de séquences répétées, et un domaine globulaire bouton C-terminal (ou « tête »). Le domaine de la tige centrale est constitué d'un nombre variable de répétitions bêta. Les répétitions bêta se lient pour former une structure allongée de trois brins en spirale enlacés qui est très rigide et stable. La tige relie la queue N-terminale à 25 la structure de bouton globulaire, qui est responsable de l'interaction avec le récepteur cellulaire cible. La 30

nature globulaire du domaine bouton de l'adénovirus présente de grandes surfaces de liaison du récepteur latéralement et au sommet. L'effet de cette architecture est de projeter le site de liaison du récepteur loin de la capsidé du virus, libérant ainsi le virus des contraintes stériques présentées par la surface de la capsidé relativement plate.

Bien que les fibres de nombreux sérotypes d'adénovirus aient la même architecture globale, elles ont des séquences d'acides aminés variables qui influencent leur fonction et leur structure. Par exemple, de nombreuses régions exposées sur la surface du bouton de la fibre présente un site de liaison du récepteur facilement adaptable. La forme globulaire du bouton de la fibre permet aux récepteurs de se lier au niveau des côtés du bouton ou sur le dessus du bouton de la fibre. Ces sites de liaison se trouvent typiquement sur les boucles exposées à la surface reliant les brins bêta qui sont faiblement conservées parmi les adénovirus humains. Les chaînes latérales exposées sur ces boucles donnent au bouton une variété de caractéristiques de surface tout en préservant la structure tertiaire et quaternaire. Par exemple, le potentiel électrostatique et les distributions de charges au niveau des surfaces du bouton peuvent varier en raison de la vaste gamme de points isoélectriques dans les séquences du bouton de la fibre, d'un π d'environ 9 pour Ad8, Ad 19, et Ad 37 à environ 5 pour les adénovirus du sous-groupe B. En tant que ligand viral complexe sur le plan structural, la protéine fibre permet la présentation d'une variété de surfaces

de liaison (bouton) dans un nombre d'orientations et de distances (tige) depuis la capsidé virale.

L'une des variations les plus évidentes entre certains sérotypes est la longueur de la fibre. Des 5 études ont mis en évidence que la longueur de la tige de la fibre influençait fortement l'interaction du bouton et du virus avec ses récepteurs cibles. De plus, la capacité à se plier des protéines fibres peut également varier entre les sérotypes. Bien que les 10 répétitions bêta dans la tige forment une structure hautement stable et régulière, des études par microscopie électronique (EM) ont mis en évidence des charnières distinctes dans la fibre. L'analyse de la séquence protéique de plusieurs fibres de sérotypes 15 adénoviraux montre une interruption dans les séquences répétées de la tige au niveau de la troisième répétition bêta à partir de la queue N-terminale, ce qui est fortement corrélé à l'une des charnières dans la tige, comme ceci est observé par microscopie électronique. Les charnières dans la fibre permettent 20 au bouton d'adopter une variété d'orientations par rapport à la capsidé virale, qui peuvent empêcher les encombres stériques à l'engagement du récepteur nécessitant la présentation correcte du site de liaison 25 du récepteur sur le bouton. Par exemple, les fibres rigides des adénovirus du sous-groupe D nécessitent ainsi un récepteur flexible ou un pré-positionné pour la fixation du virus, étant donné qu'ils sont incapables de se plier eux-mêmes. (Nicklin et al. 30 Molecular Therapy 2005 12 : 384-393)

L'identification des récepteurs cellulaires spécifiques de différents sérotypes d'Ad et la connaissance de la manière dont ils contribuent au tropisme tissulaire ont été permises par l'utilisation 5 de la technologie de pseudotypage par les fibres. Bien que les adénovirus de certains sous-groupes utilisent CAR en tant que récepteur primaire, il devient clair qu'un grand nombre d'adénovirus utilisent des récepteurs primaires alternatifs, conduisant à un tropisme largement différent *in vitro* et *in vivo*. Les 10 fibres de ces sérotypes présentent des différences nettes dans leurs structures primaires et tertiaires, telles que la rigidité de la tige de la fibre, la longueur de la tige de la fibre, et l'absence d'un site de liaison de CAR et/ou le motif putatif de liaison à HSPG, conjointement aux différences de charge nette à 15 l'intérieur du bouton de la fibre. Le pseudotypage de particules des Ad 5 avec une autre tige et un autre bouton de fibre fournit par conséquent la possibilité de supprimer d'importants domaines de liaison cellulaire et, en outre, peut permettre une délivrance plus efficace des transgènes (et potentiellement plus sélective des cellules) à des types de cellules définis par rapport à celle obtenue avec les Ad 5. La 20 neutralisation des particules d'Ad pseudotypées par les fibres peut également être réduite si les fibres utilisées proviennent d'adénovirus ayant une séroprévalence inférieure chez les humains ou les modèles expérimentaux, une situation qui favorise 25 l'administration fructueuse du vecteur (Nicklin *et al.* Molecular Therapy (2005) 12 : 384-393). En outre, une 30

fibre de longueur totale, ainsi que des régions de bouton de fibre isolées, mais pas l'hexon ou le penton seul, sont capables d'induire la maturation des cellules dendritiques et sont associées à l'induction 5 d'une puissante réponse des lymphocytes T CD8+ (Molinier-Frenkel et al. J. Biol. Chem. (2003) 278 : 37175-37182). Globalement, la fibre adénovirale joue un rôle important au moins dans la liaison aux récepteurs et l'immunogénicité des vecteurs adénoviraux.

10 L'alignement proposé sur la figure 1 illustre les différences entre les protéines fibres des adénovirus simiens du groupe C. Un élément frappant est que les séquences de la fibre de ces adénovirus peuvent être largement groupées en séquences ayant une fibre courte, 15 par exemple ChAd157, ou une fibre longue, par exemple ChAd155. Ce différentiel de longueur est dû à une délétion de 36 acides aminés à la position 321 approximativement dans la fibre courte par rapport à la fibre longue. En outre, il existe un certain nombre de substitutions d'acides aminés qui diffèrent entre le 20 sous-groupe fibre courte versus longue, mais qui restent cohérentes à l'intérieur de chaque sous-groupe. Bien que la fonction exacte de ces différences n'ait 25 pas encore été élucidée, étant donné la fonction et l'immunogénicité de la fibre, ces différences sont probablement pertinentes. Il a été mis en évidence que l'un des déterminants du tropisme viral était la longueur de la tige de la fibre. Il a été mis en évidence qu'un vecteur Ad5 avec une tige plus courte 30 avait une efficacité de liaison au récepteur CAR inférieure et une infectivité inférieure (Ambriović-

Ristov A. et al. : *Virology*. (2003) 312(2) : 425-33). Le postulat a été émis selon lequel cette déficience est le résultat d'une rigidité accrue de la fibre plus courte conduisant à une fixation moins efficace au 5 récepteur cellulaire (Wu, E. et al. : *J Virol*. (2003) 77(13) : 7225-7235).

Dans un aspect, l'invention concerne un polypeptide de fibre isolé d'adénovirus de chimpanzé ChAd157 et des polynucléotides isolés codant pour le 10 polypeptide de fibre de l'adénovirus de chimpanzé ChAd157.

On s'attend à ce que la protéine fibre contribue à une faible séroprévalence et à ce qu'elle puisse, ainsi, être utilisée indépendamment des polypeptides de 15 l'hexon et du penton de ChAd157 ou en combinaison (avec l'un ou l'autre ou les deux de l'hexon et du penton) pour supprimer l'affinité d'un adénovirus envers des anticorps neutralisants préexistants, e.g. pour fabriquer un adénovirus recombinant avec une 20 séroprévalence réduite. Un tel adénovirus recombinant peut être un adénovirus chimère avec des protéines de capsid de différents sérotypes avec au moins une protéine fibre de ChAd157.

La séquence polypeptidique de la fibre de ChAd157 25 est donnée dans SEQ ID NO : 1.

La séquence polypeptidique du penton de ChAd157 est donnée dans SEQ ID NO : 3.

La séquence polypeptidique de l'hexon de ChAd157 est donnée dans SEQ ID NO : 5.

Polypeptides, adénovirus recombinants, compositions ou cellules comprenant des séquences polypeptidiques de la fibre de ChAd157 ou un dérivé fonctionnel de celle-ci

De manière adaptée, le polypeptide isolé, 5 l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule de l'invention comprennent un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1.

Le polypeptide, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule de l'invention peuvent comprendre un polypeptide qui est un dérivé fonctionnel 10 d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec 15 la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

En variante, le dérivé fonctionnel n'a pas plus d'une addition, d'une délétion ou d'une substitution relativement à SEQ ID NO : 1, par exemple une substitution par rapport à SEQ ID NO : 1.

20 De manière adaptée, le polypeptide, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule selon l'invention comprend en outre :

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ; ou

25 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 60 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de 30 SEQ ID NO : 3,

et/ou

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 ; ou

(b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5, dans 5 lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 60 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5.

De manière adaptée, le dérivé fonctionnel d'un 10 polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 70 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3, comme d'au moins 80 %, en particulier d'au moins 90 %, par 15 exemple d'au moins 95 % ou d'au moins 98 %.

De manière adaptée, le dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 70 % sur toute sa longueur avec 20 la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5, comme d'au moins 80 %, en particulier d'au moins 90 %, par exemple d'au moins 95 % ou d'au moins 98 %.

En particulier, le polypeptide, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule selon 25 l'invention comprend en outre :

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ; et/ou

(b) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5.

Polynucléotides isolés, vecteurs, adénovirus recombinants, compositions ou cellules comprenant des polynucléotides codant pour la fibre de ChAd157 ou un dérivé fonctionnel de celle-ci

5 De manière adaptée, le polynucléotide isolé, le vecteur, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule de l'invention comprennent un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1. De manière adaptée, le 10 polynucléotide a une séquence selon SEQ ID NO : 2.

Lorsque le polynucléotide isolé, le vecteur, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule de l'invention comprend un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la 15 séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1, le polynucléotide a, de manière adaptée, une séquence selon SEQ ID NO : 2 dans laquelle un codon 20 a été ajouté, déleté ou modifié pour coder pour un acide aminé différent.

De manière adaptée, le polynucléotide, le vecteur, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule 25 de l'invention comprend en outre un polynucléotide codant pour :

- (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ; ou
- (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant 30 la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides

aminés qui présente une identité d'au moins 60 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3,

et/ou

5 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 ; ou

10 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 60 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5.

15 De manière adaptée, le dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 70 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3, comme d'au moins 80 %, en particulier d'au moins 90 %, par exemple d'au moins 95 % ou d'au moins 98 %.

20 De manière adaptée, le dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 70 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5, comme d'au moins 80 %, en particulier d'au moins 90 %, par exemple d'au moins 95 % ou d'au moins 98 %.

25 En particulier, le polynucléotide, le vecteur, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule de l'invention comprend en outre un polynucléotide codant pour :

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ; et/ou

(b) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5.

5 Le polynucléotide, le vecteur, l'adénovirus recombinant, la composition ou la cellule de l'invention peut en outre comprendre :

(a) un polynucléotide selon SEQ ID NO : 4 ; et/ou

(b) un polynucléotide selon SEQ ID NO : 6.

10

Squelettes de ChAd157

L'invention concerne des séquences polynucléotidiques isolées d'adénovirus de chimpanzé ChAd157, y compris celles de ChAd157 non modifié de type sauvage et des constructions de squelette modifiées de ChAd157. Ces constructions de squelette modifiées comprennent celles proposées dans les exemples, par exemple pChAd157ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 (SEQ ID NO : 15) et ChAd157 20 ΔE1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594 (SEQ ID NO : 22). Les squelettes de ChAd157 peuvent être utilisés dans la construction d'adénovirus recombinants compétents pour la réplication ou incompétents pour la réplication, par exemple pour la délivrance de 25 transgènes.

L'annotation de la séquence de pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG (SEQ ID NO : 17) est donnée ci-dessous.

30

Annotations ChAd157DE1_TetOOhCMV_GAG

IX 3187..3651

IVa2 Complement (3710..5045, 5325..5337)

Pol Complement (4816..8397, 13762..13770)

VA RNAI 10230..10391

5 pTP Complement (8196..10199, 13762..13770)

48K 10652..11914

pIIIa 11938..13714

III 13807..15588

pVII 15603..16199

V 16275..17390

pX 17415..17660

pVI 17750..18508

Hexon 18623..21499

Protease 21529..22158

DBP Complement (22274..23926)

92K 23976..26447

10 22K 26164..26739

33K Join(26164..26473, 26679..27061)

E2e promoter Complement (27027..27274)

pVIII 27136..27819

E3 12K 27820..28137

E3 CR1-alphap0 28635..28835

E3 gp18K 28838..29329

E3A 11K 30776..31072

E3 RID alpha 31084..31356

E3 RID beta 31359..31757

E3 15K 31750..32136

15 U exon Complement (32167..32331)

fibre 32342..33973

E4 ORF6/7 Complement (34181..34456, 35168..35341)

E4 ORF6 Complement (34457..35341)

E4 ORF4 Complement (35241..35606)

E4 ORF3 Complement (35622..35969)

E4 ORF2 Complement (35966..36358)

20 E4 ORF1 Complement (36411..36797)

Dans un mode de réalisation, les fragments des séquences de SEQ ID NO : 15, 22 et leurs brins complémentaires, leur ADNC et leur ARN complémentaires sont proposés. De manière adaptée, les fragments sont d'une longueur d'au moins 15 nucléotides, de manière plus adaptée d'une longueur de 30 nucléotides, de manière plus adaptée d'une longueur de 60 nucléotides, de manière plus adaptée d'une longueur de 120 nucléotides, de manière plus adaptée de 240, de manière plus adaptée d'une longueur de 480 nucléotides et comprennent des fragments fonctionnels, en d'autres

termes, des fragments qui présentent un intérêt biologique. Par exemple, un fragment fonctionnel peut exprimer un produit adénoviral voulu ou peut être utile dans la production de vecteurs viraux recombinants. De 5 tels fragments comprennent les séquences géniques proposées dans la liste ci-dessous. Dans certains modes de réalisation, les séquences isolées de SEQ ID NO : 15, 22 et leurs brins complémentaires, leur ADNc et leur ARN complémentaires sont proposés.

10 Les produits géniques de l'adénovirus ChAd157, par exemple les protéines, les enzymes, et les fragments de celui-ci, qui sont codés par les acides nucléiques adénoviraux, et les fragments susmentionnés de ceux-ci, décrits dans le présent document sont proposés. De 15 telles protéines comprennent celles codées par les cadres de lecture ouverts identifiés ci-dessus et les protéines codées par les polynucléotides proposés dans le Listage des Séquences.

20 Autres polynucléotides et polypeptides de ChAd157

Dans certains modes de réalisation, le polynucléotide de l'invention comprend un polynucléotide codant pour un polypeptide de la fibre ; un polypeptide de l'hexon et un polypeptide de la fibre ; un polypeptide du penton et un polypeptide de la fibre ; ou un polypeptide de l'hexon, un polypeptide du penton et un polypeptide de la fibre de l'invention ; et peut en outre comprendre des polynucléotides adénoviraux supplémentaires, de manière adaptée des 25 polynucléotides de ChAd157. Ainsi, de manière adaptée, 30

le polynucléotide selon l'invention comprend un ou plusieurs des suivants :

- (a) une séquence répétée inversée terminale en 5' (ITR) adénovirale ;
- 5 (b) une région E1A adénovirale, ou un fragment de celle-ci sélectionné parmi les régions E1A_280R et E1A_243R ;
- 10 (c) une région E1B ou IX adénovirale, ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué des régions E1B_19K, E1B_55K et IX ;
- (d) une région E2B adénovirale ; ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué des régions E2B_pTP, E2B_polymérase et E2B_IVa2 ;
- 15 (e) une région L1 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué des protéines L1_13.6K, L1_52K et L1_pIIIa ;
- (f) une région adénovirale L2 ou une région L2 comprenant un polynucléotide codant pour la protéine 20 penton de l'invention, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L2_penton, de la protéine L2_pvII, de la protéine L2_V et de la protéine L2_pX ;
- 25 (g) une région adénovirale L3 ou une région L3 comprenant un polynucléotide codant pour la protéine hexon de l'invention, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L3_pvVI, de la protéine L3_hexon et de la protéine L3_protéase ;

(h) une région E2A adénovirale ;

5 (i) une région L4 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L4_100k, de la protéine L4_33K, de la protéine L4_22K et de la protéine L4_VIII ;

10 (j) une région E3 adénovirale, ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué de ORF1 d'E3, ORF2 d'E3, ORF3 d'E3, ORF4 d'E3, ORF5 d'E3, ORF6 d'E3, ORF7 d'E3, ORF8 d'E3, et ORF9 d'E3 ;

(k) une région L5 adénovirale ou une région L5 comprenant un polynucléotide codant pour le polypeptide de la fibre L5_fibre de l'invention ;

15 (l) une région E4 adénovirale (par exemple d'Ad5), ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué de ORF7 d'E4, ORF6 d'E4, ORF4 d'E4, ORF3 d'E4, ORF2 d'E4, et ORF1 d'E4 ; en particulier de ORF6 de ladite région E4 ;

20 (m) une région 3'-ITR adénovirale ; et/ou

(n) une région d'ARN adénoviral VAI ou VAI, de préférence une région d'ARN adénoviral VAI ou VAI d'un adénovirus autre que ChAd157, de manière davantage préférée d'Ad5.

25 Définitions

De manière adaptée, les polynucléotides ou polypeptides de l'invention sont isolés. Un polynucléotide « isolé » est un polynucléotide qui est extrait de son environnement original. Par exemple, un polynucléotide présent naturellement est isolé s'il est séparé de tout ou partie des matières co-existantes

dans le système naturel. On considère qu'un polynucléotide est isolé si, par exemple, il est cloné dans un vecteur qui ne fait pas partie de son environnement naturel ou s'il est compris dans un ADNc.

5 De manière adaptée, les polynucléotides de l'invention sont recombinants. Recombinant signifie que le polynucléotide est le produit d'au moins l'une des étapes de clonage, de restriction ou de ligature, ou autres procédures qui aboutissent à un polynucléotide 10 qui est distinct d'un polynucléotide que l'on rencontre dans la nature. Un adénovirus recombinant est un adénovirus comprenant un polynucléotide recombinant. Un vecteur recombinant est un vecteur comprenant un polynucléotide recombinant. Un « virus recombinant » 15 comprend la progéniture du virus recombinant original. Un « vecteur recombinant » comprend des réplicats du vecteur recombinant original. Un « polynucléotide recombinant » comprend les réplicats du polynucléotide recombinant original.

20 De manière adaptée, la séquence polypeptidique de la présente invention contient au moins une modification par rapport à une séquence native. De manière adaptée, les séquences polynucléotidiques de la présente invention contiennent au moins une 25 modification par rapport à une séquence native. Par exemple, un polynucléotide introduit par des techniques de génie génétique dans un plasmide ou un vecteur dérivé d'une espèce différente (et souvent d'un genre, d'une sous-famille ou d'une famille différents) est un 30 polynucléotide hétérologue. Un promoteur extrait de sa séquence codante native et fonctionnellement lié à une

séquence codante avec laquelle on ne le retrouve pas naturellement lié est un promoteur hétérologue. Un site de recombinaison spécifique qui a été cloné dans un génome d'un virus ou d'un vecteur viral, dans lequel le 5 génome du virus ne le contient pas naturellement, est un site de recombinaison hétérologue. Une séquence d'acide nucléique hétérologue comprend également une séquence naturellement retrouvée dans un génome adénoviral, mais située au niveau d'une position non 10 native à l'intérieur du vecteur adénoviral.

Typiquement, « hétérologue » signifie dérivé d'une entité génotypiquement distincte de celle du reste de l'entité avec laquelle est réalisée la comparaison. Une séquence d'acide nucléique hétérologue fait référence à 15 une séquence d'acide nucléique qui n'est pas isolée de, dérivée de, ou basée sur une séquence d'acide nucléique naturelle du vecteur adénoviral. Une séquence protéique hétérologue fait référence à toute séquence protéique qui n'est pas isolée de, dérivée de, ou basée sur une 20 séquence protéique naturelle du vecteur adénoviral. « Naturelle » signifie une séquence rencontrée dans la nature et pas synthétiquement préparée ou modifiée. Une séquence est « dérivée » d'une source lorsqu'elle est isolée d'une source mais modifiée (par exemple, par 25 délétion, substitution (mutation), insertion, ou autre modification) de manière adaptée de façon à ne pas perturber la fonction normale du gène source.

Un « dérivé fonctionnel » d'un polypeptide fait de manière adaptée référence à une version modifiée d'un 30 polypeptide, par exemple, dans laquelle un ou plusieurs acides aminés du polypeptide peuvent être délétés,

insérés, modifiés et/ou substitués. Un dérivé d'une protéine de capsidé adénovirale non modifiée est considéré fonctionnel si, par exemple :

5 (a) un adénovirus comprenant le dérivé d'une protéine de capsidé à l'intérieur de sa capsidé conserve sensiblement la même séroprévalence ou une séroprévalence inférieure par rapport à un adénovirus comprenant la protéine de capsidé non modifiée, et/ou

10 (b) un adénovirus comprenant le dérivé d'une protéine de capsidé à l'intérieur de sa capsidé conserve sensiblement la même infectivité de la cellule hôte ou une infectivité de la cellule hôte supérieure par rapport à un adénovirus comprenant la protéine de capsidé non modifiée, et/ou

15 (c) un adénovirus comprenant le dérivé d'une protéine de capsidé à l'intérieur de sa capsidé conserve sensiblement la même immunogénicité ou une immunogénicité supérieure par rapport à un adénovirus comprenant la protéine de capsidé non modifiée, et/ou

20 (d) un adénovirus comprenant le dérivé d'une protéine de capsidé à l'intérieur de sa capsidé conserve sensiblement le même niveau, ou un niveau supérieur, de productivité de transgènes comparé à un adénovirus comprenant la protéine de capsidé non modifiée.

Les propriétés (a) à (d) ci-dessus peuvent de manière adaptée être mesurées en utilisant les procédés décrits dans la section Exemples ci-après.

30 De manière adaptée, le polypeptide, le vecteur ou l'adénovirus recombinant a une faible séroprévalence dans la population humaine. « Faible séroprévalence »

peut signifier avoir un niveau d'anticorps neutralisant préexistant réduit comparé à l'adénovirus humain 5 (Ad5). De manière similaire ou en variante, « faible séroprévalence » peut signifier une séroprévalence 5 inférieure à environ 20 %, une séroprévalence inférieure à environ 15 %, une séroprévalence inférieure à environ 10 %, une séroprévalence inférieure à environ 5 %, une séroprévalence inférieure à environ 4 %, une séroprévalence inférieure à environ 10 3 %, une séroprévalence inférieure à environ 2 %, une séroprévalence inférieure à environ 1 %, ou une absence de séroprévalence détectable. La séroprévalence peut être mesurée comme le pourcentage d'individus ayant un 15 titre de neutralisation cliniquement pertinent (défini comme un titre de neutralisation de 50 % > 200) en utilisant les procédés décrits dans Aste-Amézaga *et al.*, Hum. Gene Ther. (2004) 15(3) : 293-304.

Les termes polypeptide, peptide et protéine sont utilisés de manière interchangeable dans le présent 20 document.

