



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

1022174 B1

Date de délivrance : 24/02/2016

BREVET D'INVENTION

Date de priorité : 15/03/2013

Classification internationale : A61K 39/125, C07K 7/08, C07K 14/095

Numéro de dépôt : 2014/0161

Date de dépôt : 13/03/2014

Titulaire :

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
1330, RIXENSART
Belgique

Inventeur :

Baudoux Guy
1330 Rixensart
Belgique

Boxus Mathieu
1330 Rixensart
Belgique

Colau Brigitte
1330 Rixensart
Belgique

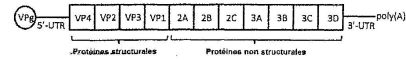
Marchand Martine
1330 Rixensart
Belgique

VACCIN

La présente description concerne des compositions immunogènes comprenant des peptides de picornavirus humains dérivés de protéines structurales du virus, des constructions comprenant les peptides, les peptides eux-mêmes et leur utilisation dans la prévention d'une infection et d'une maladie à picornavirus. Les peptides de VP4 et VP1 particuliers sont décrits.

BE 2014/0161

Figure 1



Protéines	Fonctions
5 VPg	Petite protéine virale.
VP1-VP4	Protéines de capside.
2A	Protéase, blocage de la protéine hôte, stimulation de l'initiation d'une synthèse d'ARN à brin négatif
10 2B	Perméabilité de la membrane, impliquée dans le début de la synthèse de l'ARN viral, inhibition de la sécrétion de protéine du système de Golgi.
2C	Formation de vésicule, direction des complexes de réplication aux membranes cellulaires, entraînant le désassemblage du système de Golgi et du réticulum endoplasmique, NTPase.
15 2BC	Liaison de l'ARN, formation de vésicule, perméabilité de la membrane (fusion 2B-2C).
3A	Inhibition du transport intracellulaire
3B	VPg, amorce de protéine pour la synthèse de l'ARN viral.
3AB	VPg d'ancrage dans les membranes pour l'étape d'amorçage de la synthèse de l'ARN, interaction de l'association membranaire de 3D et 3CD des complexes de réplication (fusion 3A-3B).
20 3C	Protéase, inhibe la transcription de l'hôte
3D	ARN polymérase dépendante de l'ARN, uridylation de VPg
3CD	Traitement de la protéine virale (fusion 3C-3D).

VACCINArrière-plan de l'invention

La présente description concerne le domaine des vaccins humains. Plus particulièrement, la présente description concerne des compositions pharmaceutiques et immunogènes pour la prévention ou le traitement
5 d'une infection ou d'une maladie à picornavirus humain, en particulier d'une infection ou d'une maladie à rhinovirus humain (HRV).

Les picornaviridés sont l'une des plus grandes familles virales qui est constituée de 14 genres dont
10 six comprennent des agents pathogènes humains. Les picornavirus bien connus sont les entérovirus (comprenant les polio- et rhinovirus), le virus de la fièvre aphteuse (FMDV) et le virus de l'hépatite A (HAV). D'autres membres de la famille des
15 picornaviridés sont les coxsackievirus, les échovirus, les paréchovirus humains et le virus Aichi. Les picornaviridés entraînent des maladies telles que le rhume commun, la gastroentérite, l'hépatite, la pneumonie, la poliomyélite, la méningite, la fièvre
20 aphteuse. Bien que les infections soient souvent

bénignes, certaines souches peuvent provoquer des flambées pandémiques s'accompagnant d'une méningite et/ou d'une paralysie.

Les rhinovirus sont la principale cause des
5 infections aiguës des voies respiratoires hautes chez l'être humain, connues sous le nom de rhume commun. Ils sont également la cause virale la plus fréquente de sévères exacerbations de maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme et la broncho-
10 pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Actuellement, il existe plus de 100 sérotypes de HRV. La protection croisée entre ces sérotypes est faible voire nulle en raison de l'existence d'épitopes neutralisants immunodominants de type spécifique et aucun vaccin n'a
15 été développé à ce jour. Un vaccin contre le rhinovirus qui devrait être capable de protéger contre de multiples sérotypes représente donc un large besoin médical qu'il reste à combler.

20 Bref résumé

La présente description concerne des vaccins contre des picornavirus humains qui contiennent des antigènes conférant une protection contre différents picornavirus, provenant soit de différents sérotypes ou
25 souches du même picornavirus, soit de différents membres de la famille des picornavirus. Des modes de réalisation spécifiques concernent des vaccins contre des entérovirus humains, en particulier des rhinovirus, contenant des antigènes qui confèrent une protection
30 contre différents sérotypes d'entérovirus ou HRV. Les vaccins contiennent des peptides de picornavirus de

régions conservées des protéines structurales de picornavirus, qui génèrent une réponse par une réaction croisée ou une neutralisation croisée permettant de conférer une protection croisée contre une série de
5 picornavirus, par exemple contre une série de HRV de sérotypes différents.