Le terme « simien » est typiquement entendu comme comprenant les primates non humains, par exemple les singes de l'Ancien Monde, les singes du Nouveau Monde, les grands singes et les gibbons. Simien peut en 25 particulier faire référence à des grands singes non humains tels que les chimpanzés (*Pan troglodyte*), les bonobos (*Pan paniscus*) et les gorilles (genre *Gorilla*). Les simiens autres que les grands singes peuvent inclure les macaques rhésus (*Macaca mulatta*).

Comparaison de séquences

Pour des fins de comparaison de deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques étroitement proches, le « % d'identité » entre une première 5 séquence et une seconde séquence peut être calculé en utilisant un programme d'alignement, tel que BLAST® (disponible à l'adresse suivante blast.ncbi.nlm.nih.gov, dernier accès 09 mars 2015) en utilisant les paramètres standard. Le pourcentage d'identité est le nombre de 10 résidus identiques divisé par le nombre de résidus dans la séquence de référence, multiplié par 100. Les valeurs de pourcentage d'identité auxquelles il est fait référence ci-dessus et dans les revendications sont des pourcentages calculés par cette méthodologie. 15 Une variante de définition du pourcentage d'identité est le nombre de résidus identiques divisés par le nombre de résidus alignés, multiplié par 100. Des méthodes alternatives comprennent l'utilisation d'une méthode des trous (gaps) dans laquelle des trous dans 20 l'alignement, par exemple des délétions dans une séquence par rapport à l'autre séquence, sont pris en compte par un score de trous ou un coût de trous dans le paramètre de score. Pour plus d'informations, voir la fiche technique de BLAST® disponible à l'adresse 25 suivante

ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf, dernier accès le 09 mars 2015.

Les séquences qui conservent la fonctionnalité du polynucléotide ou d'un polypeptide codé ainsi sont 30 susceptibles de présenter une plus grande identité. On considère que les séquences polypeptidiques ou

polynucléotidiques sont les mêmes que, ou identiques aux, autres séquences polypeptidiques ou polynucléotidiques, si elles partagent une identité de 100 % sur leur longueur totale.

5 Une « différence » entre des séquences fait référence à une insertion, une délétion ou une substitution d'un résidu acide aminé unique à une position de la seconde séquence, comparé à la première séquence. Deux séquences polypeptidiques peuvent 10 contenir une, deux ou plus de ces différences d'acides aminés. Les insertions, délétions ou substitutions dans une seconde séquence qui est autrement identique (identité de séquence de 100 %) à une première séquence résultent en un pourcentage d'identité de séquence 15 réduit. Par exemple, si les séquences identiques sont d'une longueur de 9 acides aminés, une substitution dans la seconde séquence résulte en une identité de séquence de 88,9 %. Si les séquences identiques sont d'une longueur de 17 acides aminés, deux substitutions 20 dans la seconde séquence résultent en une identité de séquence de 88,2 %. Si les séquences identiques sont d'une longueur de 7 acides aminés, trois substitutions dans la seconde séquence résultent en une identité de séquence de 57,1 %. Si les première et seconde 25 séquences polypeptidiques sont d'une longueur de 9 résidus acides aminés et partagent 6 résidus identiques, les première et seconde séquences polypeptidiques partagent une identité supérieure à 66 % (les première et seconde séquences polypeptidiques partagent une 30 identité de 66,7 %). Si les première et seconde séquences polypeptidiques sont d'une longueur de 17

résidus acides aminés et partagent 16 résidus identiques, les première et seconde séquences polypeptidiques partagent une identité supérieure à 94 % (les première et seconde séquences polypeptidiques 5 partagent une identité de 94,1 %). Si les première et seconde séquences polypeptidiques sont d'une longueur de 7 résidus acides aminés et partagent 3 résidus identiques, les première et seconde séquences polypeptidiques partagent une identité supérieure à 42 % 10 (les première et seconde séquences polypeptidiques partagent une identité de 42,9 %).

Alternativement, pour les fins de comparaison d'une première séquence polypeptidique de référence à une seconde séquence polypeptidique de comparaison, le 15 nombre d'ajouts, de substitutions et/ou de délétions apportés à la première séquence pour produire la seconde séquence peut être vérifié. Une addition est l'addition d'un résidu acide aminé dans la séquence du premier polypeptide (y compris une addition au niveau 20 de l'une ou l'autre des extrémités terminales du premier polypeptide). Une substitution est la substitution d'un résidu acide aminé dans la séquence du premier polypeptide par un résidu acide aminé différent. Une délétion est la délétion d'un résidu 25 acide aminé de la séquence du premier polypeptide (y compris une délétion au niveau de l'une ou l'autre des extrémités terminales du premier polypeptide).

Pour les fins de comparaison d'une première séquence polynucléotidique de référence à une seconde 30 séquence polynucléotidique de comparaison, le nombre d'additions, de substitutions et/ou de délétions

apportées à la première séquence pour produire la seconde séquence peut être vérifié. Une addition est l'addition d'un résidu nucléotidique dans la séquence du premier polynucléotide (y compris une addition au 5 niveau de l'une ou l'autre des extrémités terminales du premier polypeptide). Une substitution est la substitution d'un résidu nucléotidique dans la séquence du premier polynucléotide avec un résidu nucléotidique différent. Une délétion est la délétion d'un résidu 10 nucléotidique de la séquence du premier polynucléotide (y compris une délétion au niveau de l'une ou l'autre des extrémités terminales du premier polynucléotide).

De manière adaptée, les substitutions dans les séquences de la présente invention peuvent être des 15 substitutions conservatives. Une substitution conservative comprend la substitution d'un acide aminé par un autre acide aminé ayant une propriété chimique similaire à l'acide aminé qui est substitué (voir, par exemple, Stryer *et al.*, *Biochemistry*, 5th Edition 2002, 20 pages 44-49). De préférence, la substitution conservative est une substitution sélectionnée dans le groupe constitué de : (i) une substitution d'un acide aminé basique par un autre acide aminé basique différent ; (ii) une substitution d'un acide aminé 25 acide par un autre acide aminé acide différent ; (iii) une substitution d'un acide aminé aromatique par un autre acide aminé aromatique différent ; (iv) une substitution d'un acide aminé aliphatique non polaire par un autre acide aminé aliphatique non polaire différent ; et (v) une substitution d'un acide aminé 30 non chargé, polaire par un autre acide aminé non chargé,

polaire différent. Un acide aminé basique est de préférence sélectionné dans le groupe constitué de l'arginine, de l'histidine, et de la lysine. Un acide aminé acide est de préférence l'aspartate ou le glutamate. Un acide aminé aromatique est de préférence sélectionné dans le groupe constitué de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane. Un acide aminé aliphatique non polaire est de préférence sélectionné dans le groupe constitué de la glycine, de lalanine, de la valine, de la leucine, de la méthionine et de l'isoleucine. Un acide aminé non chargé, polaire est de préférence sélectionné dans le groupe constitué de la sérine, de la thréonine, de la cystéine, de la proline, de l'asparagine et de la glutamine. Contrairement à une substitution d'acide aminé conservative, une substitution d'acide aminé non conservative est l'échange d'un acide aminé par tout autre acide aminé qui ne tombe pas dans les substitutions conservatives (i) à (v) soulignées ci-dessus.

Vecteurs et adénovirus recombinants

Les séquences de ChAd157 de l'invention sont utiles en tant qu'agents thérapeutiques et dans la construction d'une variété de systèmes de vecteurs, d'adénovirus recombinants et de cellules hôtes. De manière appropriée, le terme « vecteur » fait référence à un acide nucléique qui a été sensiblement modifié (par exemple, un gène ou une région fonctionnelle qui a été délétré et/ou inactivé) par rapport à une séquence de type sauvage et/ou incorpore une séquence

hétérologue, en d'autres termes, un acide nucléique obtenu d'une source différente (également dénommé un « insert »), et répliquant et/ou exprimant la séquence polynucléotidique insérée, quand il est introduit dans 5 une cellule (par exemple, une cellule hôte). Par exemple, l'insert peut être la totalité ou partie des séquences de ChAd157 décrites dans le présent document. En outre ou en variante, un vecteur de ChAd157 peut être un adénovirus ChAd157 comprenant une ou plusieurs 10 délétions ou inactivations de gènes viraux, par exemple E1 ou autre gène viral ou région fonctionnelle décrit ici. Un tel ChAd157, qui peut ou non comprendre une séquence hétérologue, est souvent dénommé « squelette » et peut être utilisé tel quel ou comme point de départ 15 à des modifications supplémentaires du vecteur.

Un vecteur peut être toute molécule d'acide nucléique appropriée y compris de l'ADN nu, un plasmide, un virus, un cosmide, un vecteur phage tel qu'un vecteur lambda, un chromosome artificiel tel qu'un BAC 20 (chromosome bactérien artificiel), ou un épisome. En variante, un vecteur peut être une unité de transcription et/ou d'expression pour la transcription ou l'expression *in vitro* acellulaire, par exemple un système T7 compatible. Les vecteurs peuvent être 25 utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres séquences adénovirales ou fragments, ou en combinaison avec des éléments provenant de séquences non adénovirales. Les séquences de ChAd157 sont également utiles dans des vecteurs de délivrance antisens, des 30 vecteurs de thérapie génique, ou des vecteurs de vaccin. Ainsi, l'invention concerne également des vecteurs de

délivrance de gènes, et des cellules hôtes qui contiennent les séquences de ChAd157.

Le terme adénovirus « compétent pour la réPLICATION » fait référence à un adénovirus qui peut 5 se répliquer dans une cellule hôte en l'absence de toute protéine auxiliaire recombinante comprise dans la cellule. De manière adaptée, un adénovirus « compétent pour la réPLICATION » comprend les gènes précoces essentiels suivants, intacts ou fonctionnels : E1A, E1B, 10 E2A, E2B, E3 et E4. Les adénovirus de type sauvage isolés d'un animal particulier seront compétents pour la réPLICATION dans cet animal.

Le terme adénovirus « incompétent pour la réPLICATION » ou « déficient pour la réPLICATION » fait 15 référence à un adénovirus qui est incapable de réPLICATION parce qu'il a été modifié pour comprendre au moins une délétion fonctionnelle (ou mutation « perte de fonction »), en d'autres termes une délétion ou une mutation qui détériore la fonction d'un gène 20 sans la supprimer complètement, par exemple, l'introduction de codons stop artificiels, la délétion ou la mutation de sites actifs ou de domaines d'interaction, la mutation ou la délétion d'une séquence de régulation d'un gène, etc. ou un retrait 25 complet d'un gène codant pour un produit génique qui est essentiel pour la réPLICATION virale, par exemple un ou plusieurs gènes adénoviraux sélectionnés parmi E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4 (par exemple ORF1 d'E3, ORF2 d'E3, ORF3 d'E3, ORF4 d'E3, ORF5 d'E3, ORF6 d'E3, 30 ORF7 d'E3, ORF8 d'E3, ORF9 d'E3, ORF7 d'E4, ORF6 d'E4, ORF4 d'E4, ORF3 d'E4, ORF2 d'E4 et/ou ORF1 d'E4). De

manière particulièrement adaptée, E1 et facultativement E3 et/ou E4 sont délétrées. En cas de délétion, la région génique délétrée susmentionnée ne sera, de manière adaptée, pas prise en considération dans 5 l'alignement lors de la détermination du pourcentage d'identité relativement à une autre séquence.

La présente invention concerne des vecteurs tels que des adénovirus recombinants qui délivrent une protéine, de manière adaptée une protéine hétérologue, 10 aux cellules, pour des fins thérapeutiques ou vaccinales. Un vecteur peut comprendre tout élément génétique comprenant de l'ADN nu, un phage, un transposon, un cosmid, un épisome, un plasmide, ou un virus. De tels vecteurs contiennent de l'ADN de ChAd157 15 tel que décrit ici et un minigène. Par « minigène » (ou « cassette d'expression ») on entend la combinaison d'un gène hétérologue sélectionné (transgène) et des autres éléments régulateurs nécessaires pour diriger la traduction, la transcription et/ou l'expression du 20 produit génique dans une cellule hôte.

Typiquement, un vecteur adénoviral dérivé de ChAd157 est conçu de manière à ce que le minigène se trouve dans une molécule d'acide nucléique qui contient d'autres séquences adénovirales dans la région native 25 d'un gène adénoviral choisi. Le minigène peut être inséré dans une région génique existante pour perturber la fonction de cette région, si souhaité. En variante, le minigène peut être inséré dans le site d'un gène adénoviral partiellement ou totalement délétré. Par 30 exemple, le minigène peut se situer sur le site d'une mutation, d'une insertion ou d'une délétion, qui rend

non fonctionnel au moins un gène d'une région génomique sélectionnée dans le groupe constitué de E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4. Le terme « rend non fonctionnel » signifie qu'une quantité suffisante de la région génomique est supprimée ou autrement perturbée, de manière à ce que la région génomique ne soit plus capable de produire des produits fonctionnels d'expression génomique. Si souhaité, la totalité de la région génomique peut être retirée (et de manière appropriée remplacée 10 par le minigène).

Par exemple, pour un vecteur de production utile pour la génération d'un virus recombinant, le vecteur peut contenir le minigène et soit l'extrémité 5' du génome adénoviral soit l'extrémité 3' du génome 15 adénoviral, ou à la fois l'extrémité 5' et l'extrémité 3' du génome adénoviral. L'extrémité 5' du génome adénoviral contient les éléments cis en 5' nécessaires pour l'empaquetage et la réPLICATION ; en d'autres termes, les séquences ITR en 5' (qui fonctionnent comme 20 les origines de réPLICATION) et les domaines amplificateurs d'empaquetage en 5' natifs (qui contiennent les séquences nécessaires pour l'empaquetage des génomes d'Ad linéaires et des éléments amplificateurs pour le promoteur E1). 25 L'extrémité 3' du génome adénoviral contient les éléments cis en 3' (y compris les ITR) nécessaires pour l'empaquetage et l'encapsidation. De manière adaptée, un adénovirus recombinant contient les éléments cis adénoviraux en 5' et en 3' et le minigène (contenant de 30 manière appropriée un transgène) se trouve entre les séquences adénovirales en 5' et en 3'. Un vecteur

adénoviral basé sur ChAd157 peut également contenir d'autres séquences adénovirales.

De manière adaptée, les vecteurs basés sur ChAd157 contiennent un ou plusieurs éléments adénoviraux 5 dérivés du génome adénoviral de ChAd157 de l'invention. Dans un mode de réalisation, les vecteurs contiennent des ITR adénovirales de ChAd157 et d'autres séquences supplémentaires du même sérotype d'adénovirus. Dans un autre mode de réalisation, les vecteurs contiennent des 10 séquences adénovirales qui sont dérivées d'un sérotype adénoviral différent de celui qui fournit les ITRs.

Tel que ceci est défini dans le présent document, un adénovirus pseudotypé fait référence à un adénovirus dans lequel les protéines de capsid de l'adénovirus 15 proviennent d'un adénovirus différent de l'adénovirus qui fournit les ITRs.

De plus, des adénovirus chimères ou hybrides peuvent être construits en utilisant les adénovirus décrits dans le présent document en utilisant des 20 techniques connues des hommes du métier (voir par exemple, US 7,291,498).

Les ITR et toute autre séquence adénovirale présente dans le vecteur de la présente invention peuvent être obtenues à partir d'un grand nombre de 25 sources. Une variété de souches adénovirales sont disponibles auprès de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginie, ou disponible sur demande auprès d'une variété de sources commerciales et institutionnelles. De plus, les séquences d'un grand 30 nombre de souches sont disponibles d'une variété de bases de données comprenant, par exemple, PubMed et

GenBank. Des vecteurs adénoviraux homologues préparés à partir d'autres adénovirus de chimpanzé ou humains sont décrits dans la littérature publiée (par exemple, US 5,240,846). Les séquences d'ADN d'un certain nombre de 5 types d'adénovirus sont disponibles auprès de la GenBank, y compris le type Ad5 (numéro d'accès GenBank M73370). Les séquences adénovirales peuvent être obtenues de tout sérotype d'adénovirus connu, par exemple les sérotypes 2, 3, 4, 7, 12 et 40, et 10 comprenant en outre l'un quelconque des types humains actuellement identifiés. De manière similaire, les adénovirus connus pour infecter les animaux non humains (par exemple, les singes) peuvent également être utilisés dans les constructions de vecteur de cette 15 invention (par exemple, US 6,083,716). Les séquences virales, les virus assistants (si nécessaire), et les particules virales recombinantes, et d'autres composants de vecteurs et séquences utilisés dans la construction des vecteurs décrits dans le présent 20 document sont obtenus tel que décrit ci-dessous.

Production de séquence, de vecteur et d'adénovirus

Les séquences de l'invention peuvent être produites par tout moyen approprié, y compris par 25 production recombinante, par synthèse chimique, ou d'autres moyens de synthèse. Des techniques de production adaptées sont bien connues des hommes du métier. En variante, des peptides peuvent également être synthétisés par des procédés de synthèse de 30 peptides en phase solide bien connus.

Les plasmides adénoviraux (ou autres vecteurs) peuvent être utilisés pour produire des vecteurs adénoviraux. Dans un mode de réalisation, les vecteurs adénoviraux sont des particules adénovirales qui sont 5 incompétentes pour la réPLICATION. Dans un mode de réalisation, les particules adénovirales sont rendues incompétentes pour la réPLICATION par des délétions dans les gènes E1A et/ou E1B, en particulier les gènes E1A et E1B. En variante, les adénovirus sont rendus 10 incompétents pour la réPLICATION par d'autres moyens en conservant facultativement les gènes E1A et/ou E1B. De manière similaire, dans certains modes de réalisation, la réDUCTION d'une réponse immunitaire au vecteur peut être réalisée par délétions dans les gènes E2B et/ou de 15 l'ADN polymérase. Les vecteurs adénoviraux peuvent également contenir d'autres mutations dans le génome adénoviral, par exemple, des mutations ou délétions thermosensibles dans d'autres gènes. Dans d'autres modes de réalisation, il est souhaitable de conserver 20 une région E1A et/ou E1B intacte dans les vecteurs adénoviraux. Une telle région E1 intacte peut se trouver à son emplacement natif dans le génome adénoviral ou être placée dans le site d'une délétion dans le génome adénoviral natif (par exemple, dans la 25 région E3).

Dans la construction de vecteurs adénoviraux pour la délivrance d'un gène à une cellule de mammifère (par exemple humaine), il est possible d'utiliser dans les vecteurs toute une gamme de séquences d'acide nucléique 30 d'adénovirus modifiées. Par exemple, la totalité ou une partie du gène adénoviral E3 précoce retardé peut être

éliminée de la séquence adénovirale qui forme une partie du virus recombinant. La fonction d'E3 ne serait pas nécessaire à la fonction et à la production de la particule virale recombinante. Des vecteurs adénoviraux 5 peuvent également être construits avec une délétion au moins de la région ORF6 du gène E4, et de manière davantage souhaitable en raison de la redondance de la fonction de cette région, de la totalité de la région d'E4. Encore un autre vecteur de l'invention contient 10 une délétion du gène E2A précoce retardé. Des délétions peuvent également être pratiquées dans l'un quelconque des gènes tardifs L1 à L5 du génome de l'adénovirus. De manière similaire, des délétions dans les gènes intermédiaires IX et IVa₂ peuvent s'avérer utiles pour 15 certaines fins. D'autres délétions peuvent être apportées dans les autres gènes adénoviraux structuraux ou non structuraux. Les délétions abordées ci-dessus peuvent être utilisées individuellement, en d'autres termes, une séquence d'adénovirus destinée à être 20 utilisée selon la présente description peut contenir des délétions uniquement dans une seule région. En variante, les délétions de gènes entiers ou de parties de ceux-ci efficaces pour détruire leur activité biologique peuvent être utilisées en toute combinaison. 25 Par exemple, dans un exemple de vecteur, la séquence adénovirale peut avoir des délétions des gènes E1 et du gène E4, ou des gènes E1, E2a et E3, ou des gènes E1 et E3, ou des gènes E1, E2A et E4, avec ou sans délétions d'E3, et ainsi de suite. L'un quelconque ou plusieurs 30 des gènes E peut de manière appropriée être remplacé par un gène E (ou un ou plusieurs cadres de lecture

ouvert des gènes E) provenant d'une souche d'adénovirus différente. De manière particulièrement appropriée, les gènes E1 et E3 de ChAd157 sont déletés et le gène ChAd157E4 est remplacé par E4Ad5orf6. Tel que ceci est 5 abordé ci-dessus, ces délétions et/ou substitutions peuvent être utilisées en combinaison avec d'autres mutations, telles que des mutations thermosensibles, pour obtenir un résultat souhaité.

Un vecteur adénoviral ne possédant pas une ou 10 plusieurs séquences adénovirales essentielles (par exemple, E1A, E1B, E2A, E2B, ORF6 d'E4, L1, L2, L3, L4 et L5), peut être cultivé en présence des produits géniques adénoviraux manquants qui sont nécessaires pour l'infectivité virale et la propagation d'une 15 particule adénovirale. Ces fonctions auxiliaires peuvent être fournies par culture du vecteur adénoviral en présence de l'une des constructions auxiliaires ou plus (par exemple, un plasmide ou un virus) ou une cellule hôte d'empaquetage.

20

Complémentation de vecteurs incompétents pour la réplication

Pour générer des adénovirus recombinants présentant une délétion dans l'un quelconque des gènes 25 décrits ci-dessus, la fonction de la région génique déletée, si elle est essentielle pour la réplication et l'infectivité du virus, doit être fournie au virus recombinant par un virus assistant ou une lignée cellulaire assistante, en d'autres termes, une lignée 30 cellulaire de complémentation ou d'empaquetage.

Virus assistants

Selon le contenu en gène adénoviral des vecteurs viraux utilisés pour porter le minigène, un adénovirus assistant ou un fragment de virus ne se répliquant pas 5 peut être utilisé pour fournir suffisamment de séquences géniques d'adénovirus nécessaires pour produire une particule virale recombinante infectieuse contenant le minigène. Des virus assistants utiles contiennent les séquences géniques d'adénovirus 10 sélectionnées non présentes dans la construction de vecteur adénoviral et/ou non exprimées par la lignée cellulaire d'empaquetage dans laquelle le vecteur est transfété. Dans un mode de réalisation, le virus assistant est défectueux pour la réPLICATION et 15 contient des gènes adénoviraux outre, de manière adaptée, la ou les séquences décrites dans le présent document. Un tel virus assistant est, de manière adaptée, utilisé en combinaison avec une lignée cellulaire exprimant E1 (et facultativement en outre 20 exprimant E3).

Un virus assistant peut facultativement contenir un gène rapporteur. Un certain nombre de ces gènes rapporteurs sont connus dans l'art et bien décrits dans le présent document. La présence d'un gène rapporteur 25 sur le virus assistant qui est différent du transgène sur le vecteur adénoviral permet que le vecteur adénoviral et le virus assistant soient indépendamment contrôlés. Ce rapporteur est utilisé pour permettre la séparation entre le virus recombinant obtenu et le 30 virus assistant après la purification.

Lignées cellulaires de complémentation

Dans un grand nombre de circonstances, une lignée cellulaire exprimant le ou les gènes manquants qui sont essentiels à la réplication et à l'infectivité du virus, 5 par exemple E1 humain, peut être utilisée pour transcomplémenter un vecteur adénoviral de chimpanzé. Ceci est particulièrement avantageux parce que, en raison de la diversité entre les séquences adénovirales de chimpanzé de l'invention et les séquences 10 adénovirales humaines rencontrées dans les cellules d'empaquetage actuellement disponibles, l'utilisation des cellules humaines contenant E1 actuelles empêche la génération d'adénovirus compétents pour la réplication durant le processus de réplication et de production.

15 En variante, si souhaité, il est possible d'utiliser les séquences proposées dans la présente invention pour générer une cellule ou une lignée cellulaire d'empaquetage qui exprime, au minimum, le gène E1 de ChAd157 ou d'un autre adénovirus (par 20 exemple un adénovirus humain, par exemple, hAd5 E1, ou un autre ChAd E1) sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur pour l'expression dans une lignée cellulaire parente sélectionnée. Des promoteurs inductibles ou constitutifs peuvent être utilisés pour 25 cette fin. Des exemples de ces promoteurs sont décrits en détails ailleurs dans ce document. Une cellule parente est sélectionnée pour la génération d'une nouvelle lignée cellulaire exprimant tout gène de ChAd157 souhaité. De manière non restrictive, une telle 30 lignée cellulaire parente peut être la lignée HeLa (n° d'accès ATCC CCL 2], A549 [n° d'accès ATCC CCL 185],

HEK293, KB [CCL 17], Detroit [par exemple, Detroit 510, CCL 72] et WI-38 [CCL 75], entre autres. Ces lignées cellulaires sont disponibles auprès de la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, 5 Manassas, Virginie 20110-2209.

De telles lignées cellulaires exprimant E1 sont utiles dans la génération de vecteurs adénoviraux recombinants avec E1 délété. En outre, ou en variante, des lignées cellulaires qui expriment un ou plusieurs 10 produits géniques adénoviraux, par exemple, E1A, E1B, E2A, E3 et/ou E4, peuvent être construites en utilisant sensiblement les mêmes procédures que celles utilisées dans la génération de vecteurs viraux recombinants. Ces lignées cellulaires peuvent être utilisées pour trans- 15 complémenter les vecteurs adénoviraux portant des délétions dans les gènes essentiels qui codent pour ces produits, ou pour fournir des fonctions d'aide nécessaires pour empaqueter un virus dépendant d'un virus assistant (par exemple, un virus adéno-associé). 20 La préparation d'une cellule hôte requiert des techniques telles que l'assemblage de séquences d'ADN sélectionnées.

Dans une autre variante, les produits géniques adénoviraux essentiels sont fournis en trans par le 25 vecteur adénoviral et/ou le virus assistant. Dans un tel cas, une cellule hôte adaptée peut être sélectionnée dans un organisme biologique quelconque, y compris les cellules procaryotes (par exemple bactériennes), et les cellules eucaryotes, y compris, 30 les cellules d'insectes, les cellules de levure et les cellules de mammifère.

Les cellules hôtes peuvent être sélectionnées parmi toute espèce de mammifère, y compris, de manière non restrictive, des cellules telles que les cellules A549, WEHI, 3T3, 10'I'I/2, HEK 293 ou Per.C6 (les deux 5 exprimant l'E1 adénoviral fonctionnel) [Fallaux, FJ et al., (1998), *Hum Gene Ther*, 9 : 1909-1917], Saos, C2C12, des cellules L, HT1080, HepG2 et des fibroblastes primaires, des hépatocytes et des myoblastes dérivés de mammifères y compris d'un être humain, du singe, de la 10 souris, du rat, du lapin, et du hamster.

Une lignée cellulaire de complémentation particulièrement appropriée est la lignée cellulaire Procell92. La lignée cellulaire Procell92 est basée sur les cellules HEK 293 qui expriment les gènes E1 15 adénoviraux, transfectés avec le répresseur Tet sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase 1 (PGK) humaine, et le gène de résistance à G418 (Vitelli et al. *PLOS One* (2013) 8(e55435) : 1-9). Procell92.S est adaptée pour la croissance dans des conditions de 20 suspension et est utile pour la production de vecteurs adénoviraux exprimant des protéines toxiques (www.okairos.com/e/inners.php?m=00084, dernier accès le 13 avril 2015).

25 Assemblage d'une particule virale et transfection d'une lignée cellulaire

Généralement, lors de la délivrance du vecteur comprenant le minigène par transfection, le vecteur est délivré en une quantité d'environ 5 µg à environ 100 µg 30 d'ADN, et de préférence d'environ 10 à environ 50 µg d'ADN à environ 1×10^4 cellules à environ 1×10^{13}

cellules, et de préférence environ 10^5 cellules. Cependant, les quantités relatives d'ADN vecteur par rapport aux cellules hôtes peuvent être ajustées, en prenant en considération des facteurs tels que le vecteur souhaité, le procédé de délivrance et les cellules hôtes choisies.

L'introduction dans la cellule hôte du vecteur peut être réalisée par tout moyen connu dans l'art, y compris par transfection, et infection. Un ou plusieurs des gènes adénoviraux peuvent être stablement intégrés dans le génome de la cellule hôte, stablement exprimés comme des épisomes, ou exprimés de manière transitoire. Les produits géniques peuvent tous être exprimés de manière transitoire, sur un épisome ou stablement intégrés, ou certains des produits géniques peuvent être exprimés stablement alors que d'autres sont exprimés de manière transitoire.

L'introduction de vecteurs dans la cellule hôte peut aussi être réalisée à l'aide de techniques connues des hommes du métier. De manière adaptée, des techniques de transfection ordinaires sont utilisées, par exemple, la transfection au CaPC ou l'électroporation.

L'assemblage des séquences d'ADN sélectionnées de l'adénovirus (ainsi que du transgène et des autres éléments du vecteur) dans différents plasmides intermédiaires, et l'utilisation du plasmide et des vecteurs pour produire une particule virale recombinante sont tous obtenus en utilisant des techniques classiques. Ces techniques comprennent des techniques classiques de clonage d'ADNc, l'utilisation

de séquences oligonucléotidiques se chevauchant sur les génomes d'adénovirus, la réaction de polymérisation en chaîne, et tout procédé approprié qui produit la séquence nucléotidique souhaitée. Des techniques 5 standard de transfection et de co-transfection sont utilisées, par exemple, des techniques de précipitation au CaPC. D'autres procédés conventionnels utilisés comprennent la recombinaison homologue des génomes viraux, l'étalement sur plaque de virus dans une couche 10 d'agar, des procédés de mesures de la génération du signal, et équivalents.

Par exemple, après la construction et l'assemblage du vecteur viral contenant le minigène souhaité, le vecteur est transfecté *in vitro* en présence d'un virus 15 assistant dans la lignée cellulaire d'empaquetage. La recombinaison homologue se produit entre les séquences de l'assistant et du vecteur, ce qui permet que les séquences du transgène adénoviral dans le vecteur soient répliquées et empaquetées dans les capsides des 20 virions, résultant en les particules virales recombinantes de vecteur. Les adénovirus recombinants résultants sont utiles pour transférer un transgène sélectionné à une cellule sélectionnée. Dans des expériences *in vivo* avec le virus recombinant cultivé 25 dans les lignées cellulaires d'empaquetage, les vecteurs adénoviraux recombinants avec E1 déleté de cette invention mettent en évidence une utilité dans le transfert d'un transgène à une cellule de mammifère non simienne, de préférence humaine.

Transgènes

Le transgène est une séquence d'acide nucléique, hétérologue aux séquences de vecteur flanquant le transgène, qui code pour une protéine d'intérêt. La 5 séquence codante d'acide nucléique est fonctionnellement liée aux composants régulateurs d'une manière qui permet la transcription, la traduction et/ou l'expression du transgène dans une cellule hôte.

La composition de la séquence du transgène va 10 dépendre de l'utilisation à laquelle le vecteur résultant sera consacré. Par exemple, le transgène peut être un transgène thérapeutique ou un transgène immunogène. En variante, une séquence de transgène peut comprendre une séquence rapporteur, qui sous l'effet de 15 l'expression produit un signal détectable. Ces séquences rapporteurs comprennent, de manière non restrictive, des séquences d'ADN codant pour la β -lactamase, la β -galactosidase (LacZ), la phosphatase alcaline, la thymidine kinase, la protéine fluorescente 20 verte (GFP), la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), la luciférase, les protéines liées à la membrane comprenant, par exemple, CD2, CD4, CD8, la protéine hémagglutinine du virus de la grippe, et autres bien connues dans la technique, contre lesquelles des 25 anticorps à grande affinité existent ou peuvent être produits par des moyens classiques, et des protéines de fusion comprenant une protéine liée à la membrane et fusionnée de manière appropriée à un domaine tag d'antigène provenant, entre autres, de l'hémagglutinine 30 ou de Myc. Ces séquences codantes, lorsqu'elles sont associées à des éléments de régulation qui dirigent

leur expression, fournissent des signaux détectables par des moyens classiques, y compris des essais enzymatiques, radiographiques, colorimétriques, de fluorescence ou spectroscopiques autres, le tri 5 cellulaire par FACS (fluorescent activating cell sorting assays) et les dosages immunologiques, y compris un dosage immunoenzymatique (ELISA), un dosage radioimmunologique (RIA) et l'immunohistochimie.

Dans un mode de réalisation, le transgène est une 10 séquence non marqueur codant pour un produit qui est utile en biologie et en médecine, tel qu'un transgène thérapeutique ou un transgène immunogène comme des protéines, de l'ARN, des enzymes, ou des ARN catalytiques. Des molécules d'ARN souhaitables 15 comprennent l'ARNt, l'ARNdb, l'ARN ribosomique, des ARN catalytiques, et des ARN antisens. Un exemple d'une séquence d'ARN utile est une séquence qui éteint l'expression d'une séquence d'acide nucléique ciblée chez l'animal traité.

20 Le transgène peut être utilisé pour le traitement, par exemple, de déficiences génétiques, en tant que produit thérapeutique ou vaccin contre le cancer, pour l'induction d'une réponse immunitaire, et/ou à des fins de vaccination prophylactique. Tel qu'il est utilisé 25 dans le présent document, l'induction d'une réponse immunitaire fait référence à la capacité d'une protéine à induire une réponse des lymphocytes T et/ou une réponse immunitaire humorale à la protéine.

Le terme prophylaxie signifie la fourniture d'un 30 médicament à l'avance, ce qui peut être avant l'exposition à un pathogène (prophylaxie préexposition)

ou avant le développement des symptômes d'une maladie (prophylaxie post-exposition). Les termes traitement et thérapie sont utilisés de manière interchangeable et ils signifient l'administration de médicament pendant 5 la maladie.

Par le terme maladie, on entend un trouble d'une structure ou fonction chez un sujet, notamment un trouble qui produit des symptômes spécifiques ou qui affecte un endroit spécifique et n'est pas simplement 10 un résultat direct d'une blessure physique.

Éléments de régulation

Outre le transgène, le vecteur comprend également les éléments de contrôle classiques qui sont liés de 15 manière fonctionnelle au transgène d'une manière qui permet sa transcription, sa traduction et/ou son expression dans une cellule transfectée avec le vecteur plasmidique ou infectée avec le virus produit par l'invention. Telle qu'elle est utilisée dans le présent 20 document, l'expression séquences « liées de manière fonctionnelle » comprend à la fois des séquences de contrôle de l'expression qui sont contiguës au gène d'intérêt et des séquences de contrôle de l'expression qui agissent en trans ou à distance pour contrôler le 25 gène d'intérêt.

Les séquences de contrôle de l'expression comprennent des séquences d'initiation de la transcription, de terminaison, promoteurs et d'amplification appropriées ; des signaux de traitement 30 de l'ARN efficaces tels que des signaux d'épissage et de polyadénylation (polyA) y compris le polyA de la

bêta-globine de lapin ; des séquences qui stabilisent l'ARNm cytoplasmique ; des séquences qui amplifient l'efficacité de traduction (par exemple, la séquence consensus de Kozak) ; des séquences qui améliorent la 5 stabilité des protéines ; et si souhaité, des séquences qui améliorent la sécrétion du produit codé. Entre autres séquences, des introns chimères peuvent être utilisés.

Dans certains modes de réalisation, l'élément de 10 régulation post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte (WPRE) (Zuffrey *et al.* (1999) *J Virol* ; 73(4) : 2886-9) peut être fonctionnellement lié au transgène. Un exemple de WPRE est proposé dans SEQ ID NO : 26.

15 Un « promoteur » est une séquence nucléotidique qui permet la liaison de l'ARN polymérase et dirige la transcription d'un gène. Typiquement, un promoteur se trouve dans la région non codante en 5' d'un gène, à proximité du site de début de la transcription du gène. 20 Les éléments de la séquence à l'intérieur du promoteur qui fonctionnent dans l'initiation de la transcription sont souvent caractérisés par les séquences nucléotidiques consensus. Des exemples de promoteurs comprennent, de manière non restrictive, les promoteurs 25 des bactéries, de la levure, des plantes, les virus, et des mammifères (y compris des êtres humains). Un grand nombre de séquences de contrôle de l'expression, y compris des promoteurs qui sont internes, natifs, constitutifs, inductibles et/ou spécifiques du tissu, 30 sont connus dans l'art et peuvent être utilisés.

Des exemples de promoteurs constitutifs comprennent, de manière non restrictive, le promoteur du TBG, le promoteur LTR du virus rétroviral du sarcome de Rous (facultativement avec l'amplificateur), le 5 promoteur du cytomégavirus (CMV) (facultativement avec l'amplificateur du CMV, voir, par exemple, Boshart et al., *Cell*, 41 : 521-530 (1985)), le promoteur CASI, le promoteur du SV40, le promoteur de la dihydrofolate réductase, le promoteur de la β -actine, le promoteur de 10 la phosphoglycérol kinase (PGK), et le promoteur EF1a (Invitrogen).

Dans certains modes de réalisation, le promoteur est un promoteur CASI (voir, par exemple, WO2012/115980). Le promoteur CASI est un promoteur 15 synthétique qui contient une partie du promoteur du CMV, une partie du promoteur de la bêta-actine de poulet, et une partie de l'amplificateur UBC. Dans certains modes de réalisation, le promoteur CASI peut inclure une séquence d'acide nucléique ayant une identité de 20 séquence d'au moins environ 90 %, d'au moins environ 95 %, d'au moins environ 96 %, d'au moins environ 97 %, d'au moins environ 98 %, d'au moins environ 99 %, ou plus, avec SEQ ID NO : 12. Dans certains modes de réalisation, le promoteur comprend ou est constitué 25 d'une séquence d'acide nucléique de SEQ ID NO : 12.

Les promoteurs inductibles permettent la régulation de l'expression génique et peuvent être régulés par des composés fournis de manière exogène, des facteurs environnementaux tels que la température, 30 ou la présence d'un état physiologique spécifique, par exemple, une phase aiguë, un état de différenciation

particulier de la cellule, ou dans des cellules se répliquant uniquement. Les promoteurs inductibles et les systèmes inductibles sont disponibles auprès d'une variété de sources commerciales, y compris, de manière 5 non restrictive, Invitrogen, Clontech et Ariad. Un grand nombre d'autres systèmes ont été décrits et peuvent être facilement sélectionnés par un homme du métier. Par exemple, des promoteurs inductibles comprennent le promoteur de la métallothionéine (MT) de 10 mouton inductible par le zinc et le promoteur du virus de la tumeur mammaire murine (MMTV) inductible par la dexaméthasone (Dex). D'autres systèmes inductibles comprennent le système du promoteur de la polymérase T7 (WO98/10088) ; le promoteur d'insecte inductible par 15 l'ecdysone (No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 : 3346-3351 (1996)), le système répressible par la tétracycline (Gossen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 5547-5551 (1992)), le système inductible par la tétracycline (Gossen *et al.*, Science, 378 : 1766-1769 20 (1995), voir également Harvey *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2 : 512-518 (1998)). D'autres systèmes comprennent le dimère FK506, VP16 ou p65 utilisant le castradiol, la diphénol murislérone, le système inductible par RU486 (Wang *et al.*, Nat. Biotech., 15 : 25 239-243 (1997) et Wang *et al.*, Gene Ther., 4 : 432-441 (1997)) et le système inductible par la rapamycine (Magari *et al.*, J. Clin. Invest., 100 : 2865-2872 (1997)). L'efficacité de certains promoteurs inductibles augmente dans le temps. Dans ces cas, il 30 est possible d'augmenter l'efficacité de ces systèmes

par insertion de multiples répresseurs en tandem, par exemple, TetR lié à un TetR par un IRES.

Dans certains modes de réalisation, le promoteur est un promoteur du hCMV amplifié, tel que proposé dans 5 SEQ ID NO : 42.

Dans un autre mode de réalisation, le promoteur natif pour le transgène sera utilisé. Le promoteur natif peut être préféré lorsque l'on souhaite que l'expression du transgène imite l'expression native. Le 10 promoteur natif peut être utilisé lorsque l'expression du transgène doit être régulée temporairement ou à un certain stade du développement, ou de manière spécifique du tissu, ou en réponse à des stimuli transcriptionnels. Dans un autre mode de réalisation, 15 d'autres éléments de contrôle de l'expression natifs, tels que des éléments amplificateurs, des sites de polyadénylation ou des séquences consensus Kozak peuvent également être utilisés pour imiter l'expression native.

20 Le transgène peut être lié de manière opérationnelle à un promoteur spécifique du tissu. Par exemple, si l'expression dans un muscle squelettique est souhaitée, un promoteur actif dans le muscle doit être utilisé. Ceux-ci comprennent les promoteurs des 25 gènes codant pour la β -actine squelettique, la chaîne légère de la myosine 2A, la dystrophine, la créatine kinase musculaire, ainsi que des promoteurs musculaires synthétiques ayant des activités supérieures à celles de promoteurs naturels (voir Li et al., *Nat. Biotech.*, 30 17 : 241-245 (1999)). Des exemples de promoteurs spécifiques des tissus sont connus pour le foie

(albumine, Miyatake *et al.*, *J. Virol.*, 71 : 5124-32 (1997) ; le promoteur principal du virus de l'hépatite B, Sandig *et al.*, *Gene Ther.*, 3 : 1002-9 (1996) ; l'alpha-fœtoprotéine (AFP), Arbuthnot *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7 : 1503-14 (1996)), l'ostéocalcine osseuse (Stein *et al.*, *Mol. Biol. Rep.*, 24 : 185-96 (1997)) ; la sialoprotéine osseuse (Chen *et al.*, *J. Bone Miner. Res.*, 11 : 654-64 (1996)), les lymphocytes (CD2, Hansal *et al.*, *J. Immunol.*, 161 : 1063-8 (1998) ; la chaîne lourde des immunoglobulines ; la chaîne des récepteurs des lymphocytes T), neuronal tel que le promoteur de l'énolase spécifique des neurones (NSE) (Andersen *et al.*, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13 : 503-15 (1993)), le gène de la chaîne légère des neurofilaments (Piccioli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 5611-5 (1991)), et le gène vgf spécifique des neurones (Piccioli *et al.*, *Neuron*, 15 : 373-84 (1995)), entre autres.

Facultativement, les vecteurs portant des transgènes codant pour des produits immunogènes ou thérapeutiquement utiles peuvent également comprendre des marqueurs sélectifs ou des gènes rapporteurs qui peuvent comprendre des séquences codant pour la résistance à la généticine, à l'hygromicine ou à la puromycine, entre autres. Ces rapporteurs ou gènes marqueurs sélectifs (de préférence situés hors du génome viral à empaqueter dans une particule virale) peuvent être utilisés pour signaler la présence des plasmides dans les cellules bactériennes, par exemple la résistance à l'ampicilline. D'autres composants du vecteur peuvent comprendre une origine de réPLICATION.

Ces vecteurs sont générés à l'aide des techniques et des séquences proposées dans le présent document, conjointement à des techniques connues des hommes du métier. Ces techniques comprennent des techniques 5 classiques de clonage de l'ADNc telles que celles décrites dans les textes, l'utilisation de séquences oligonucléotidiq[ue]ues se chevauchant sur des génomes adénoviraux, la réaction de polymérisation en chaîne, et tout procédé approprié qui fournit la séquence 10 nucléotidique souhaitée.

Produits thérapeutiques et prophylaxie

Les vecteurs recombinants basés sur ChAd157 sont utiles pour le transfert de gène à un mammifère humain 15 ou non simien *in vitro*, *ex vivo*, et *in vivo*.

Les vecteurs adénoviraux recombinants décrits dans le présent document peuvent être utilisés comme des vecteurs d'expression pour la production des produits codés par les transgènes hétérologues *in vitro*. Par 20 exemple, l'adénovirus recombinant incompétent pour la réplication contenant un transgène peut être transfecté dans une lignée cellulaire de complémentation telle que décrite ci-dessus.

Un vecteur adénoviral recombinant dérivé de 25 ChAd157 fournit un véhicule de transfert de gène efficace qui peut délivrer un transgène sélectionné à une cellule hôte sélectionnée *in vivo* ou *ex vivo* même lorsque l'organisme a des anticorps neutralisation contre un ou plusieurs sérotypes adénoviraux. Dans un 30 mode de réalisation, le vecteur et les cellules sont mélangées *ex vivo* ; les cellules infectées sont

cultivées en utilisant des méthodologies classiques ; et les cellules transduites sont réinjectées dans le patient. Ces techniques sont particulièrement bien adaptées à la délivrance de gènes pour des fins 5 thérapeutiques et pour l'immunisation, y compris l'induction d'une immunité protectrice.

Transgènes immunogènes

Les vecteurs recombinants ChAd157 peuvent aussi 10 être administrés dans des compositions immunogènes. Une composition immunogène telle que décrite dans le présent document est une composition comprenant un ou plusieurs vecteurs recombinants ChAd1457 capables d'induire une réponse immunitaire, par exemple une 15 réponse humorale (par exemple des anticorps) et/ou à médiation cellulaire (par exemple, des lymphocytes T cytotoxiques), contre un produit de transgène délivré par le vecteur après la délivrance à un mammifère, de manière appropriée un être humain. Un adénovirus 20 recombinant peut comprendre (de manière appropriée dans l'une quelconque de ses délétions géniques) un gène codant pour un immunogène souhaité et peut par conséquent être utilisé dans un vaccin. Les adénovirus recombinants peuvent être utilisés comme des vaccins 25 prophylactiques ou thérapeutiques contre tout pathogène pour lequel l'antigène (les antigènes) critique(s) pour l'induction d'une réponse immunitaire et capable(s) de limiter la diffusion du pathogène a (ont) été identifié(s) et pour lequel (lesquels) l'ADNc est 30 disponible.

Par le terme immunogène, on entend un polypeptide qui est capable d'éliciter une réponse immunitaire. De manière adaptée, l'immunogène est un antigène qui comprend au moins un épitope des lymphocytes B ou T. La 5 réponse immunitaire élicitée peut être une réponse des lymphocytes B spécifique d'un antigène, qui produit des anticorps neutralisants. La réponse immunitaire élicitée peut être une réponse des lymphocytes T spécifique d'un antigène, qui peut être une réponse 10 systémique et/ou locale. La réponse des lymphocytes T spécifique d'un antigène comprend une réponse des lymphocytes T CD4+, par exemple une réponse impliquant les lymphocytes T CD4+ exprimant une pluralité de cytokines, par exemple, l'IFN γ , le TNF α et/ou l'IL2. En 15 variante, ou en outre, la réponse des lymphocytes T spécifique d'un antigène comprend une réponse des lymphocytes T CD8+, par exemple une réponse impliquant les lymphocytes T CD8+ exprimant une pluralité de cytokines, par exemple, l'IFN γ , le TNF α et/ou l'IL2.