L'invention propose une composition immunogène comprenant un premier et un deuxième peptide dérivés d'une protéine structurale d'un picornavirus, lesdits
10 peptides étant chacun capables d'induire une réponse immunitaire par une neutralisation croisée contre deux picornavirus ou plus, et un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Certains nouveaux peptides de picornavirus et de
15 rhinovirus de VP4 et VP1 sont également proposés ici.

Dans un autre aspect, l'invention propose un peptide de picornavirus consistant 20 acides aminés au plus depuis la terminaison N de VP4, ledit peptide comprenant les acides aminés 1 à 16 de VP4 ou une
20 variante des acides aminés 1 à 16 ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés à l'une ou l'autre extrémité.

Dans un autre aspect, l'invention propose un peptide de picornavirus consistant en 40 acides aminés
25 au plus depuis la région terminale N de VP1, ledit peptide comprenant les acides aminés 32 à 45 ou une variante des acides aminés 32 à 45 ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés à l'une ou l'autre extrémité.

30 Dans un autre aspect, l'invention propose une particule de polypeptide chimérique comprenant un

polypeptide de squelette capable de former une particule et au moins un peptide comprenant un épitope d'un polypeptide structural de picornavirus.

5 Dans un autre aspect, l'invention propose une composition immunogène comprenant un peptide ou une particule de polypeptide chimérique de l'invention, associé à un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 Dans un autre aspect, l'invention propose l'utilisation d'une composition immunogène décrite ici dans la prévention ou le traitement d'une infection à picornavirus telle qu'une infection à HRV.

15 L'invention propose en outre l'utilisation d'une composition immunogène décrite dans ce document dans la production d'un médicament pour la prévention ou le traitement d'une infection à picornavirus telle qu'une infection à HRV.

20 Dans un autre aspect, l'invention propose un procédé pour induire des anticorps neutralisants contre un picornavirus tel que HRV chez l'être humain, comprenant l'administration à un être humain d'une composition immunogène telle que décrite dans ce document.

25 Dans un autre aspect, l'invention propose un procédé d'induction d'anticorps entraînant une neutralisation croisée contre des picornavirus tels que HRV chez l'être humain, comprenant l'administration à un être humain d'une composition immunogène décrite dans ce document.

30 Dans un autre aspect, l'invention propose un procédé de prévention d'une infection à picornavirus ou

d'une maladie à picornavirus associée à une infection à picornavirus, telle qu'une infection à HRV ou une maladie à HRV associée à une infection à HRV, ledit procédé comprenant l'administration à un être humain
5 d'une composition immunogène telle que décrite dans ce document.

Dans un autre aspect, l'invention propose un procédé de préparation d'une composition immunogène, ledit procédé comprenant la combinaison de (i) deux ou
10 plusieurs peptides de picornavirus de protéines structurales de picornavirus, lesdits peptides étant respectivement capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus, et
15 (ii) d'un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans un autre aspect, l'invention propose un procédé de préparation d'une composition immunogène, ledit procédé comprenant la combinaison (i) d'une
20 particule de polypeptide chimérique comprenant un ou plusieurs peptides de picornavirus dérivés de protéines structurales de picornavirus ; et (ii) d'un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25 Brève description des dessins

La figure 1 présente un diagramme schématique du génome du picornavirus.

La figure 2 présente des anticorps spécifiques d'un peptide générés chez des lapins immunisés par des
30 peptides VP1 conjugués à KLH.

La figure 3 présente des anticorps spécifiques d'un peptide générés chez des lapins immunisés avec des peptides VP4, conjugués à KLH ou dans des constructions chimériques d'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg).

La figure 4 présente des anticorps spécifiques d'un peptide générés chez des lapins immunisés avec VP4 de pleine longueur sous la forme d'un concatamère.

La figure 5 présente des anticorps neutralisants contre diverses couches de HRV, induits chez des lapins immunisés avec des peptides VP1 conjugués à KLH.

La figure 6 présente des anticorps neutralisants contre diverses souches de HRV, induits chez des lapins immunisés avec des peptides VP4 conjugués à KLH ou dans une construction chimérique avec HBsAg ou avec des concatamères de pleine longueur de VP4.