20 Le terme immuniser signifie par conséquent l'administration d'un immunogène (ou d'un polynucléotide codant pour l'immunogène tel qu'approprié au contexte), pour éliciter une réponse immunitaire.

25 De tels vaccins ou d'autres compositions immunogènes peuvent être formulées dans un véhicule de délivrance adapté. Généralement, les doses des compositions immunogènes sont dans la plage définie ci-après dans la section « Procédé de délivrance et 30 dosage ». Les niveaux d'immunité du gène sélectionné peuvent être surveillés pour déterminer si des boosts

sont nécessaires ou non. Après une évaluation des titres d'anticorps dans le sérum, facultativement des immunisations de boost peuvent être souhaitées.

Facultativement, un vaccin ou une composition 5 immunogène de l'invention peut être formulé pour contenir d'autres composants, y compris, par exemple, des adjuvants, des agents stabilisants, des agents d'ajustement du pH, des conservateurs et équivalents. Des exemples d'adjuvants sont proposés ci-dessous sous 10 « Adjuvants ». Un tel adjuvant peut être administré avec un premier vaccin à ADN codant pour un antigène pour améliorer la réponse immunitaire spécifique de l'antigène comparé à la réponse immunitaire générée lors de la sensibilisation avec un vaccin à ADN codant 15 pour l'antigène uniquement. En variante, un tel adjuvant peut être administré avec un antigène polypeptidique qui est administré dans un régime d'administration impliquant les vecteurs ChAd157 de l'invention (tel que décrit ci-dessous sous « Régime 20 d'administration »).

Les adénovirus recombinants sont administrés en une quantité immunogène, en d'autres termes, une quantité d'adénovirus recombinant qui est efficace dans une voie d'administration pour transfecter les cellules 25 cibles souhaitées et fournir des niveaux d'expression suffisants du gène choisi pour induire une réponse immunitaire. Lorsque l'immunité protectrice est fournie, les adénovirus recombinants sont considérés comme des compositions vaccinales utiles dans la prévention d'une 30 infection et/ou d'une maladie récurrente.

On s'attend à ce que les vecteurs recombinants décrits dans le présent document soient très efficaces pour induire les lymphocytes T cytolytiques et des anticorps dirigés contre la protéine antigénique 5 hétérologue insérée, exprimée par le vecteur.

Les immunogènes exprimés par les vecteurs de l'invention qui sont utiles pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre d'autres agents pathogènes comprennent, par exemple, des bactéries, des 10 champignons, des microorganismes parasitaires ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou une cellule cancéreuse ou d'une cellule tumorale. Par exemple, les immunogènes peuvent être sélectionnés parmi une variété de familles 15 virales. Par exemple les familles virales contre lesquelles une réponse immunitaire serait souhaitable comprennent les Lyssavirus tels que les virus de la rage, les virus respiratoires tels que le virus respiratoire syncytial (VRS) et d'autres paramyxovirus 20 tels que le métapneumovirus humain, le hMPV et les virus parainfluenza (PIV).

Les antigènes de la rage appropriés qui sont utiles en tant qu'immunogènes pour immuniser un être humain ou un animal non humain peuvent être 25 sélectionnés parmi la glycoprotéine virale de la rage (G), l'ARN polymérase (L), la protéine matricielle (M), la nucléoprotéine (N) et la phosphoprotéine (P). Le terme « protéine G » ou « glycoprotéine » ou « polypeptide de la protéine G » ou « polypeptide de la 30 glycoprotéine » fait référence à un polypeptide ou une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides

aminés d'un polypeptide de glycoprotéine de la rage. Le terme « protéine L » ou « protéine d'ARN polymérase » ou « polypeptide de protéine L » ou « polypeptide de protéine d'ARN polymérase » fait référence à un 5 polypeptide ou une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide de protéine d'ARN polymérase de la rage. Le terme « protéine M » ou « protéine matricielle » ou « polypeptide de protéine M » ou « polypeptide de protéine matricielle » fait 10 référence à un polypeptide ou une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide de protéine matricielle de la rage. Le terme « protéine N » ou « nucléoprotéine » ou « polypeptide de protéine N » ou « polypeptide de nucléoprotéine » fait référence à un polypeptide ou une 15 protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide de nucléoprotéine de la rage. Le terme « protéine P » ou « phosphoprotéine » ou « polypeptide de protéine P » ou « polypeptide de phosphoprotéine » fait référence à un polypeptide ou 20 une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide de phosphoprotéine de la rage.

Les antigènes appropriés du VRS qui sont utiles en 25 tant qu'immunogènes pour immuniser un être humain ou un animal non humain peuvent être sélectionnés parmi : la protéine de fusion (F), la protéine de fixation (G), la protéine matricielle (M2) et la nucléoprotéine (N). Le terme « protéine F » ou « protéine de fusion » ou « polypeptide de protéine F » ou « polypeptide de 30 protéine de fusion » fait référence à un polypeptide ou

une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide de protéine de fusion du VRS. De manière similaire, le terme « protéine G » ou « polypeptide de protéine G » fait référence à un 5 polypeptide ou une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'un polypeptide de protéine de fixation du VRS. Le terme « protéine M » ou « protéine matricielle » ou « polypeptide de protéine M » fait référence à un polypeptide ou une protéine 10 ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'une protéine matricielle du VRS et peut inclure l'un ou l'autre ou les deux des produits géniques M2-1 (qui peut être écrit dans le présent document M2.1) et M2-2. De manière similaire, le terme « protéine N » ou 15 « protéine de nucléocapside » ou « polypeptide de protéine N » fait référence à un polypeptide ou une protéine ayant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés d'une nucléoprotéine du VRS.

Deux groupes de souches de VRS humains ont été 20 décrits, les groupes A et B, principalement basés sur des différences d'antigénicité de la glycoprotéine G. Un grand nombre de souches du VRS ont été isolées jusqu'à présent, toutes étant appropriées dans le contexte des antigènes des combinaisons immunogènes 25 décrites dans le présent document. Des exemples de souches indiquées par les numéros d'accès GenBank et/ou EMBL peuvent être rencontrés dans la demande US publiée numéro 2010/0203071 (WO2008114149), qui est intégrée au présent document à titre de référence pour les fins de 30 description des séquences d'acide nucléique et polypeptidiques des protéines F et G du VRS appropriées

pour leur utilisation dans la présente invention. Dans un mode de réalisation, La protéine F du VRS peut être un ectodomaine d'une protéine F du VRS (FΔTM).

Des exemples d'acides nucléiques des protéines M 5 et N et de séquences protéiques peuvent être trouvés, par exemple, dans la demande US publiée numéro 2014/0141042 (WO2012/089833), qui est intégrée au présent document à des fins de description des séquences d'acide nucléique et polypeptidiques des 10 protéines M et N du VRS appropriées pour leur utilisation dans la présente invention.

De manière adaptée, pour son utilisation dans la présente invention, un acide nucléique code pour un antigène F du VRS et pour les antigènes M et N du VRS. 15 Plus spécifiquement, l'acide nucléique code pour un antigène FΔTM du VRS et pour les antigènes M2-1 et N du VRS, dans lequel un site d'auto-clivage est induit entre l'antigène FΔTM du VRS et M2-1 du VRS et un lieu flexible est inclus entre les antigènes M2-1 et N du 20 VRS. Dans un mode de réalisation, un acide nucléique approprié code pour le polypeptide représenté par SEQ ID NO : 37

Dans un mode de réalisation, l'immunogène peut provenir d'un rétrovirus, par exemple d'un lentivirus 25 tel que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Dans un tel mode de réalisation, les immunogènes peuvent provenir du VIH-1 ou du VIH-2.

Le génome du VIH code pour un certain nombre de protéines différentes, chacune d'entre elles pouvant 30 être immunogène dans sa totalité ou sous la forme d'un fragment lorsqu'elle est exprimée par les vecteurs de

la présente invention. Les protéines d'enveloppe comprennent la gp120, la gp41 et la gp160 du précurseur Env, par exemple. Les protéines autres que des protéines d'enveloppe du VIH comprennent, par exemple, 5 des protéines structurales internes telles que les produits des gènes gag et pol et autres protéines non structurales telles que Rev, Nef, Vif et Tat. Dans un mode de réalisation, le vecteur de l'invention code pour un ou plusieurs polypeptides comprenant le Gag du 10 VIH.

Le gène Gag est traduit sous la forme d'une polyprotéine précurseur qui est clivée par la protéase pour donner des produits qui comprennent la protéine matricielle (p17), la capsid (p24), la nucléocapsid 15 (p9), p6 et deux peptides espaceurs, p2 et p1, tous étant des exemples de fragments de Gag.

Le gène Gag donne lieu à la protéine précurseur Gag de 55 kilodaltons (kD), également dénommé p55, qui est exprimée à partir de l'ARNm viral non épissé. 20 Durant la traduction, l'extrémité N terminale de p55 est myristoylée, déclenchant son association avec l'aspect cytoplasmique des membranes cellulaires. La polyprotéine Gag associée à la membrane recrute deux copies de l'ARN génomique viral conjointement à 25 d'autres protéines virales et cellulaires, ce qui déclenche le bourgeonnement de la particule virale de la surface d'une cellule infectée. Après le bourgeonnement, p55 est clivée avec la protéase codée par le virus (un produit du gène pol) durant le 30 processus de maturation virale en quatre protéines plus petites désignées MA (matrice [p17]), CA (capside

[p24]), NC (nucléocapside [p9]), et p6, toutes étant des exemples de fragments de Gag. Dans un mode de réalisation, les vecteurs de la présente invention comprennent le polypeptide Gag de SEQ ID NO : 16.

5

Adjuvants

Un « adjuvant », tel qu'utilisé dans le présent document, fait référence à une composition qui améliore la réponse immunitaire à un immunogène. Des exemples de 10 ces adjuvants comprennent, de manière non restrictive, des adjuvants inorganiques (par exemple, des sels de métaux inorganiques tels que le phosphate d'aluminium ou l'hydroxyde d'aluminium), des adjuvants organiques (par exemple, les saponines, telles que QS21, ou le 15 squalène), des adjuvants à base d'huile (par exemple, l'adjuvant complet de Freund et l'adjuvant incomplet de Freund), les cytokines (par exemple, IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CFS, et IFN- γ), des adjuvants 20 particulaires (par exemple, des complexes de stimulation immunitaire (ISCOMS), des liposomes, ou des microsphères biodégradables), des virosomes, des adjuvants bactériens (par exemple, le monophosphoryl lipide A, par exemple le monophosphoryl lipide A 3-dé- 25 O-acylé (3D-MPL), ou des muramyl peptides), des adjuvants synthétiques (par exemple, des copolymères séquencés non ioniques, des analogues du muramyl peptide, ou le lipide A synthétique), des adjuvants de polynucléotides synthétiques (par exemple la polyarginine ou la polylysine) et des oligonucléotides 30 de stimulation immunitaire contenant des dinucléotides CpG non méthylés (« CpG »).

Un adjuvant approprié est le monophosphoryl lipide A (MPL), en particulier le monophosphoryl lipide A 3-dé-O-acylé (3D-MPL). Chimiquement, il est souvent fourni sous la forme d'un monophosphoryl lipide A 3-de-5 O-acylé avec 4, 5, ou 6 chaînes acylées. Il peut être purifié et préparé par les procédés enseignés dans GB 2122204B, cette référence décrivant également la préparation du diphosphoryl lipide A, et des variantes 3-O-désacylées de celui-ci. D'autres 10 lipopolysaccharides purifiés et synthétiques ont été décrits (brevet US n° 6005099 et EP 0729473B1 ; Hilgers et al., 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4) : 392-6 ; Hilgers et al., 1987, *Immunology*, 60(1) : 141-6 ; et EP 0549 074 B1).

15 Les saponines sont également des adjuvants appropriés (voir Lacaille-Dubois, M and Wagner H, A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386 (1996)). Par exemple, la saponine Quil A (provenant de l'écorce 20 de bois de Panama, *Quillaja saponaria* Molina, un arbre d'Amérique du Sud), et des fractions de celle-ci, sont décrites dans le brevet US n° 5057540 et dans Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996, 12 : 1-55 ; et dans EP 0362279 B1. Les fractions purifiées de Quil 25 A sont également connues comme des immunostimulants, par exemple QS21 et QS17 ; des procédés pour leur production sont décrits dans le brevet US n° 5057540 et EP 0362279 B1. QS7 (une fraction non hémolytique de Quil-A) est également décrite dans ces références. 30 L'utilisation de QS21 est en outre décrite dans Kensil et al. (1991, *J. Immunology*, 146 : 431-437). Des

5 combinaisons de QS21 et de polysorbate ou de cyclodextrine sont également connues (WO99/10008). Des systèmes d'adjuvants particulaires comprenant des fractions de QuilA, par exemple QS21 et QS7, sont décrits dans WO96/33739 and WO96/11711.

10 Un autre adjuvant est un oligonucléotide immunostimulateur contenant les dinucléotides CpG non méthylés (« CpG ») (Krieg, *Nature* 374 : 546 (1995)). CpG est une abréviation de motifs de dinucléotide cytosine-guanosine présents dans l'ADN. CpG est connu comme un adjuvant lorsqu'il est administré par les voies systémiques et muqueuses (WO96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, *J.Immunol.*, 1998, 160 : 870-876 ; McCluskie and Davis, *J.Immunol.*, 1998, 161 : 4463-6). 15 CpG, lorsqu'il est formulé dans des vaccins, peut être administré dans une solution libre conjointement à un antigène libre (WO96/02555) ou conjugué de façon covalente à un antigène (WO98/16247), ou formulé avec un vecteur tel que l'hydroxyde d'aluminium (Brazolot-Millan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, 95 : 20 15553-8).

25 Des adjuvants tels que ceux décrits ci-dessus peuvent être formulés conjointement à des vecteurs, tels que des liposomes, des émulsions huile-dans-l'eau, et/ou des sels de métaux (y compris des sels d'aluminium tels que l'hydroxyde d'aluminium). Par exemple, le 3D-MPL peut être formulé avec de l'hydroxyde d'aluminium (EP 0689454) ou des émulsions huile-dans-l'eau (WO95/17210) ; QS21 peut être formulé 30 avec des liposomes contenant du cholestérol (WO96/33739), des émulsions huile-dans-l'eau

(WO95/17210) de l'alun (WO98/15287) ; CpG peut être formulé avec de l'alun (Brazolot-Millan, *supra*) ou avec d'autres vecteurs cationiques.

Des combinaisons d'adjuvants peuvent être 5 utilisées dans la présente invention, en particulier une combinaison de monophosphoryl lipide A et d'un dérivé de saponine (voir, par exemple, WO94/00153 ; WO95/17210 ; WO96/33739 ; WO98/56414 ; WO99/12565 ; WO99/11241), plus particulièrement la combinaison de 10 QS21 et de 3D-MPL telle que décrite dans WO94/00153, ou une composition où QS21 est désactivé dans des liposomes contenant du cholestérol (DQ) tel que ceci est décrit dans WO96/33739. En variante, une combinaison de CpG plus une saponine telle que QS21 est 15 un adjuvant approprié pour son utilisation dans la présente invention. Une puissante formulation adjuvante contenant QS21, le 3D-MPL et du tocophérol dans une émulsion huile-dans-l'eau est décrite dans WO95/17210 et constitue une autre formulation destinée à être 20 utilisée dans la présente invention. Des adjuvants de saponine peuvent être formulés dans un liposome et combinés à un oligonucléotide immunostimulateur. Ainsi, des systèmes d'adjuvants adaptés comprennent, par exemple, une combinaison de monophosphoryl lipide A, de 25 préférence de 3D-MPL, conjointement à un sel d'aluminium (par exemple, tel que ceci est décrit dans WO00/23105). Un autre exemple d'adjuvant comprend QS21 et/ou le MPL et/ou le CpG. QS21 peut être éteint dans des liposomes contenant du cholestérol tel que décrit 30 dans WO96/33739.

D'autres adjuvants appropriés comprennent les alkyl glucosaminide phosphates (AGP) tels que ceux décrits dans WO9850399 ou dans le brevet US n° 6,303,347 (des procédés de préparation d'AGP sont également décrits), ou des sels pharmaceutiquement acceptables d'AGP tels que décrits dans le brevet n° US 6,764,840. Certains AGP sont des agonistes de TLR4, et certains sont des antagonistes de TLR4. Les deux sont supposés être utiles en tant qu'adjuvants.

10 On a découvert (WO2007/062656, qui est publié sous US 2011/0293704 et incorporé à titre de référence à des fins de description des séquences de chaînes invariantes) que la fusion de la chaîne invariante à un antigène qui est composé par un système d'expression et 15 utilisé pour la vaccination augmente la réponse immunitaire contre ledit antigène, s'il est administré avec un adénovirus. En conséquence, dans un mode de réalisation de l'invention, le transgène immunogène peut être co-exprimé avec la chaîne invariante dans un vecteur viral ChAd157 recombinant.

20 Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne l'utilisation de la capsid de ChAd157 (facultativement une particule virale intacte ou recombinante ou une capsid vide est utilisée) pour induire une réponse à effet immunomodulateur, ou pour 25 améliorer ou adjuvanter une réponse des lymphocytes T cytotoxiques contre un autre agent actif par délivrance d'une capsid de ChAd157 à un sujet. La capsid de ChAd157 peut être administrée seule ou dans un régime combiné avec un agent actif pour améliorer la réponse 30 immunitaire contre celle-ci. De manière avantageuse,

l'effet souhaité peut être réalisé sans infecter l'hôte avec un adénovirus.

Régimes d'administration

5 Communément, les vecteurs adénoviraux recombinants ChAd157 seront utilisés pour la délivrance de molécules thérapeutiques ou immunogènes (telles que les protéines). On comprendra facilement pour les deux applications, que les vecteurs adénoviraux recombinants de l'invention sont particulièrement bien adaptés pour être utilisés dans des régimes impliquant la délivrance répétée de vecteurs adénoviraux recombinants. Ces régimes impliquent typiquement la délivrance d'une série de vecteurs viraux dans lesquels les capsides virales sont alternées. Les capsides virales peuvent être changées pour chaque administration subséquente, ou après un nombre présélectionné d'administrations d'une capsid de sérotype particulier (par exemple, une, deux, trois, quatre ou plus). Ainsi, un régime peut 10 impliquer la délivrance d'un adénovirus recombinant avec une première capsid, la délivrance d'un adénovirus recombinant avec une deuxième capsid, et la délivrance d'un adénovirus recombinant avec une troisième capsid. Une variété d'autres régimes qui 15 utilisent les capsides adénovirales de l'invention seules, en combinaison les unes avec les autres, ou en combinaison avec d'autres adénovirus (qui ne présentent de préférence pas de réactivité croisée immunologique), seront évidents aux hommes du métier. Facultativement, 20 un tel régime peut impliquer l'administration d'un adénovirus recombinant avec des capsides d'autres 25

30

adénovirus de primate non humain, adénovirus humains, ou séquences artificielles telles que décrites dans le document.

Les vecteurs adénoviraux de l'invention sont 5 particulièrement bien adaptés pour les régimes thérapeutiques dans lesquels de multiples délivrances de transgènes médiées par des adénovirus sont souhaitées, par exemple, dans des régimes impliquant la re-délivrance du même transgène ou dans des régimes de 10 combinaison impliquant la délivrance d'autres transgènes. Ces régimes peuvent impliquer l'administration d'un vecteur adénoviral ChAd157, suivie par la ré-administration avec un vecteur d'un adénovirus du même sérotype. Des régimes 15 particulièrement souhaitables peuvent impliquer l'administration d'un vecteur adénoviral ChAd157, dans lequel la source des séquences de capsidé adénovirale du vecteur administré dans la première administration est différente de la source des séquences de capsidé 20 adénovirale du vecteur viral utilisé dans une ou plusieurs des administrations subséquentes. Par exemple, un régime thérapeutique implique l'administration d'un vecteur de ChAd157 et l'administration répétée avec un ou plusieurs vecteurs adénoviraux modifiés de sérotypes 25 identiques ou différents.

Dans un autre exemple, un régime thérapeutique implique l'administration d'un vecteur adénoviral suivie par l'administration répétée avec un vecteur ChAd157 de l'invention dont la capsidé est différente 30 de la capsidé dans le premier vecteur adénoviral administré, et facultativement l'administration

ultérieure avec un autre vecteur qui est identique ou, de préférence, différent de la source de la capsidé adénovirale du vecteur dans les étapes d'administration préalables. Ces régimes ne se limitent pas à 5 l'administration de vecteurs adénoviraux construits à l'aide des séquences de ChAd157. En revanche, ces régimes peuvent facilement utiliser d'autres séquences adénovirales, y compris, de manière non restrictive, d'autres séquences adénovirales comprenant des 10 séquences adénovirales de primate non humain, ou des séquences adénovirales humaines, en combinaison avec les vecteurs ChAd157.

Dans un autre exemple, un régime thérapeutique peut impliquer une délivrance simultanée (par exemple 15 une co-administration) ou séquentielle (par exemple une primo-immunisation-rappel) de (i) un ou plusieurs vecteurs adénoviraux ChAd157 et (ii) un composant supplémentaire tel que des vecteurs non adénoviraux, des vecteurs non viraux, et/ou une variété de composés 20 ou molécules thérapeutiquement utiles tels que des protéines antigéniques facultativement simultanément administrés avec l'adjuvant. Des exemples de co-administration comprennent une co-administration homolatérale et une co-administration controlatérale 25 (davantage décrite ci-dessous dans la section « Procédés de délivrance et dosage »).

Des vecteurs non adénoviraux adaptés destinés à être utilisés dans une délivrance simultanée ou en particulier séquentielle (par exemple primo- 30 immunisation-rappel) avec un ou plusieurs vecteurs adénoviraux ChAd157 comprennent un ou plusieurs

vecteurs poxviraux. De manière adaptée, le vecteur poxviral appartient à la sous-famille des chordopoxvirinae, de manière plus adaptée à un genre dans ladite sous-famille sélectionné dans le groupe 5 constitué des orthopox, parapox, yatapox, avipox (de manière adaptée canarypox (ALVAC) ou fowlpox (FPV)) et molluscipox. De manière encore plus adaptée, le vecteur poxviral appartient aux orthopox et est sélectionné dans le groupe constitué du virus de la vaccine, du 10 NYVAC (dérivé de la souche Copenhague de la vaccine), du virus modifié de la vaccine Ankara (MVA), du virus cowpox et du virus monkeypox. Idéalement, le vecteur poxviral est le MVA.

Administration « simultanée » fait de manière 15 adaptée référence à la même réponse immunitaire en cours. De préférence les deux composants sont administrés en même temps (par exemple une administration simultanée de l'ADN et de la protéine), cependant, un composant doit être administré quelques 20 minutes après (par exemple, lors de la même consultation médicale ou visite du médecin), ou après quelques heures. On fait également référence à une telle administration comme à une co-administration. Dans certains modes de réalisation, la co- 25 administration peut faire référence à l'administration d'un vecteur adénoviral, d'un adjuvant et d'un composant protéique. Dans d'autres modes de réalisation, la co-administration fait référence à l'administration d'un vecteur adénoviral et d'un autre vecteur viral, 30 par exemple un second vecteur adénoviral ou un poxvirus tel que le MVA. Dans d'autres modes de réalisation, la

co-administration fait référence à l'administration d'un vecteur adénoviral et d'un composant protéique, qui est facultativement adjuvanté.

Un régime de primo-immunisation boost peut être 5 utilisé. Primo-immunisation-boost fait référence à deux réponses immunitaires séparées :

(i) une primo-immunisation initiale du système immunitaire suivie par (ii) une immunisation secondaire ou boost du système immunitaire plusieurs semaines ou 10 mois après l'établissement de la réponse immunitaire primaire.

Un tel régime peut impliquer l'administration d'un vecteur ChAd157 recombinant pour sensibiliser le système immunitaire avant une seconde administration de 15 boost avec un antigène traditionnel, tel qu'une protéine (facultativement co-administrée avec l'adjuvant), ou un virus recombinant portant les séquences codant pour un tel antigène (par exemple, WO00/11140). En variante, un système d'immunisation 20 peut impliquer l'administration d'un vecteur ChAd157 recombinant pour stimuler une réponse immunitaire à un vecteur (viral ou à base d'ADN) codant pour un antigène. Dans une autre variante, un régime d'immunisation implique l'administration d'une protéine suivie par un 25 boost avec un vecteur ChAd157 recombinant codant pour l'antigène. Dans un exemple, le régime de primo-immunisation-boost peut fournir une réponse immunitaire protectrice contre le virus, les bactéries ou autre organisme duquel l'antigène provient. Dans un autre 30 mode de réalisation, le régime de primo-injection-boost fournit un effet thérapeutique qui peut être mesuré en

utilisant des essais classiques de détection de la présence de l'affection pour laquelle la thérapie est administrée.

De préférence, une composition de boost est administrée environ 2 à environ 27 semaines après l'administration de la composition de primo-immunisation au sujet. L'administration de la composition de boost est réalisée en utilisant une quantité efficace d'une composition de boost contenant ou capable de délivrer le même antigène que, ou un antigène différent de, celui administré par le vaccin de primo-immunisation. La composition de boost peut être composée d'un vecteur viral recombinant dérivé de la même source virale ou d'une autre source. En variante, la composition de boost peut être une composition contenant le même antigène que celui codé dans le vaccin de primo-immunisation, mais sous la forme d'une protéine, la composition induisant une réponse immunitaire chez l'hôte. Les principales exigences de la composition de boost sont que l'antigène de la composition soit le même antigène, ou un antigène présentant une réactivité croisée, que celui codé par la composition de sensibilisation.

Une faible réactivité croisée entre des anticorps neutralisant contre ChAd157 et certains autres vecteurs adénoviraux, par exemple ChAd155, est bénéfique dans des contextes dans lesquels de multiples administrations de vecteurs sont requises. Les multiples administrations peuvent être utilisées pour les fins de la délivrance séparée de différents transgènes (par exemple, codant pour des immunogènes

associés à différentes indications médicales) ou la délivrance des mêmes transgènes ou de transgènes similaires (par exemple, dans un régime de primo-immunisation-boost pour faire augmenter la réponse 5 immunitaire contre une indication médicale particulière).

Par conséquent, l'invention concerne un vecteur adénoviral recombinant de l'invention codant pour un transgène, pour son administration à un sujet qui a été 10 préalablement exposé à un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou le dérivé fonctionnel de celle-ci, tel que décrit dans le présent document (par exemple, ne comprend pas de fibre, d'hexon ou de penton de ChAd157 tel que décrit 15 dans le présent document, par exemple un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155, notamment un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton de ChAd155). En particulier, l'invention 20 concerne un vecteur adénoviral recombinant de l'invention codant pour un transgène pour son administration à un sujet qui a déjà reçu un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou le dérivé fonctionnel de celle-ci, tel que 25 décrit dans le présent document (par exemple, ne comprend pas de fibre, d'hexon ou de penton de ChAd157 tel que décrit dans le présent document, par exemple un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155, notamment un vecteur 30 adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton de ChAd155). De manière adaptée, le

vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157 est un vecteur qui présente une faible réactivité croisée avec ChAd157. Dans un mode de réalisation, le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157 code pour un transgène dirigé contre une indication ou des indications médicales différentes par rapport au vecteur adénoviral recombinant du transgène de l'invention. Dans un autre mode de réalisation, le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157 code pour un transgène dirigé contre la même ou les mêmes indications médicales que le vecteur adénoviral recombinant du transgène de l'invention (par exemple, le même transgène).

L'invention concerne en outre un vecteur adénoviral recombinant de l'invention codant pour un transgène pour son administration à un sujet qui peut être (en d'autres termes, qui est destiné à être ou dont on s'attend à ce qu'il soit) ensuite exposé à un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci, tel que décrit dans le présent document (par exemple, ne comprend pas de fibre, d'hexon ou de penton de ChAd157 tel que décrit dans le présent document, par exemple un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155, notamment un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton de ChAd155). En particulier, l'invention concerne un vecteur adénoviral recombinant de l'invention codant pour un transgène pour l'administration à un sujet qui peut ensuite

recevoir un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci, tel que décrit dans le présent document (par exemple, ne comprend pas de fibre, 5 d'hexon ou de penton de ChAd157 tel que décrit dans le présent document, par exemple un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155, notamment un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton 10 de ChAd155). De manière adaptée, le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157 est un vecteur qui présente une faible réactivité croisée avec ChAd157. Dans un mode de réalisation, le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de 15 ChAd157 code pour un transgène dirigé contre une indication ou des indications médicales différentes par rapport au vecteur adénoviral recombinant du transgène de l'invention. Dans un autre mode de réalisation, le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157 code pour un transgène dirigé contre 20 la même ou les mêmes indications médicales que le vecteur adénoviral du transgène de l'invention (par exemple, le même transgène).

La présente invention concerne par conséquent un 25 procédé destiné à éliciter une réponse immunitaire chez un sujet, ledit procédé comprenant :

- (a) l'administration au sujet d'un vecteur adénoviral recombinant de l'invention codant pour un premier transgène ; et
- 30 (b) l'administration au sujet d'un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de

ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci comme décrit dans le présent document, le vecteur codant pour un second transgène ;

5 dans lequel les étapes (a) et (b) peuvent être entreprises dans l'un ou l'autre ordre et les premier et second transgènes peuvent être identiques ou différents.

Les premier et second transgènes coderont typiquement pour des immunogènes qui sont utiles pour 10 immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel que des bactéries, des champignons, des microorganismes parasites ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une 15 cellule tumorale. Les premier et second transgènes peuvent coder pour les mêmes immunogènes ou pour des immunogènes différents. Lorsqu'ils codent pour des immunogènes différents, ceux-ci peuvent être dirigés contre le même pathogène ou la même cellule cancéreuse 20 ou la même cellule tumorale ou un pathogène ou une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale différente.

Par conséquent, l'invention concerne également un procédé de prophylaxie ou de traitement d'un sujet, ledit procédé comprenant :

25 (a) l'administration au sujet d'un vecteur adénoviral recombinant de l'invention codant pour un premier transgène codant pour un immunogène qui est utile pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel que des bactéries, des 30 champignons, des microorganismes parasites ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés

humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale ; et

(b) l'administration au sujet d'un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci comme décrit dans le présent document, le vecteur codant pour un second transgène codant pour un immunogène qui sera utile pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel que des bactéries, des champignons, des microorganismes parasitaires ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale ;

dans lequel les étapes (a) et (b) peuvent être entreprises dans l'un ou l'autre ordre.

Le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci comme décrit dans le présent document, ne comprend, de manière adaptée, pas de fibre de ChAd157, d'hexon de ChAd157 ou de fibre de ChAd157, par exemple, ne comprend pas de fibre de ChAd157, d'hexon de ChAd157 ou de fibre de ChAd157 ou de dérivés fonctionnels de ceux-ci ayant une identité d'au moins 98 % avec ceux-ci.

Le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci tel que décrit dans le présent document peut être un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155, notamment un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton de ChAd155.

Tel que ceci a été mentionné, un vecteur adénoviral recombinant de l'invention peut être utilisé pour la délivrance de molécules thérapeutiques ou immunogènes conjointement à un vecteur adénoviral 5 recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155. Le vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 comprendra une fibre, un penton et/ou un hexon selon SEQ ID NO : 7, 9 et 11, en particulier une fibre, 10 un penton et un hexon selon SEQ ID NO : 7, 9 et 11.

Par le terme faible réactivité croisée, on entend que l'immunisation avec un premier vecteur n'entraîne pas de réponse notable des anticorps neutralisants contre un second vecteur, en d'autres termes n'a pas un 15 impact considérable sur la puissance immunologique du second vecteur. Les réponses des anticorps neutralisants peuvent être déterminées avec des procédés analogues à ceux de l'exemple 7 proposé dans le présent document. De manière souhaitable, 20 l'immunisation avec un premier vecteur élicite deux fois un titre de neutralisation qui est en moyenne inférieur à 50 % du niveau provoqué par l'immunisation avec le second vecteur, par exemple inférieur à 75 %, de manière adaptée inférieur à 90 %.

25 Par le terme « sujet », on entend tout animal, de manière adaptée un mammifère, et en particulier un être humain.

Procédé de délivrance et dosage

30 Le vecteur peut être préparé pour l'administration par mise en suspension ou dissolution dans un vecteur

pharmaceutiquement ou physiologiquement acceptable tel qu'une solution saline isotonique ; une solution de sels isotoniques ou autres formulations qui seront évidentes aux hommes du métier. Le vecteur adapté sera 5 évident aux hommes du métier et dépendra en grande partie de la voie d'administration. Les compositions décrites dans le présent document peuvent être administrées à un mammifère dans une formulation à libération prolongée en utilisant un polymère 10 biocompatible biodégradable, ou par délivrance sur site à l'aide de micelles, de gels et de liposomes.

Dans certains modes de réalisation, l'adénovirus recombinant de l'invention est administré à un sujet 15 par injection intramusculaire, par administration intravaginale, par injection intraveineuse, par injection intrapéritonéale, par injection sous-cutanée, par administration épicutanée, par administration intradermique, par administration nasale, par administration rectale ou par administration orale. 20 L'administration sublinguale peut également présenter un intérêt.

Si le régime thérapeutique implique la co-administration d'un ou de plusieurs vecteurs adénoviraux ChAd157 et d'un autre composant, chacun 25 formulé dans des compositions différentes, ils sont de manière favorable administrés co-localement au niveau ou à proximité du même site. Par exemple, les composants peuvent être administrés (par exemple, via une voie d'administration sélectionnée parmi la voie 30 intramusculaire, transdermique, intradermique, sous-cutanée) au même côté ou à la même extrémité

(administration « co-latérale ») ou à des côtés opposés ou des extrémités opposées (administration « controlatérale »).

Les dosages du vecteur viral dépendront principalement de facteurs tels que l'affection traitée, l'âge, le poids et la santé du patient, et peuvent ainsi varier selon les patients. Par exemple, une dose du vecteur viral thérapeutiquement efficace vétérinaire ou pour un être humain adulte contient généralement 10 1×10^5 à 1×10^{15} particules virales, par exemple de 1×10^8 à 1×10^{12} (par exemple, 1×10^8 , $2,5 \times 10^8$, 5×10^8 , 1×10^9 , $1,5 \times 10^9$, $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 , 1×10^{10} , $1,5 \times 10^{10}$, $2,5 \times 10^{10}$, 5×10^{10} , 1×10^{11} , $1,5 \times 10^{11}$, $2,5 \times 10^{11}$, 5×10^{11} , 1×10^{12} particules). En variante, 15 un vecteur viral peut être administré à une dose qui varie typiquement de 1×10^5 à 1×10^{10} unités formant plaques (UFP), par exemple 1×10^5 UFP, $2,5 \times 10^5$ UFP, 5×10^5 UFP, 1×10^6 UFP, $2,5 \times 10^6$ UFP, 5×10^6 UFP, 1×10^7 UFP, $2,5 \times 10^7$ UFP, 5×10^7 UFP, 1×10^8 UFP, 20 $2,5 \times 10^8$ UFP, 5×10^8 UFP, 1×10^9 UFP, $2,5 \times 10^9$ UFP, 5×10^9 UFP, ou 1×10^{10} UFP. Les doses varieront en fonction de la taille de l'animal et de la voie d'administration. Par exemple, une dose humaine ou vétérinaire adaptée (pour un animal d'environ 80 kg) 25 pour une injection intramusculaire se trouve dans la plage d'environ 1×10^9 à environ 5×10^{12} particules par ml, pour un site unique. Facultativement, de multiples sites d'administration peuvent être utilisés. Dans un autre exemple, une dose vétérinaire ou humaine 30 appropriée peut se trouver dans la plage d'environ

1 x 10¹¹ à environ 1 x 10¹⁵ particules pour une formulation orale.

Le vecteur viral peut être quantifié par analyse par PCR quantitative (Q-PCR), par exemple avec des 5 amorces et une sonde conçues sur la région du promoteur du CMV en utilisant en tant que courbe d'étalonnage une dilution en série d'ADN plasmidique contenant le génome du vecteur avec la cassette d'expression comprenant le promoteur du HCMV. Le nombre de copies dans 10 l'échantillon de test est déterminé par le procédé d'analyse en lignes parallèles. Des variantes de procédés pour la quantification des particules de vecteur peuvent être un procédé de CLHP analytique ou un procédé spectrophotométrique basé sur A₂₆₀ nm.

15 Une quantité d'un acide nucléique efficace sur le plan immunologique peut de manière appropriée se situer entre 1 ng et 100 mg. Par exemple, une quantité appropriée peut être de 1 µg à 100 mg. Une quantité appropriée de l'acide nucléique particulier (par 20 exemple, du vecteur) peut être facilement déterminée par un homme du métier.

Des exemples de quantités efficaces d'un composant acide nucléique peuvent se situer entre 1 ng et 100 µg, par exemple entre 1 ng et 1 µg (par exemple, 100 ng- 25 1 µg), ou entre 1 µg et 100 µg, par exemple 10 ng, 150 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, ou 1 µg. Des quantités efficaces d'un acide nucléique peuvent aussi comprendre de 1 µg à 500 µg, par exemple entre 1 µg et 200 µg, par exemple entre 110 et 100 µg, 30 par exemple 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, ou 200 µg. En variante, un

exemple de quantité efficace d'un acide nucléique peut se situer entre 100 µg et 1 mg, par exemple de 100 µg à 500 µg, par exemple, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg 5 ou 1 mg.

Généralement, une dose humaine sera un volume compris entre 0,1 ml et 2 ml. Ainsi, la composition décrite dans le présent document peut être formulée en un volume, par exemple de 0,1, 0,15, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 10 ou 2,0 ml de dose humaine par composant immunogène individuel ou combiné.

Un homme du métier peut ajuster ces doses, en fonction de la voie d'administration et de l'application thérapeutique ou vaccinale pour laquelle 15 le vecteur recombinant est utilisé. Les niveaux de l'expression du transgène, ou pour un adjuvant, le niveau d'anticorps circulant, peuvent être surveillés pour déterminer la fréquence d'administration de la dose.

20 Si une ou plusieurs étapes de sensibilisation et/ou de rappel sont utilisées, cette étape peut comprendre une dose unique qui est administrée sur une base horaire, quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle, ou annuelle. Par exemple, les mammifères peuvent 25 recevoir une ou deux doses contenant d'environ 10 µg à environ 50 µg de plasmide dans un vecteur. La quantité ou le site de délivrance est de manière souhaitable sélectionné(e) en se basant sur l'identité et l'affection du mammifère.

30 Les niveaux thérapeutiques de, ou le niveau de réponse immunitaire contre, la protéine codée par le

transgène sélectionné peuvent être surveillés pour déterminer le besoin, le cas échéant, de rappels. Après une évaluation de la réponse des cellules T CD8+, ou facultativement, des titres d'anticorps, dans le sérum, 5 facultativement des immunisations de rappel peuvent être souhaitées. Facultativement, les vecteurs adénoviraux recombinants ChAd157 peuvent être délivrés en une seule administration ou dans différents régimes combinés, par exemple, en combinaison avec un régime ou 10 un cours de traitement impliquant d'autres ingrédients actifs ou dans un régime comprenant une primo-immunisation et un rappel.

La présente invention va maintenant être décrite plus en détails au moyen des exemples non limitatifs 15 suivants.

EXEMPLES

Exemple 1 : isolement de ChAd157 et construction de vecteur

20 On a isolé 29 types différents d'adénovirus de chimpanzé de type sauvage à partir de jeunes chimpanzés sains hébergés dans des installations européennes à l'aide de procédures standard tel que décrit dans Colloca et. al. Sci Transl Med. 2012 Jan 4 ; 4(115) : 25 115ra2 et WO2010/086189, qui est ainsi intégré au présent document à titre de référence pour les fins de description des techniques d'isolement et de caractérisation d'adénovirus.

30 On a ensuite rassemblé les 29 virus de type sauvage en un pool ; on a cloné le génome viral du pool par recombinaison homologue dans des cellules BJ5183

d'*E. coli* en utilisant une navette BAC, pour créer une minibanque de vecteurs portant la délétion de la région E1. On a transfecté la minibanque de vecteurs Δ E1 dans une lignée cellulaire Procell 92 ; on a repiqué les 5 vecteurs sauvés en série pour 16 passages d'infection. Au passage 16, on a préparé l'ADN viral du vecteur amplifié et on l'a cloné par recombinaison homologue dans des cellules *E. coli* BJ5183 en utilisant une navette plasmidique. On a identifié l'espèce de vecteur 10 prévalente comme le vecteur ChAd157 Δ E1 et on l'a ensuite modifié pour qu'il comprenne les modifications supplémentaires suivantes du squelette de vecteur :

- 15 a) délétion de la région E4 (de la pb 34413 à la pb 37127) du virus Δ E1 ;
- b) insertion de E4orf6 dérivé d'Ad5 humain.

1.1 : Génération de la minibanque de Δ E1

On a utilisé le pool de 29 virus de types sauvage pour obtenir un génome viral groupé. On a cloné le 20 génome viral groupé dans un vecteur BAC par recombinaison homologue dans une souche d'*E. coli* BJ5183 co-transformée avec un ADN viral groupé et la navette BAC du sous-groupe C (#1365) (SEQ ID NO : 14). Tel que ceci est présenté sur le schéma de la figure 2, 25 la navette du sous-groupe C est un vecteur BAC dédié au clonage de ChAd appartenant à l'espèce C et contient par conséquent le gène pIX et des fragments d'ADN dérivés des extrémités droite et gauche (y compris les ITRs droite et gauche) des virus ChAd de l'espèce C.

30 La navette BAC de l'espèce C contient également une cassette RpsL-Kana insérée entre l'extrémité gauche

et le gène pIX. En outre, une cassette de sélection Amp-LacZ-SacB, flanquée des sites de restrictions ISceI, est présente entre le gène pIX et l'extrémité droite du génome viral. En particulier, la navette BAC comprend 5 les éléments suivants : ITR gauche : pb 27 à 139, cassette hCMV(tetO) RpsL-Kana : pb 493 à 3396, gène pIX : pb 3508 à 3972, sites de restriction ISceI : pg 3990 et 7481, une cassette de sélection Amp-LacZ-SacB : pb 4000 à 7471, ITR droite : pb 7805 à 7917. hCMV(tetO) 10 est proposé dans SEQ ID NO : 37.

Les cellules BJ5183 ont été co-transformées par électroporation avec le pool d'ADN viraux purifiés et avec le vecteur navette BAC de sous-groupe C digéré par l'enzyme de restriction ISceI avant de les purifier du 15 gel. La recombinaison homologue qui survient entre le gène pIX et les séquences ITR droites (présentes au niveau des extrémités de l'ADN linéarisé de la navette BAC de l'espèce C) et des séquences homologues présentes dans l'ADN viral groupé a conduit à 20 l'insertion des différents ADN génomiques dans le vecteur navette BAC. En même temps, on a déleté les régions virales sE1 et on les a substituées par la cassette RpsL-Kana, générant BAC/minibanqueΔE1/ Teto hCMV RpsL-Kana.

25

1.2 : Amplification de la minibanque de ΔE1 dans la lignée cellulaire Procell 92 et clonage du vecteur ChAd157ΔE1

La minibanque de ΔE1 a été digérée par PmeI et 30 utilisée pour transfecter la lignée cellulaire d'empaquetage Procell 92, de manière à sauver la banque

de différents virus en vrac. Dix jours après la transfection, on a récolté les cellules et on a soumis le lysat cellulaire à trois cycles de congélation (-70 °C) et décongélation (+37 °C), on l'a clarifié par 5 centrifugation à 2 000 tr/min puis on l'a utilisé pour infecter des cellules fraîches. On a réalisé 16 passages en série d'amplification de virus, de manière à sélectionner l'espèce virale pour l'efficacité de propagation dans des cellules Procell92. On a purifié 10 le(s) virus au passage 16 par deux centrifugations en gradient de CsCl et on a extrait l'ADN viral puis on l'a cloné par recombinaison homologue dans des cellules *E. coli* BJ5183 en utilisant une navette plasmidique. De manière plus détaillée, on a co-transformé les cellules 15 BJ5183 avec de l'ADN viral purifié et la navette plasmidique de sous-groupe C (SEQ ID NO : 38). Tel que ceci est présenté sur le diagramme de la figure 3, la navette plasmidique du sous-groupe C est un vecteur plasmidique dédié au clonage de ChAd appartenant à 20 l'espèce C et contient par conséquent les fragments d'ADN dérivés des extrémités droite et gauche (y compris les ITRs droite et gauche) des virus ChAd de l'espèce C.

La recombinaison homologue entre les séquences 25 d'ADN des ITRs gauche et droite présentes au niveau des extrémités de la navette plasmidique de sous-groupe C (digérés avec PshAI/NdeI/XbaI) et les ADN génomiques viraux ont permis son insertion dans le vecteur plasmidique. On a amplifié 30 clones différents et on 30 les a analysés par analyse de restriction ; on a identifié 9 espèces différentes. Dix-neuf clones/30 ont

présenté le même profil de restriction et représentaient l'espèce prédominante ; on a sélectionné l'un de ces clones et on l'a identifié comme pChAd157ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 (SEQ ID NO : 15).

5

1.3 : Construction de ChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557

On a cloné la cassette GAG (séquence polynucléotidique de GAG SEQ ID NO : 16) dans un vecteur pré-adéno accepteur linéarisé via recombinaison 10 homologue dans *E. coli* par exploitation de l'homologie existant entre le promoteur HCMV et les séquences polyA de BGH (SEQ ID NO : 39).

On a clivé le plasmide pARS CV32TetO hCMV GAG avec SpeI et SphI pour exciser le fragment de 2,44 Kb 15 contenant le promoteur du HCMV avec tetO, HIV-GAG et la séquence polyA de BGH.

On a cloné le fragment HIV-GAG de 2,44 kB par recombinaison homologue dans le vecteur accepteur pChAd157 ΔE1/TetO hCMV RpsL-Kana (#1551) (digéré par 20 SnabI) portant la cassette de sélection RpsL-Kana sous le contrôle du HCMV et de BGH_pA. La construction obtenue était le vecteur pChAd157 ΔE1/TetO hCMV GAG#1557 (SEQ ID NO : 17).