La figure 7 présente des anticorps spécifiques de la région 1 à 16 de VP4 chez des lapins immunisés par VP4 1-31 ou VP4 de pleine longueur, par rapport à VP4 1-16.

La figure 8 présente un alignement des acides aminés 32 à 45 de VP1 de différents sérotypes de HRV de clade A alignés sur HRV14.

La figure 9 présente un alignement des acides aminés 32 à 45 de VP1 de différents sérotypes de HRV de clade B alignés sur HRV14.

La figure 10 présente un alignement des acides aminés 32 à 45 de VP1 de différents sérotypes de HRV de clade C alignés sur HRV14.

La figure 11 présente un alignement des acides aminés 1 à 16 de VP4 de différents sérotypes de HRV de clade A alignés sur HRV14.

La figure 12 présente un alignement des acides aminés 1 à 16 de VP4 de différents sérotypes de HRV de clade B alignés sur HRV14.

La figure 13 présente un alignement des acides aminés 1 à 16 de VP4 de différents sérotypes de HRV de clade C alignés sur HRV14.

La figure 14 présente un alignement des résidus N-terminaux des protéines VP1 de certains picornavirus. Les peptides similaires à HRV14 32-45 sont marqués dans l'encadré.

La figure 15 présente un alignement des protéines VP4 des picornavirus choisis. Les peptides sont similaires au peptide HRV14 VP4 1-16 marqué dans l'encadré.

Les figures 16 à 24 présentent les séquences de nucléotides et d'acides aminés et des plasmides, pour le polypeptide chimérique VP4-S construit dans l'exemple 2 ci-dessous.

Description détaillée

25

Introduction

La présente description concerne des compositions et des procédés pour la prévention et le traitement d'une infection à picornavirus, en particulier à picornavirus du genre des entérovirus, plus

30

particulièrement un entérovirus humain tel qu'un rhinovirus humain (HRV).

Les rhinovirus sont des virus non enveloppés et sont composés d'une capsidie formée de quatre protéines virales VP1, VP2, VP3 et VP4. VP1, VP2 et VP3 constituent la majeure partie de la capsidie de la protéine. La protéine VP4 beaucoup plus petite, d'environ 70 acides aminés de longueur, a une structure plus étendue et se situe à l'interface entre la capsidie et l'ARN génomique. La capsidie est constituée de 60 copies de chacune de ces protéines assemblées en un icosaèdre.

Le génome du rhinovirus consiste en un ARN linéaire, à brin simple, à sens positif comprenant entre 7,2 et 8,5 kb de longueur. Les protéines structurales sont codées dans la région 5' du génome (à partir de l'extrémité 5' : VP4, VP2, VP3 et VP1) et non structurale à l'extrémité 3', comme c'est le cas pour tous les picornavirus. L'ARN est traduit en une polyprotéine simple qui est clivée de façon co-traductionnelle et post-traductionnelle en quatre protéines structurales et sept protéines non structurales. Les gènes non structuraux sont impliqués dans le traitement du génome viral, la réplication virale et l'arrêt de la production de protéine dans la cellule hôte.

Actuellement, il existe plus de 100 sérotypes de HRV. Sur la base de l'identité de nucléotides et de la sensibilité de composés antiviraux, les HRV ont été classés en clades A, B, C et éventuellement D

(Rollinger & Schmidtke, 2011 ; Palmenberg, Rathe & Liggett, 2010), voir le tableau 1.

Tableau 1

Clades	Type de récepteur	Nombre de sérotypes	Exemples de sérotypes	Remarques
HRV-A	<i>Majeur</i>	62	16	
HRV-A	<i>Mineur</i>	12	1A, 1B, 2, 23, 25, 29, 30, 31, 44, 47, 49, 62	
HRV-B	<i>Majeur</i>	25	3, 14	
HRV-C	?	7		Nouveau clade émergent
HRV87	?	1		Même virus que l'entérovirus 68 humain, de l'espèce HEV-D (Blomqvist et al., 2002)
(HRV-D)	<i>Majeur</i>	3	8, 45, 95	Clade potentiellement séparé (distinct d'autres clades à base de VP3 et protéines non structurales mais ni VP1 ni VP4)

5

De plus, une spécificité du récepteur de la cellule hôte a été utilisée pour classer encore ces virus en groupes majeur et mineur. Les sérotypes qui utilisent le récepteur de la molécule d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1) (sérotypes 62 HRV-A et tous les sérotypes B) font partie du groupe de récepteurs

10

majeurs et les 12 sérotypes HRV-A restants utilisent des membres de la famille de récepteurs des lipoprotéines basse densité (LDL) et font partie du groupe de récepteurs mineurs. Par conséquent, les
5 termes « HRV-A majeur », « HRV-A mineur » et « HRV-B majeur » sont utilisés.