La structure du plasmide portant le GAG de ChAd157 25 est rapportée sur la figure 4.

1.4 : Construction de ChAd157 ΔE1E4 Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana#1594

On a ensuite modifié le vecteur ChAd157ΔE1 pour 30 qu'il porte les modifications suivantes dans le squelette :

a) délétion de la région E4 (de la pb 34413 à la pb 37127) du virus Δ E1 ;

b) insertion de E4orf6 dérivé d'Ad5 humain.

On a introduit une délétion de la région E4 allant 5 du nucléotide 34413 au 37127 (coordonnées de la séquence du vecteur Δ E1) dans le squelette du vecteur par remplacement de la région native E4 avec la séquence codante d'E4orf6 d'Ad5 en utilisant une stratégie impliquant plusieurs étapes de clonage et de 10 recombinaison homologue dans *E. coli*. On a complètement délétré la région codante d'E4 alors que l'on a conservé le promoteur natif d'E4 et le signal de polyadénylation. À cette fin, on a construit un vecteur navette pour permettre l'insertion d'Ad5orf6 par remplacement de la 15 région E4 native de ChAd157 par recombinaison homologue dans *E. coli* BJ5183 tel que détaillé ci-dessous.

- Construction de pARS SpeciesC Ad5E4orf6-1 : on a obtenu de l'ADN contenant Ad5orf6 par PCR en utilisant l'ADN d'Ad5 en tant que matrice, avec les 20 oligonucléotides : 5'-

ATACGGACTAGTGGAGAAGTACTCGCCTACATG-3' (SEQ ID NO : 18) et 5'-ATACGGAAGATCTAAGACTTCAGGAAATATGACTAC-3' (SEQ ID NO : 19). Le fragment de PCR a été digéré par BglII et SpeI puis on l'a cloné dans la navette pARS Species C 25 RLD-EGFP digérée par BglII et SpeI, générant le plasmide pARS Species C Ad5orf6-1.

- Construction de pARS Species C Ad5E4orf6-2 :

On a amplifié un fragment d'ADN de 144 pb 30 contenant le polyA d'E4 de fibre (de pb 34269 à pb 34412 du vecteur ChAd157 Δ E1) par PCR en utilisant en tant que matrice le plasmide pChAd157 Δ E1/TetO hCMV

RpsL-Kana (#1551) avec les oligonucléotides suivants :

5'-ATTCAGTGTACAGGCGGCCAAAGCATGACACTGATGTTCATTC-3'

(SEQ ID NO : 20) et 5'-
ACTAGGACTAGTTATAAGCTAGAATGGGGCTTG-3' (SEQ ID NO : 21).

5 Le fragment de PCR a été digéré par BsrGI et SpeI puis on l'a cloné dans pARS SubGroupC Ad5orf6-1 digéré avec BsrGI et SpeI, générant le plasmide pARS SpeciesC Ad5orf6-2 (SEQ ID NO : 40).

On a alors utilisé le plasmide pARS SpeciesC Ad5orf6-2 obtenu pour remplacer E4 par Ad5orf6 dans squelette de ChAd157. À cette fin, le plasmide pChAd157ΔE1 TetO hCMV RpsL-Kana#1551 a été digéré avec PacI et co-transformé dans des cellules BJ5183 avec le plasmide pARS SpeciesC Ad5orf6-2 digéré par BamHI/AscI, 15 pour obtenir le plasmide pré-adéno pChAd157ΔE1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana (#1594) (SEQ ID NO : 22).

1.5 : Construction de ChAd157ΔE1E4 Ad5E4orf6/TetO hCMV

20 RG#1559.

On a cloné la cassette d'expression de la glycoprotéine virale de la rage (RG) (séquence polynucléotidique de la glycoprotéine de la rage SEQ ID NO : 23) dans un vecteur pré-adéno accepteur linéarisé 25 par recombinaison homologue dans *E. coli* par exploitation de l'homologie existante entre le promoteur de HCMV et les séquences polyA du BGH.

On a clivé le plasmide pjTetOhCMV-bghpolyA_RG avec SpeI et AsiSI pour exciser le fragment de 2,59 Kb 30 contenant le promoteur du HCMV avec tetO, RG et la séquence polyA de BGH.

On a cloné le fragment RG de 2,59 kB obtenu par recombinaison homologue dans le vecteur accepteur pChAd157 Δ E1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RpsL-Kana (#1594) portant la cassette de sélection RpsL-Kana sous le 5 contrôle du hCMV et de BGHPA. On a linéarisé le plasmide accepteur préAd avec l'endonucléase de restriction SnaBI. La construction obtenue était le vecteur pChAd157 Δ E1E4_Ad5E4orf6/TetO hCMV RG#1559 (SEQ ID NO : 24).

10 La structure du plasmide portant le RG de ChAd157 est rapportée sur la figure 6.

Exemple 2 : Production de vecteur

On a évalué la productivité de ChAd157 en 15 comparaison à ChAd19 et ChAd155 dans la lignée cellulaire Procell92.

2.1 : Production de vecteurs comprenant le transgène Gag du VIH

20 On a sauvé ChAd157/GAG, ChAd19/GAG, ChAd155/GAG (les vecteurs ChAd157, ChAd19 et ChAd155 exprimant un transgène Gag du VIH) et on les a amplifiés dans Procell 92 ; on a utilisé les lysats pour infecter un flacon T25 de Procell 92 cultivé en monocouche avec 25 chaque vecteur. On a utilisé une multiplicité d'infection (MOI) de 300 pv/cellule et on a réalisé les infections en présence de tétracycline parce que ChAd19/GAG ne possédait pas le contrôle transcriptionnel médié par l'insertion de l'opérateur TetO dans le promoteur du hCMV. On a récolté les 30 cellules infectées lorsqu'un effet cytopathique complet

éétait évident (48 heures après l'infection pour ChAd157/GAG et ChAd155/GAG et 5 jours après l'infection pour ChAd19/GAG) ; les virus ont été libérés des cellules infectées par trois cycles de 5 congélation/décongélation (-70 °C à 37 °C) puis on a clarifié le lysat par centrifugation. On a quantifié les lysats clarifiés par analyse par PCR quantitative avec des amorces et une sonde complémentaires de la région du promoteur du CMV. Les séquences 10 oligonucléotidiqes sont les suivantes : CMVfor 5' - CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA-3' (SEQ ID NO : 25), CMVrev 5' -GACTTGGAAATCCCCGTGAGT-3' (SEQ ID NO : 26), sonde CMVFAM-TAMRA 5' -ACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTT-3' (SEQ ID NO : 41) (on a réalisé les QPCRs sur un détecteur de 15 séquence 7900 ABI Prism d'Applied Biosystem).

Les titres volumétriques obtenus (pv/ml) mesurés sur des lysats clarifiés et la productivité spécifique exprimée en particules virales par cellule (pv/cellule) sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous.

20

Tableau 1 : Productivité du vecteur GAG.

Vecteur	Productivité volumétrique (pv/ml)	pv totales	Productivité spécifique des cellules (pv/cellule)
ChAd157/GAG	4,61E+09	2,30E+10	7,68E+03
ChAd155/GAG	5,42E+09	2,71E+10	9,04E+03
ChAd19/GAG	4,80E+08	2,40E+09	8,00E+02

25 30 2.2 : Production de vecteurs comprenant un transgène RG

On a réalisé un lot différent d'expériences pour évaluer la productivité de vecteurs de vaccins RG dans des cellules Procell 92 cultivées en suspension. L'expérience comparait ChAd157/RG et ChAd155/RG en 5 parallèle par infection de Procell 92 à une densité cellulaire de 5×10^5 cellules/ml. On a utilisé une multiplicité d'infection (MOI) de 300 pv/cellule. On a récolté les cellules infectées 4 jours après l'infection ; le virus a été libéré des cellules 10 infectées par trois cycles de congélation/décongélation puis on a clarifié le lysat par centrifugation. On a alors quantifié les lysats clarifiés par QPCR tel que rapporté ci-dessus.

La productivité volumétrique et la productivité 15 spécifique des cellules sont données dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Productivité du vecteur RG.

20	Vecteur	Productivité volumétrique (pv/ml)	pv totales	Productivité spécifique des cellules (pv/cellule)
	ChAd157/RG	9,39E+09	4,69E+11	1,88E+04
25	ChAd155/RG	1,41E+10	7,04E+11	2,81E+04

Exemple 3 : niveaux d'expression des transgènes

3.1 : Niveau d'expression du transgène Gag du VIH

On a comparé les niveaux d'expression dans des expériences parallèles par infection de cellules HeLa 30 avec les vecteurs ChAd19, ChAd155 et ChAd157 comprenant un transgène Gag du VIH.

On a ensemencé des cellules HeLa dans des boîtes de 35 mm et on les a infectées avec les virus purifiés ChAd19/GAG, ChAd157/GAG et ChAd155/GAG en utilisant une MOI = 250 pv/cellule. On a récolté les surnageants de 5 cellules HeLa infectées 48 heures après l'infection, et on a quantifié la production de la protéine GAG du VIH sécrétée à l'aide d'un kit ELISA disponible dans le commerce (HIV-1 p24 ELISA Kit, PerkinElmer Life Science). On a réalisé la quantification selon les 10 instructions du fabricant en utilisant une courbe d'étalonnage de l'antigène p24 du VIH-1.

Les résultats, exprimés en pg/ml de la protéine GAG, sont illustrés dans la figure 7.

15 3.2 : Niveau d'expression du transgène RG

On a également réalisé une analyse par western blot pour évaluer l'expression de la glycoprotéine de la rage fournie par le vecteur ChAd157/RG en comparaison avec le vecteur ChAd155/RG. À cette fin, on 20 a ensemencé des cellules HeLa dans des boîtes de 35 mm et on les a infectées avec les virus purifiés ChAd157/RG et ChAd155/RG en utilisant une MOI = 250 pv/cellule. On a récolté les lysats cellulaires 48 heures après l'infection et on a évalué le niveau 25 d'expression des transgènes par SDS-PAGE réductrice suivie d'une analyse par western blot.

On a chargé des quantités équivalentes d'extraits protéiques sur des gels SDS réducteurs ; après la séparation par électrophorèse, on a transféré les 30 protéines sur une membrane de nitrocellulose pour les sonder avec un anti-GP polyclonal de lapin (cat. No.

RBVGP11-S α Diagnostic, dilué à 1/1000). Après l'incubation avec l'anticorps primaire, on a lavé la membrane et on l'a mise à incuber avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). 5 Finalement, on a développé les essais par chimiluminescence en utilisant des réactifs de détection pour chimiluminescence améliorée (ECL) (W3252282 PIERCE). Les résultats de western blot sont présentés sur la figure 8.

10 Une bande d'environ 57 kD indiquée par la flèche a été révélée par l'anticorps polyclonal anti-GP, qui correspond au poids attendu de la glycoprotéine de la rage.

15 Le résultat met en évidence que le niveau d'expression du vecteur ChAd157 apparaît comparable à celui fourni par ChAd155.

Exemple 4 : évaluation de la puissance immunologique par des expériences d'immunisation chez les souris

20 4.1 : Immunogénicité de vecteurs comprenant le transgène Gag du VIH

On a évalué l'immunogénicité du vecteur ChAd157/GAG en parallèle avec ChAd155/GAG et ChAd19/GAG chez des souris BALB/c (6 par groupe). On a réalisé 25 l'expérience par injection de 10^7 particules virales par voie intramusculaire. On a mesuré la réponse des lymphocytes T 3 semaines après l'immunisation par ELISpot (enzyme-linked immunospot) anti-interféron- γ (IFN- γ) en utilisant un épitope des lymphocytes T CD8+ spécifiques de GAG cartographié chez des souris BALB/c. 30 Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 9,

exprimés sous la forme de cellules sécrétant de l'IFN γ (SCF) par million de splénocytes.

Chaque point représente la réponse d'une seule souris, et la ligne correspond à la moyenne géométrique 5 de chaque groupe de dose. La fréquence de souris positives au peptide immunodominant CD8 est présentée sur l'axe des X.

4.2. Immunogénicité de vecteurs comprenant le transgène

10 RG

On a évalué le pouvoir immunologique de ChAd157/RG et ChAd155/RG chez des souris BALB/c. On a injecté les deux vecteurs par voie intramusculaire avec des doses de 10^7 et 10^6 pfu. On a isolé les splénocytes de souris 15 immunisés sept semaines après la vaccination et on les a analysés par ELISpot anti-IFN γ (figure 10), en utilisant des pools de peptide de RG en tant qu'antigène.

Les niveaux de la réponse immunitaire étaient 20 réduits, en phase avec une dose réduite, comme attendu. En outre, le vecteur ChAd155RG a induit une réponse des lymphocytes T supérieure à ChAd157 RG, bien qu'elles n'étaient pas significativement différentes (figure 10).

25 Exemple 5 : évaluation de l'infectivité

5.1 Infectivité de vecteurs comprenant le transgène Gag du VIH

On a évalué l'infectivité de virus purifiés dans des cellules Procell 92 adhérentes en utilisant un 30 anticorps contre la protéine hexon de l'adénovirus pour visualiser des cellules infectées par coloration

immunocytochimique. L'anticorps contre la protéine hexon reconnaît tous les sérotypes d'adénovirus. À cette fin, on a ensemencé des cellules Procell92 dans des plaques à 24 puits à une densité de 2×10^5 cellules viables/ml et on les a infectées en double avec les vecteurs ChAd157/GAG et ChAd155/GAG et ChAd19/GAG en utilisant une MOI = 1 pv/cellule, 0,5 pv/cellule et 0,25 pv/cellule. Quarante-huit heures après l'infection, on a fixé les cellules infectées au méthanol froid puis on les a marquées avec l'anticorps anti-hexon. On a retiré l'excès d'anticorps. On a alors mis les cellules marquées à incuber avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort et la détection a été réalisée en utilisant un kit disponible dans le commerce VECTOR NOVARED Substrate Kit (SK-4800). La détection est réalisée lorsque le marqueur, l'enzyme peroxydase de raifort, réagit avec le substrat de DAB, résultant en un produit marron. On a alors quantifié les cellules marron foncé marquées par microscopie optique et on a calculé le titre infectieux. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Virus	Pv/ml	Ifu/ml	R (pv/ifu)
ChAd155 GAG	1,32E+11	1,58E+09	84
ChAd157 GAG	1,17E+11	1,23E+09	95
ChAd19 GAG	4,46E+10	3,86E+08	116

Les résultats ont mis en évidence que l'infectivité des virus ChAd155 et ChAd157 était comparable et supérieure à celle de ChAd19.

5.2 Infectivité de vecteurs comprenant le transgène RG

On a évalué l'infectivité des virus purifiés ChAd157/RG et ChAd155/RG dans des cellules Procell 92 adhérentes par immunocoloration de l'hexon tel que rapporté ci-dessus. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Virus	Pv/ml	Ifu/ml	R (pv/ifu)
ChAd155/RG	4,23E+11	4,06E+09	104
ChAd157/RG	1,97E+11	1,46E+09	133

Le résultat a mis en évidence que l'infectivité des virus ChAd155 et ChAd157 était comparable.

15 Exemple 6 : évaluation de la neutralisation croisée entre les vecteurs de ChAd155 et ChAd157

6.1 Test *in vivo* afin de déterminer si les vecteurs de ChAd155 et ChAd157 sont de sérotypes différents

On a évalué la neutralisation croisée entre les vecteurs ChAd155 et ChAd157 chez des souris BALB/c (6 par groupe). On a pré-immunisé les souris deux fois à la semaine 0 et à la semaine 3 avec 10^9 pv de ChAd155 et ChAd157 exprimant RG ou on leur a administré un leurre vaccinal composé de solution saline. Trois semaines plus tard, on a immunisé toutes les souris avec 10^9 pv de ChAd157 codant pour gag du VIH.

Groupes	n	Pré-immunisation 2 x s0 et s3	dose (pv)	Immunisation s6	dose (pv)
1	6	PBS	-	ChAd157-GAG	10^9
2	6	ChAd155-RG	10^9	ChAd157-GAG	10^9

3	6	ChAd157-RG	10 ⁹	ChAd157-GAG	10 ⁹
---	---	------------	-----------------	-------------	-----------------

On a mesuré les titres de neutralisation envers les vecteurs de pré-immunisation dans le sérum à la 5 semaine 5 (2 semaines après la seconde injection) par un dosage de neutralisation *in vitro* (figure 11). Finalement, on a testé la réponse des lymphocytes T contre gag sur les splénocytes 3 semaines après 10 l'immunisation par ELISpot anti-IFN γ , en utilisant un épitope des lymphocytes T CD8+ spécifiques de GAG cartographié chez les souris BALB/c (figure 12). Les doses de vecteurs utilisées pour la pré-immunisation ont été capables d'éliciter de bonnes activités de 15 neutralisation contre les deux vecteurs Ad, bien qu'avec une certaine variabilité. Les anticorps neutralisants anti-ChAd155 ne présentent pas de réaction croisée contre ChAd157 et inversement (figure 11). En outre, la réponse des lymphocytes T spécifiques de Gag à ChAd157 n'a pas été affectée par la pré-immunité anti-ChAd155, confirmant l'absence de 20 neutralisation croisée (figure 12).

Prises conjointement, ces données suggèrent que les virus ChAd155 et ChAd157 sont des adénovirus de sérotypes différents.

REVENDICATIONS

1. Polynucléotide isolé, dans lequel le polynucléotide code pour un polypeptide sélectionné dans 5 le groupe constitué de :

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, et

(b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel 10 le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

2. Polynucléotide recombinant comprenant un 15 polynucléotide sélectionné dans le groupe constitué de :

(a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, et

(b) un polynucléotide qui code pour un dérivé 20 fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

25 3. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide sélectionné dans le groupe constitué de :

(a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, et

30 (b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides

aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

5 4. Adénovirus recombinant comprenant au moins un polynucléotide ou un polypeptide sélectionné dans le groupe constitué de :

(a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1,

10 (b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1,

(c) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, et

20 (d) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

25 5. Composition comprenant au moins l'un de ce qui suit :

(a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1,

30 (b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente

une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1,

(c) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1,

5 (d) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 10 1,

(e) un vecteur selon la revendication 3, et

(f) un adénovirus recombinant selon la revendication 4,

et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

15 6. Cellule comprenant au moins l'un de ce qui suit :

(a) un polynucléotide qui code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1,

(b) un polynucléotide qui code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1,

20 (c) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1,

(d) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 30 1,

(e) un vecteur selon la revendication 3, et
(f) un adénovirus recombinant selon la revendication 4.

7. Polypeptide adénoviral isolé sélectionné dans le
5 groupe constitué de :

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, et

10 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

8. Polynucléotide, vecteur, adénovirus,
15 composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le polynucléotide code pour un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 99,8 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 1.

9. Polynucléotide, vecteur, adénovirus,
25 composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le polynucléotide code pour un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 1.

10. Polynucléotide, vecteur, adénovirus,
composition ou cellule selon la revendication 9, dans
30 lequel le polynucléotide a une séquence selon SEQ ID NO : 2.

11. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant en outre un polynucléotide codant pour :

5 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ;

ou

10 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 60 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3,

ou

15 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 ;

ou

20 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 60 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5.

25 12. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 11, comprenant en outre un polynucléotide codant pour :

(a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ;

ou

30 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3, dans lequel

le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 98 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3,

5 ou

 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 ;

 ou

10 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 98 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5.

15 13. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant en outre un polynucléotide codant pour :

20 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ;

 ou

25 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 98 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3,

 et

30 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 ;

 ou

(b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 98 % sur toute sa 5 longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5.

14. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 13, comprenant en outre un polynucléotide codant pour :

10 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3 ;

ou

15 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 3, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 98 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 3,

et

20 (a) un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5 ;

ou

25 (b) un dérivé fonctionnel d'un polypeptide ayant la séquence d'acides aminés selon SEQ ID NO : 5, dans lequel le dérivé fonctionnel a une séquence d'acides aminés qui présente une identité d'au moins 98 % sur toute sa longueur avec la séquence d'acides aminés de SEQ ID NO : 5.

15. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, 30 composition ou cellule selon l'une quelconque des

revendications 11 à 14, dans lequel le polynucléotide comprend une séquence selon SEQ ID NO : 4.

16. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des 5 revendications 11 à 15, dans lequel le polynucléotide comprend une séquence selon SEQ ID NO : 6.

17. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le polynucléotide 10 comprend au moins l'un de ce qui suit :

(a) une extrémité 5' adénovirale, de préférence une séquence répétée inversée terminale en 5' (ITR) adénovirale ;

15 (b) une région E1A adénovirale, ou un fragment de celle-ci sélectionné parmi les régions E1A_280R et E1A_243R ;

(c) une région E1B ou IX adénovirale, ou un fragment de celles-ci sélectionné dans le groupe constitué des régions E1B_19K, E1B_55K ou IX ;

20 (d) une région E2b adénovirale ; ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué des régions E2B_pTP, E2B_polymérase et E2B_IVa2 ;

25 (e) une région L1 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué des protéines L1_13.6k, L1_52K et L1_IIIa ;

30 (f) une région L2 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L2_penton selon la revendication 3, des protéines L2_pVII, L2_V, et L2_pX ;

5 (g) une région L3 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L3_pVI, de la protéine L3_hexon selon la revendication 2 et de L3_protéase ;

(h) une région E2A adénovirale ;

10 (i) une région L4 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L4_100k, de la protéine L4_33k et de la protéine L4_VIII ;

15 (j) une région E3 adénovirale, ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué de ORF1 d'E3, ORF2 d'E3, ORF3 d'E3, ORF4 d'E3, ORF5 d'E3, ORF6 d'E3, ORF7 d'E3, ORF8 d'E3, et ORF9 d'E3 ;

(k) une région L5 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour la protéine fibre L5_fibre selon la revendication 1 ;

20 (l) une région E4 adénovirale, ou un fragment de celle-ci sélectionné dans le groupe constitué de ORF7 d'E4, ORF6 d'E4, ORF4 d'E4, ORF3 d'E4, ORF2 d'E4, et ORF1 d'E4 ;

25 (m) une extrémité 3' adénovirale ; de préférence une séquence répétée inversée terminale en 3' (ITR) adénovirale ; et/ou

(n) une région d'ARN adénoviral VAI ou VAI, de préférence une région d'ARN adénoviral VAI ou VAI d'un adénovirus autre que ChAd157, de manière davantage préférée d'Ad5.

30 18. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 17, dans

lequel le polynucléotide comprend au moins l'un de ce qui suit :

- (a) une extrémité 5' adénovirale, de préférence une séquence répétée inversée terminale en 5' (ITR) 5 adénovirale ;
- (e) une région L1 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L1_13.6k, L1_52K et L1_IIIa ;
- 10 (f) une région L2 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L2_penton selon la revendication 3, des protéines L2_pVII, L2_V, et L2_pX ;
- 15 (g) une région L3 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L3_pVI, la protéine hexon L3_hexon selon la revendication 2 et L3_protéase ;
- 20 (i) une région L4 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour une protéine adénovirale sélectionnée dans le groupe constitué de la protéine L4_100k, de la protéine L4_33k et de la protéine L4_VIII ;
- 25 (k) une région L5 adénovirale, ou un fragment de celle-ci, ledit fragment codant pour la protéine fibre L5_fibre selon la revendication 1 ;
- (m) une extrémité 3'-adénovirale ; de préférence une séquence répétée inversée terminale en 3' 30 adénovirale.

19. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le polynucléotide comprend une région d'ARN adénoviral VAI ou VAII.

5 20. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 19, dans lequel la région d'ARN adénoviral VAI ou VAI provient d'un adénovirus autre que ChAd157.

10 21. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 20, dans lequel la région d'ARN VAI ou VAI provient d'Ad5.

15 22. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le polynucléotide comprend ou est constitué d'un polynucléotide qui présente une identité d'au moins 95 % sur toute sa longueur avec une séquence de référence qui est constituée essentiellement de SEQ ID NO : 15 ou 22.

20 23. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 22, dans lequel le polynucléotide comprend ou est constitué d'un polynucléotide qui présente une identité d'au moins 99 % sur toute sa longueur avec la séquence de référence.

25 24. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 23, dans lequel le polynucléotide comprend ou est constitué d'un polynucléotide qui présente une identité d'au moins 99,5 % sur toute sa longueur avec la séquence de référence.

30 25. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des

revendications 22 à 24, dans lequel le polynucléotide comprend ou est constitué d'un polynucléotide qui est identique sur toute sa longueur à la séquence de référence.

5 26. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 25, dans lequel la séquence de référence est SEQ ID NO : 15.

10 27. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 25, dans lequel la séquence de référence est SEQ ID NO : 22.

15 28. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le polynucléotide comprend une mutation ou une délétion qui rend non fonctionnel au moins un gène d'une région génomique sélectionnée dans le groupe constitué de E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4.

20 29. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 28, dans lequel le polynucléotide ne possède pas au moins un gène d'une région génomique sélectionnée dans le groupe constitué de E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et/ou E4.

25 30. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une ou l'autre de la revendication 28 ou 29, dans lequel les régions génomiques sont E1A et/ou E1B.

30 31. Polynucléotide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans lequel le polynucléotide comprend une délétion de la région génomique E1.

32. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 31, dans lequel l'adénovirus recombinant est compétent pour la réPLICATION.

5 33. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 32, dans lequel l'adénovirus recombinant est incompétent pour la réPLICATION.

10 34. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 33, dans lequel l'adénovirus recombinant comprend une séquence acide nucléique codant pour une protéine, dans lequel la séquence d'acide nucléique est fonctionnellement liée à une ou plusieurs séquences qui dirigent l'expression de ladite protéine dans une cellule hôte.

15 35. Adénovirus selon la revendication 34, dans lequel la protéine est une protéine antigénique ou un fragment de celle-ci.

36. Adénovirus selon la revendication 35, dans lequel la protéine et une protéine hétérologue ou un fragment de celle-ci.

20 37. Adénovirus selon la revendication 36, dans lequel la protéine est dérivée d'un virus.

25 38. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications 34 à 37, dans lequel les unes ou plusieurs séquences qui dirigent l'expression dudit produit dans une cellule hôte incluent une séquence sélectionnée parmi une ou plusieurs du groupe constitué des : séquences d'initiation de la transcription, de terminaison de la transcription, promoteur et amplificateur.

30 39. Adénovirus selon la revendication 38, dans lequel les une ou plusieurs séquences qui dirigent

l'expression dudit produit dans une cellule hôte comprennent une séquence promoteur.

40. Adénovirus selon la revendication 39, dans lequel la séquence promoteur est sélectionnée dans le 5 groupe constitué d'un promoteur interne, d'un promoteur natif, du promoteur des LTR du VRS, du promoteur du CMV, du promoteur du SV40, du promoteur de la dihydrofolate réductase, du promoteur de la β -actine, du promoteur PGK, du promoteur EF1a et du promoteur CASI.

10 41. Adénovirus selon la revendication 39, dans lequel la séquence promoteur est un promoteur du hCMV amplifié, tel que proposé dans SEQ ID NO : 42.

15 42. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 41, dans lequel l'adénovirus a une séroprévalence inférieure à 10 % chez les sujets humains et de préférence pas de séroprévalence chez les sujets humains.

20 43. Adénovirus selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 42, dans lequel l'adénovirus est capable d'infecter une cellule de mammifère.

44. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 et 8 à 43, comprenant un adjuvant sélectionné parmi la liste constituée : des adjuvants inorganiques (par exemple, des sels de métaux inorganiques tels que le phosphate d'aluminium ou l'hydroxyde d'aluminium), des adjuvants organiques (par exemple, les saponines, telles que QS21, ou le squalène), des adjuvants à base d'huile (par exemple, l'adjuvant complet de Freund et l'adjuvant incomplet de Freund), 25 les cytokines (par exemple, IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CFS, et IFN- γ) des adjuvants particulaires 30

(par exemple, des complexes de stimulation immunitaire (ISCOMS), des liposomes, ou des microsphères biodégradables), des virosomes, des adjuvants bactériens (par exemple, le monophosphoryl lipide A, par exemple le 5 monophosphoryl lipide A 3-dé-O-acylé (3D-MPL), ou les muramyl peptides), des adjuvants synthétiques (par exemple, des copolymères séquencés non ioniques, des analogues du muramyl peptide, ou le lipide A synthétique), des adjuvants de polynucléotides synthétiques (par 10 exemple la polyarginine ou la polylysine) et des oligonucléotides de stimulation immunitaire contenant des dinucléotides CpG non méthylés (« CpG »).

45. Composition selon la revendication 44, dans laquelle l'adjuvant est un 3D-MPL et/ou QS21

15 46. Cellule selon l'une quelconque des revendications 6 et 8 à 31, dans laquelle la cellule est une cellule hôte qui exprime au moins un gène adénoviral sélectionné dans le groupe constitué de E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, L1, L2, L3, L4 et L5.

20 47. Cellule selon la revendication 45, dans laquelle la cellule hôte est cultivée en suspension.

48. Polynucléotide polypeptide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 47, pour son 25 utilisation en tant que médicament.

49. Polynucléotide polypeptide, vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon la revendication 48, pour son utilisation en tant que vaccin.

50. Utilisation du polynucléotide, polypeptide, 30 vecteur, adénovirus, composition ou cellule selon l'une

quelconque des revendications 1 à 47 pour le traitement ou la prophylaxie d'une maladie.

5 51. Procédé d'induction d'une réponse immunitaire chez un sujet, comprenant l'administration du polynucléotide, du polypeptide, du vecteur, de l'adénovirus, de la composition ou de la cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 47 au sujet.

52. Polynucléotide isolé comprenant ou constitué d'une séquence selon SEQ ID NO : 2.

10 53. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43, codant pour un transgène pour l'administration à un sujet qui a été préalablement exposé à un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé 15 fonctionnel de celle-ci, tel que ceci est décrit dans le présent document.

20 54. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 53, dans lequel le sujet a été préalablement exposé à un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155.

55. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 54, dans lequel le sujet a été préalablement exposé à un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton de ChAd155.

25 56. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 54 ou 55, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 code pour un transgène destiné à une indication ou des indications médicales différentes du 30 vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un transgène.

57. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 54 ou 55, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 code pour un transgène destiné à la 5 même ou aux mêmes indications médicales que le vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un transgène.

58. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 54 ou 55, dans lequel le vecteur adénoviral 10 recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 code pour le même transgène que le vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un transgène.

59. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une 15 quelconque des revendications 53 à 58, dans lequel les transgènes codent pour un immunogène qui est utile pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel que des bactéries, des champignons, des microorganismes parasitaires ou des parasites 20 multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale.

60. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43, codant pour 25 un transgène pour l'administration à un sujet qui peut ensuite être exposé à un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou le dérivé fonctionnel de celle-ci, tel que ceci est décrit dans le présent document.

30 61. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 60, dans lequel le sujet peut ensuite être

exposé à un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155.

5 62. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 61, dans lequel le sujet peut ensuite être exposé à un vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et un penton de ChAd155.

10 63. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 61 ou 62, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 code pour un transgène destiné à une indication ou des indications médicales différentes du vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un transgène.

15 64. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 61 ou 62, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 code pour un transgène destiné à la même indication ou aux mêmes indications médicales que le vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un transgène.

20 65. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 61 ou 62, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant comprenant une fibre, un hexon et/ou un penton de ChAd155 code pour le même transgène que le vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un transgène.

25 66. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 60 à 65, dans lequel les transgènes codent pour un immunogène qui est utile pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel que des bactéries, des champignons, des

microorganismes parasites ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale.

5 67. Procédé destiné à éliciter une réponse immunitaire chez un sujet, ledit procédé comprenant :

(a) l'administration au sujet d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un premier 10 transgène ; et

(b) l'administration au sujet d'un vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, le vecteur codant pour un second transgène ;

15 dans lequel les étapes (a) et (b) peuvent être entreprises dans l'un ou l'autre ordre et les premier et second transgènes peuvent être identiques ou différents.

68. Procédé de prophylaxie ou de traitement d'un sujet, ledit procédé comprenant :

(a) l'administration au sujet d'un vecteur 20 adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 et 8 à 43 codant pour un premier transgène codant pour un immunogène qui est utile pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel qu'une bactérie, des champignons, des 25 microorganismes parasites ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale ; et

(b) l'administration au sujet d'un vecteur 30 adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci comme

décrit dans le présent document, le vecteur codant pour un second transgène codant pour un immunogène qui est utile pour immuniser un être humain ou un animal non humain contre un pathogène tel que des bactéries, des 5 champignons, des microorganismes parasitaires ou des parasites multicellulaires qui infectent les vertébrés humains et non humains, ou contre une cellule cancéreuse ou une cellule tumorale ;

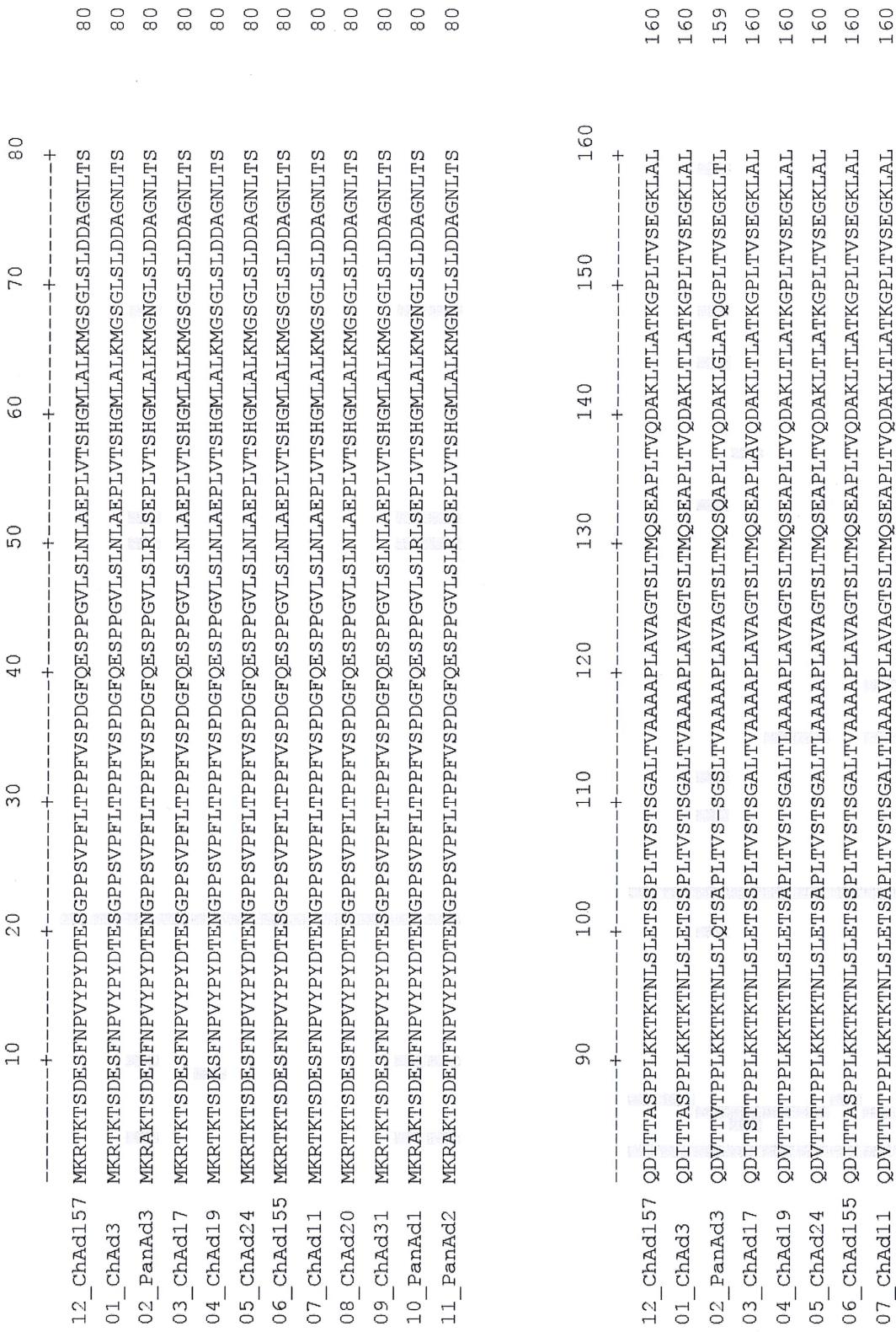
10 dans lequel les étapes (a) et (b) peuvent être entreprises dans l'un ou l'autre ordre.

69. Vecteur adénoviral recombinant ou procédé selon l'une quelconque des revendications 53 à 68, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157, ou de dérivé fonctionnel de celle-ci 15 tel que décrit dans le présent document présente une faible réactivité croisée avec le vecteur adénoviral recombinant selon l'une quelconque des revendications 4 ou 8 à 43.

70. Vecteur adénoviral recombinant ou procédé selon 20 la revendication 69, dans lequel l'immunisation avec un premier vecteur élicite un titre de neutralisation qui est en moyenne inférieur à 50 % du niveau provoqué par l'immunisation avec le second vecteur.

71. Vecteur adénoviral recombinant ou procédé selon 25 l'une quelconque des revendications 53 à 70, dans lequel le vecteur adénoviral recombinant qui ne comprend pas de fibre de ChAd157 ne comprend pas de fibre de ChAd157, d'hexon de ChAd157 ou de fibre de ChAd157 ou de dérivés fonctionnels de ceux-ci ayant une identité d'au moins 30 98 % avec celle-ci.

Figure 1A



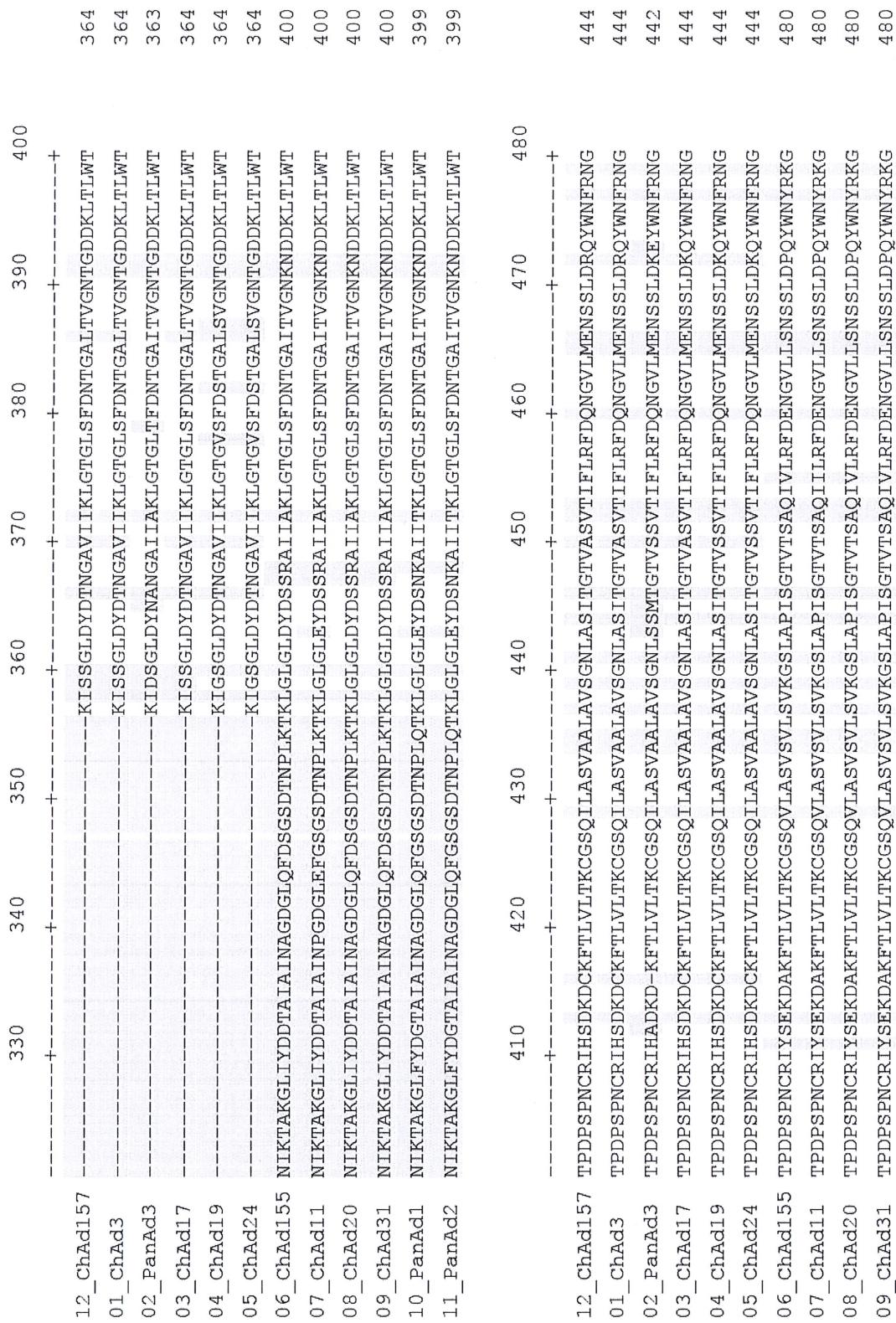
08_ChAd20 QDITTAASBPLKKTKTNNLSLETSSPLTVSTSSPLTVAAAPLAVAGTSLTMQSEAPLTVQDAKLTTLATKGPLTVSEGKLAL
09_ChAd31 QDITTAASBPLKKTKTNNLSLETSSPLTVSTSSPLTVAAAPLAVAGTSLTMQSEAPLTVQDAKLTTLATKGPLTVSEGKLAL
10_PanAd1 QDVTTTVTPPLKKTKTNNLSLQTSAPLTVS-SGSITVAAAPLAVAGTSLTMQSQAPLTVQDAKLGATQGPLTVSEGKLTL
11_PanAd2 QDVTTTVTPPLKKTKTNNLSLQTSAPLTVS-SGSITVAAAPLAVAGTSLTMQSQAPLTVQDAKLGATQGPLTVSEGKLTL

Figure 1B

170	180	190	200	210	220	230	240
12 _ ChAdd3	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPINVSSGSLIGLDMEDPMPYTHNGKLGIRIGGPLRVRVDSLHLTIVVTFNGNLTVDNNNALQTKV	240					
01 _ ChAdd3	QTSAPLITAADSSTLTIVGTTPISVSSGSLIGLDMEDPMPYTHDGKLGIRIGGPLRVRVDSLHLTIVVTFNGNITVANNALQTKV	240					
02 _ PanAdd3	QTSAPLITAADSSTLTIVSSTPPISVSSGSLIGLDMEDPMPYTHDGKLGIRIGGPLRVRVDSLHLTIVVTFNGNITVANNALQTKV	239					
03 _ ChAdd17	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPINVSSGSLIGLDMEDPMPYTHDGKLGIRIGGPLRVRVDSLHLTIVVTFNGNITVANNALQTKV	240					
04 _ ChAdd19	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPINVSSGSLIGLDMEDPMPYTHDGKLGIRIGGPLRVRVDSLHLTIVVTFNGNITVANNALQTKV	240					
05 _ ChAdd24	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPINVSSGSLIGLDMENPMPYTHDGRLGIRIGGPLRVRVDSLHLTIVVTFNGNITVANNALQTKV	240					
06 _ ChAdd55	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPPLSTSNGSLIGLDMQAPIYTTINGKLGLNFGAPLHVVDSLNLATVVTGQGLITTINGTALQTKV	240					
07 _ ChAdd11	QTSAPLITAADSSTLTISATPPPLSTSNGSLIGLDMQAPIYTTINGKLGLNFGAPLHVVDSLNLATVVTGQGLITTINGTALQTKV	240					
08 _ ChAdd20	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPPLSTSNGSLIGLDMQAPIYTTINGKLGLNFGAPLHVVDSLNLATVVTGQGLITTINGTALQTKV	240					
09 _ ChAdd31	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPPLSTSNGSLIGLDMQAPIYTTINGKLGLNFGAPLHVVDSLNLATVVTGQGLITTINGTALQTKV	240					
10 _ PanAdd1	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPPLSTSNGSLISIDMQAPIYTTINGKLALNIGAPLHVVDTLNALATVVTGQGLITTINGRALQTKV	239					
11 _ PanAdd2	QTSAPLITAADSSTLTIVSATPPPLSTSNGSLISIDMQAPIYTTINGKLALNIGAPLHVVDTLNALATVVTGQGLITTINGRALQTKV	239					
		250	260	270	280	290	300
						310	320
12 _ ChAdd157	TGALGYDTSGNQLQRAAGGMRIDANGQLILNVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLYINTDHNLCNRGLITTTTNNNTKKLET	320					
01 _ ChAdd3	TGALGYDTSGNQLQRAAGGMRIDANGQLILNVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLYINTDHNLCNRGLITTTTNNNTKKLET	320					
02 _ PanAdd3	AGALGYDSSGNLLELRAAGGMRINTGGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLYVNTNHNLDLNCNRGLITTTTSSNTKKLET	319					
03 _ ChAdd17	TGALGYDTSGNQLQRAAGGMRIDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLYVNTDHNLDLNCNRGLITTTTNNNTKKLET	320					
04 _ ChAdd19	TGALGYDTSGNQLQRAAGGMRIDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLYVNTDHNLDLNCNRGLITTTTNNNTKKLET	320					
05 _ ChAdd24	TGALGYDTSGNQLQRAAGGMRIDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLYVNTDHNLDLNCNRGLITTTTNNNTKKLET	320					
06 _ ChAdd55	SGALNYDTSGNQLLELRAAGGMRVDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLFVNSAHNLDVNYNRGLYLTSGNTKKLEV	320					
07 _ ChAdd11	SGALNYDTSGNQLLELRAAGGMRVDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLFVNSAHNLDVNYNRGLYLTSGNTKKLEV	320					
08 _ ChAdd20	SGALNYDTSGNQLLELRAAGGMRVDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLFVNSAHNLDVNYNRGLYLTSGNTKKLEV	320					
09 _ ChAdd31	SGALNYDTSGNQLLELRAAGGMRVDANGQLILDVAYAYPFDAQNNLNSLRLGGQGPLFVNSAHNLDVNYNRGLYLTSGNTKKLEV	320					

10_PanAd1 TGALSYDTEGNIQLQAGGGMRIDNNNGQLIINVAAPFDAQNNLSSLRLGQGPLIVNSAHLNLDLNLRGLYLFTSGNTKKLEV
319
11_PanAd2 TGALSYDTEGNIQLQAGGGMRIDNNNGQLIINVAAPFDAQNNLSSLRLGQGPLIVNSAHLNLDLNLRGLYLFTSGNTKKLEV
319

Figure 1C



10_PanAd1 TPDPSPNCRINSEKDAKILTVLTKCGSQVILASVSVLSVKGSЛАPISGTVTSAQIVLRFDENGVILLSSLDPQYWNYRKG 479
11_PanAd2 TPDPSPNCRINSEKDAKILTVLTKCGSQVILASVSVLSVKGSЛАPISGTVTSAQIVLRFDENGVILLSSLDPQYWNYRKG 479

Figure 1D

490	500	510	520	530	540	550	560
12_ChAd157	NSTNAAPYTNAGFMPNLAAYPKTQSQTAKNNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNESETSQVSHYSMSFTWAWESGQ						
01_ChAd3	NSTNAAPYTNAGFMPNLAAYPKTQSQTAKNNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNESETSQVSHYSMSFTWAWESGQ	524					
02_PanAd3	NSTNATPYTNAGFMPNLSAYPKTQSQTAKNNIVSEVYLHGDKSKPMTLTITLNGTNESETSQVSHYSMSFTWSDSGK	524					
03_ChAd17	NSTNAAPYTNAGFMPNLAAYPKTQSQTAKNNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNESETSQVSHYSMSFTWAWESGQ	522					
04_ChAd19	NSTNATPYTNAGFMPNLAAYPKTQSQTAKNNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNESETSQVSHYSMSFTWAWESGQ	524					
05_ChAd24	NSTNATPYTNAGFMPNLAAYPKTQSQTAKNNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNESETSQVSHYSMSFTWAWESGQ	524					
06.ChAd155	DLTEGTAYTNAGFMPNLTAYPKTQSQTAKSNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNETG-DATVSTYSMSFSWNWNGSN	559					
07_ChAd11	DLTEGTAYTNAGFMPNLTAYPKTQSQTAKSNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNETG-DATVSTYSMSFSWNWNGSN	559					
08_ChAd20	DLTEGTAYTNAGFMPNLTAYPKTQSQTAKSNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNETG-DATVSTYSMSFSWNWNGSN	559					
09_ChAd31	DLTEGTAYTNAGFMPNLTAYPKTQSQTAKSNIVSQVYILINGDKSKPMTLTITLNGTNETG-DATVSTYSMSFSWNWNGSN	559					
10_PanAd1	DSTEGETAYTNAGFMPNLTAYPKTQSQTAKSNIVSQVYILINGDKTPKMTLTITLNGTNETG-DATVSTYSMSFSWNWNGSN	558					
11_PanAd2	DSTEGETAYTNAGFMPNLTAYPKTQSQTAKSNIVSQVYILINGDKTPKMTLTITLNGTNETG-DATVSTYSMSFSWNWNGSN	558					
			570				
12_ChAd157	YATETFATNSFTFSYIAEQ						
01_ChAd3	YATETFATNSFTFSYIAEQ	543					
02_PanAd3	YATETFATNSFTFSYIAEQ	543					
03_ChAd17	YATETFATNSFTFSYIAEQ	541					
04_ChAd19	YATETFATNSFTFSYIAEQ	543					
05_ChAd24	YATETFATNSFTFSYIAEQ	543					
06.ChAd155	YINETFQTNNSFTFSYIAQE	578					
07_ChAd11	YINETFQTNNSFTFSYIAQE	578					
08_ChAd20	YINETFQTNNSFTFSYIAQE	578					
09_ChAd31	YINETFQTNNSFTFSYIAQE	578					

577
577

10_PanAd1 YINDTFQQTNSFTFSYIAQE
11_PanAd2 YINDTFQQTNSFTFSYIAQE

Figure 2

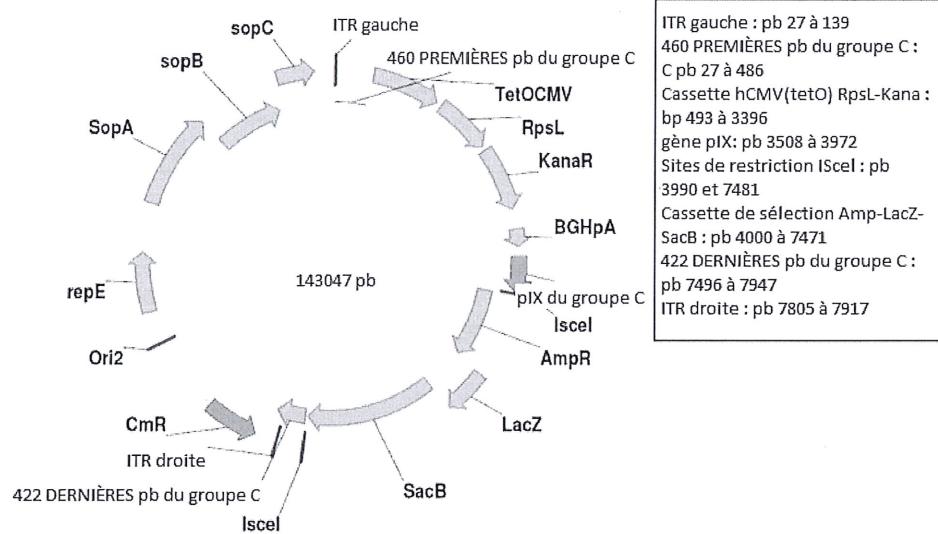


Figure 3

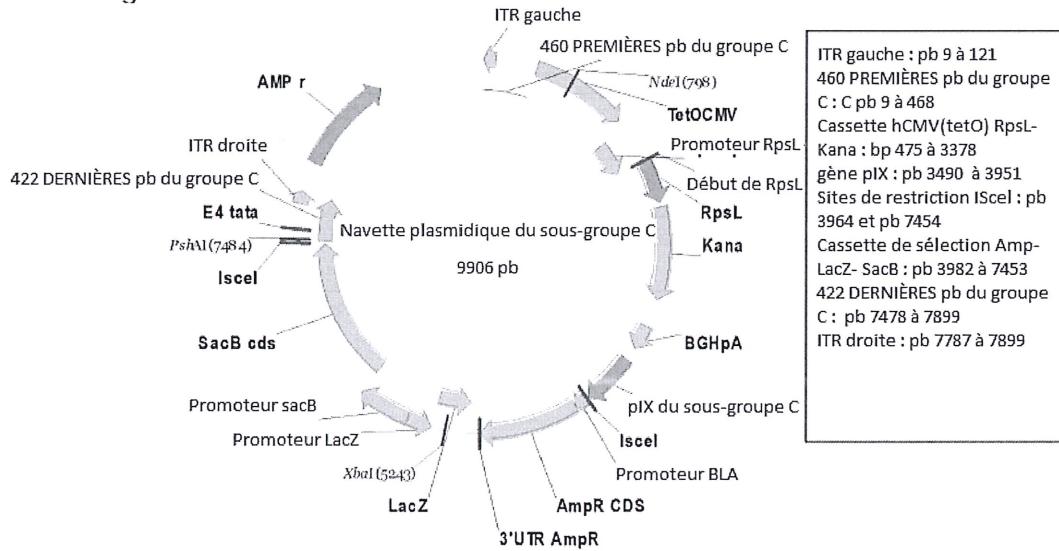
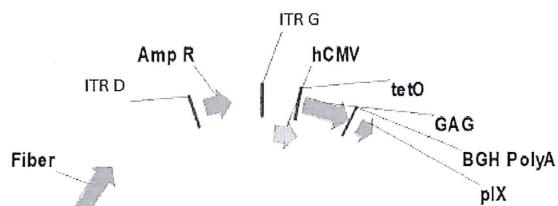


Figure 4



pChAd157DE1/TetOhCMV GAG (#1557)
39240 pb



Figure 5

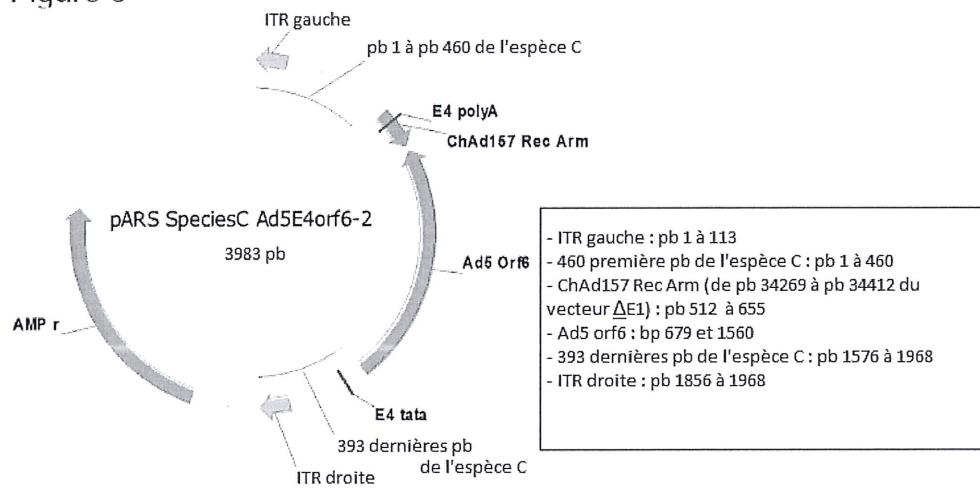


Figure 6

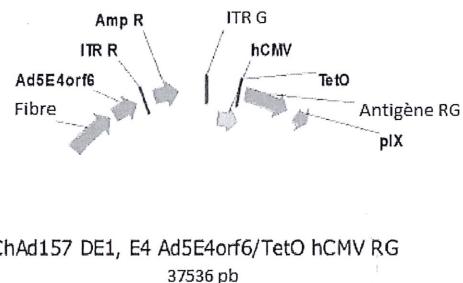


Figure 7

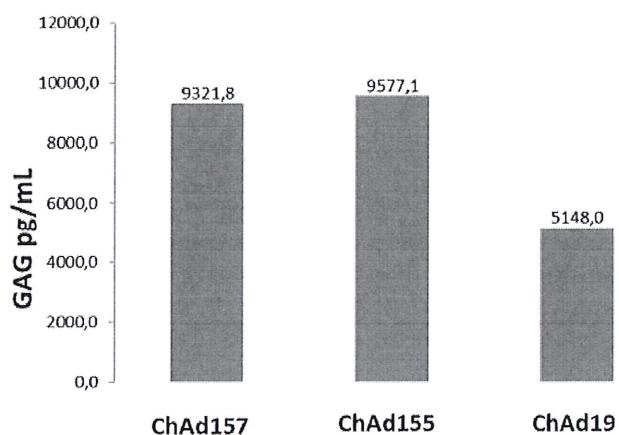


Figure 8

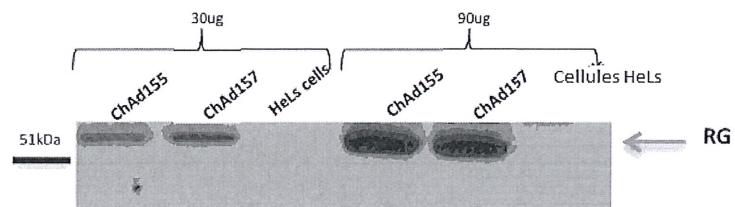


Figure 9

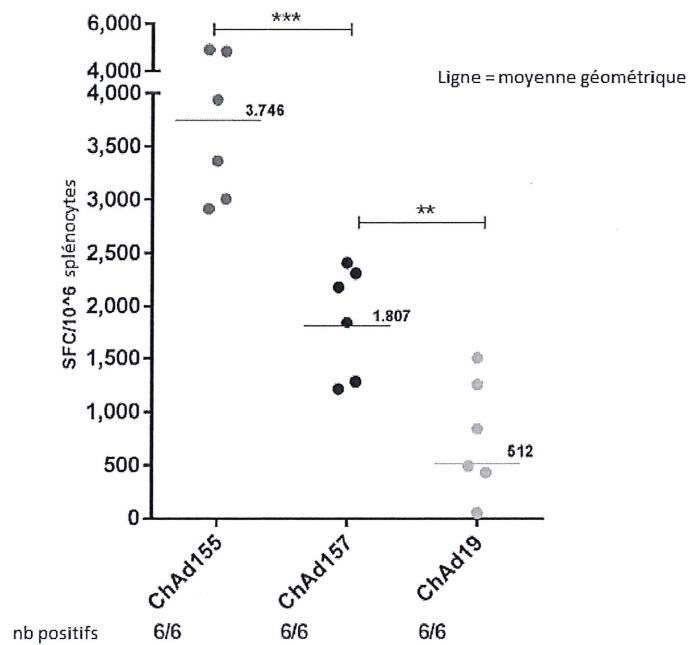


Figure 10

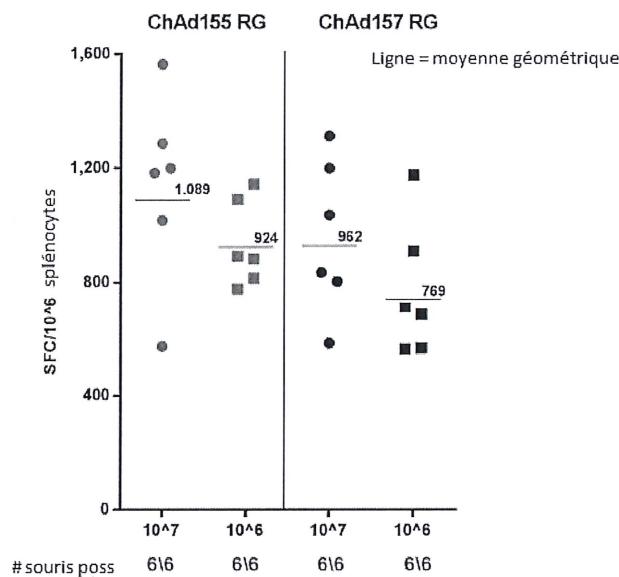


Figure 11

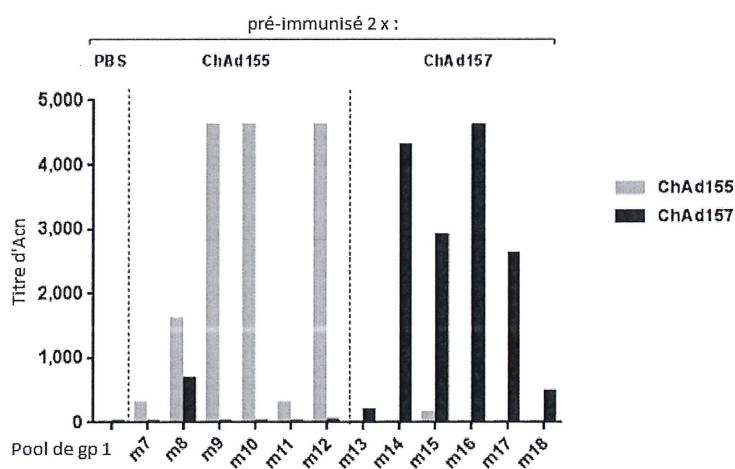
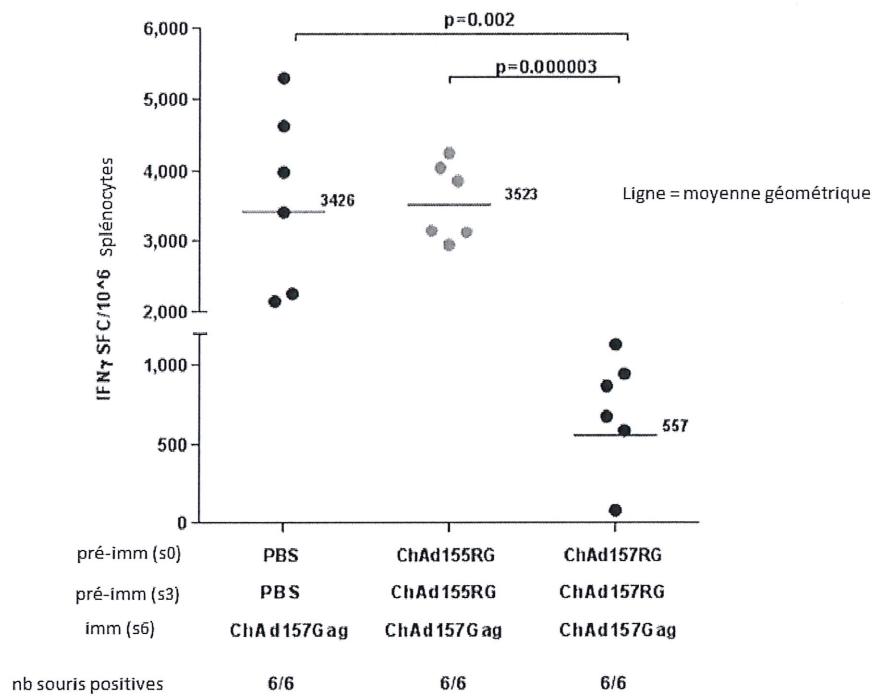


Figure 12





RAPPORT DE RECHERCHE
établi en vertu de l'article XI.23., §2 et §3
du Code de droit économique belge

BO 11604
BE 201705910

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	WO 2005/071093 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CIRILLO AGOSTINO [IT]; COLLOCA STE) 4 août 2005 (2005-08-04) * abrégé * * page 4, ligne 3 - ligne 12 * * page 4, ligne 31 - page 5, ligne 5 * * page 6, ligne 12 - ligne 35 * * exemple 2 * * séquences 14, 15, 42, 56, 57, 83 * -----	1-71	INV. C07K14/075 C12N15/861 A61K39/12 A61K39/235
A,D,P	WO 2016/198621 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 15 décembre 2016 (2016-12-15) * le document en entier * -----	1-71	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
			A61K C07K C12N
1	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
	23 mars 2018	Chavanne, Franz	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		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	

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

BO 11604
BE 201705910

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.

23-03-2018

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 2005071093	A2	04-08-2005	AT	449105 T		15-12-2009
			AU	2005206292 A1		04-08-2005
			AU	2011247884 A1		01-12-2011
			CA	2553541 A1		04-08-2005
			CA	2880060 A1		04-08-2005
			CA	2880061 A1		04-08-2005
			CN	101014613 A		08-08-2007
			CN	102719478 A		10-10-2012
			CN	107723298 A		23-02-2018
			CY	1109841 T1		10-09-2014
			CY	1119285 T1		14-02-2018
			DK	1711518 T3		06-04-2010
			DK	2163260 T3		19-06-2017
			EP	1711518 A2		18-10-2006
			EP	2163260 A2		17-03-2010
			EP	3269390 A2		17-01-2018
			ES	2337374 T3		23-04-2010
			ES	2627288 T3		27-07-2017
			HU	E033576 T2		28-12-2017
			JP	4814800 B2		16-11-2011
			JP	5427874 B2		26-02-2014
			JP	5753377 B2		22-07-2015
			JP	2007518414 A		12-07-2007
			JP	2011120588 A		23-06-2011
			JP	2012110326 A		14-06-2012
			JP	2014158467 A		04-09-2014
			LT	2163260 T		26-06-2017
			PL	2163260 T3		29-12-2017
			PT	1711518 E		26-02-2010
			PT	2163260 T		08-06-2017
			SI	1711518 T1		30-04-2010
			US	2011217332 A1		08-09-2011
			US	2012328651 A1		27-12-2012
			WO	2005071093 A2		04-08-2005
<hr/>						
WO 2016198621	A1	15-12-2016	AU	2016275601 A1		18-01-2018
			AU	2016275619 A1		04-01-2018
			BE	1024420 A1		12-02-2018
			CA	2988481 A1		15-12-2016
			CA	2988654 A1		15-12-2016
			EP	3307313 A1		18-04-2018
			EP	3307314 A1		18-04-2018
			KR	20180011265 A		31-01-2018
			KR	20180012857 A		06-02-2018
			WO	2016198599 A1		15-12-2016
			WO	2016198621 A1		15-12-2016

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

BO 11604
BE 201705910

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.

23-03-2018

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
<hr/>			



OPINION ÉCRITE

Dossier N° BO11604	Date du dépôt(jour/mois/année) 07.12.2017	Date de priorité (jour/mois/année) 09.12.2016	Demande n° BE201705910
Classification internationale des brevets (CIB) INV. C07K14/075 C12N15/861 A61K39/12 A61K39/235			
Déposant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA			

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

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

	Examinateur Chavanne, Franz
--	--------------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201705910

Cadre n° I Base de l'opinion

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

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

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	1-71
	Non : Revendications	
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-71
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-71
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VI Certains documents cités

Certains documents publiés
voir le rapport de recherche

Divulgations non écrites

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

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

1 Il est fait référence aux documents suivants :

D1 WO 2005/071093 A2 (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CIRILLO AGOSTINO [IT]; COLLOCA STE) 4 août 2005 (2005-08-04)

D2 WO 2016/198621 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE]) 15 décembre 2016 (2016-12-15)

2 L'état de la technique ne décrit aucun polypeptide ayant une séquence identique d'au moins 98% à la séquence de SEQ ID No.1 de la présente demande. L'état de la technique ne décrit pas non plus la séquence nucléotidique de SEQ ID No.2 de la présente demande.

L'objet revendiqué est donc nouveau.

3 L'état de la technique le plus proche pour évaluer l'inventivité de la présente demande est D1.

D1 décrit des adénovirus de chimpanzé et leurs utilisations comme vecteurs adénoviraux pour le transport et l'expression de transgènes. D1 décrit la protéine de fibre de ChAd3, 17 et 19, et la séquence la codant. Ces séquences présentent un très haut degré d'identité avec les séquences de SEQ ID No.1 et 2 de la présente demande. La protéine de fibre de ChAd de SEQ ID No.83 ou 56 présente 99,6% ou 98%, respectivement, d'identité avec SEQ ID No.1. Le gène correspondant de SEQ ID No. 42 ou 14 présente 99,5% ou 97,7%, respectivement, avec SEQ ID No.2 (Abrégé; Pages 4-6; Exemple 2; Séquences 14, 15, 56, 57, 83).

L'objet revendiqué diffère de D1 en ce que le polynucléotide codant pour la protéine de fibre est issue d'un adénovirus de chimpanzé différent.

Le problème à résoudre par la présente demande est donc la provision d'une séquence codant pour une protéine de fibre d'un autre adénovirus de chimpanzé.

La solution proposée par la présente demande est le polynucléotide codant pour la protéine de fibre de SEQ ID No.1.

L'Homme du métier, confronté au problème de proposer une autre séquence codant pour une protéine de fibre d'adénovirus de chimpanzé, n'aurait besoin de mettre en place aucune activité inventive pour isoler et caractériser la séquence codant pour un protéine de fibre d'un autre adénovirus de chimpanzé. Au vu du très haut degré d'identité entre la séquence de SEQ D No.1 de la présente demande et les séquences de SEQ ID No. 14 et 42 de D1, l'Homme du métier, en mettant en oeuvre des méthodes basiques et routinières arriverait automatiquement et directement à l'objet revendiqué sans nécessiter d'activité inventive. Cet objet n'est donc pas inventif.

4 **Ad point VI**

Certains documents cités

1 Certains documents publiés
WO 2016/198621

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

1 Les revendications 1-8 et 11-14 ne sont pas claires. L'expression "dérivé fonctionnel" employée dans ces revendications est vague et imprécise, et laisse subsister un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle elle se rapporte, au point que l'objet de ladite revendication n'est pas clairement défini.