Les sérotypes sont en outre classés en fonction des sites antigéniques qu'ils utilisent pour échapper au système immunitaire de l'hôte. Pour le groupe de
10 récepteurs majeurs, quatre sites immunogènes neutralisants primaires (NIm) ont été affectés à des régions proéminentes sur les protéines de capsid externe VP1, VP2 et VP3. Ils sont connus sous les noms NIm-IA, NIm-IB, NIm-II et NIm-III. Pour les sérotypes
15 du récepteur mineur, il existe trois sites antigéniques distincts A, B et C qui sont situés dans le même voisinage que les sites NIm (décrits par Lewis-Rogers *et al* 2009). Il a été démontré que les anticorps induits avec des protéines HRV-14 ou 89 VP1
20 recombinantes ou un peptide couvrant les acides aminés 147 à 162 de HRV14 VP1 présentent une activité spécifique et neutralisante croisée (McCray & Werner, 1998 ; Edlmayr *et al.*, 2011). On a observé que la structure de capsid du rhinovirus est dynamique et on
25 constate qu'elle oscille entre deux états structuraux différents : l'un dans lequel VP4 est profondément enfoui et l'autre dans lequel les terminaisons N de VP4 et VP1 sont accessibles aux protéases (Lewis *et al* 1998). Les anticorps dirigés contre les 30 acides
30 aminés N-terminaux de VP4 mais non de VP1 se sont avérés neutraliser avec succès le pouvoir infectieux

viral *in vitro* (Katpallyet *al* 2009). Les anticorps dirigés contre les 30 acides aminés N-terminaux de VP4 se sont avérés neutraliser HRV14, HRV16 et HRV29. De plus, les anticorps dirigés contre une séquence
5 consensus des 24 premiers résidus du rhinovirus VP4 ont aussi une activité neutralisante croisée (Katpally *et al*, 2009).

On peut trouver d'autres occurrences de peptides et/ou épitopes de rhinovirus dans la littérature, chez
10 Niespodziana *et al* 2012 pour lesquels une réponse contre un 20-mère N-terminal de VP1 n'était pas une réponse neutralisante c'est-à-dire était un épitope non protecteur ; Miao *et al* 2009 - des MAb générés contre la partie N-terminale de l'entérovirus VP1 qui est
15 hautement conservé sont utiles pour reconnaître un large éventail d'entérovirus ; le document WO 2006/078648 concernant des vaccins peptidiques contre HRV dérivé de régions de VP4 exposées de façon transitoire, en particulier les acides aminés 1 à 31 ou
20 1 à 24 de VP4 ; le document WO 2011/050384 concernant des peptides de la région N-terminale de VP1 comprenant les acides aminés 1 à 8 ; le document WO 2008/057158 concernant NIm IV du rhinovirus, en particulier un peptide comprenant les acides aminés 277 à 283 ou 275 à
25 285 de la région carboxy-terminale de VP1, en particulier de HRV-14.

La mise à disposition d'un vaccin contre HRV est un défi particulier en raison du grand nombre de sérotypes du virus et de l'absence d'une réponse
30 protectrice générée chez les individus infectés par un sérotype contre une infection par un autre sérotype. Un

aspect important d'un vaccin contre HRV qui assure une protection contre un nombre suffisant de sérotypes de HRV pour conférer une protection efficace contre une infection à HRV est la mise à disposition d'épitopes de plus d'une protéine structurale de HRV, par exemple, de VP4 et de VP1. Un autre aspect important est la mise à disposition de peptides qui sont conservés parmi les sérotypes de HRV. Un autre aspect important est la mise à disposition de peptides qui génèrent une réponse en anticorps neutralisants. Dans ce document sont proposés des peptides de HRV et des combinaisons de peptides de HRV de différentes protéines structurales de HRV et des constructions contenant les peptides et des combinaisons de peptides. En proposant des peptides qui sont conservés parmi les sérotypes de HRV, les inventeurs ont également découvert des peptides qui sont remarquablement conservés parmi les picornavirus en général.

En conséquence, la présente description concerne des peptides de protéines structurales de picornavirus qui sont choisis comme étant capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre différents picornavirus qui peuvent être différents picornavirus ou différents sérotypes du même picornavirus, par exemple, différents sérotypes de rhinovirus. Ces peptides peuvent être distribués selon de nombreuses façons comprenant des peptides couplés ou conjugués à des protéines vectrices telles que CRM197 ou dans une construction chimérique, à un polypeptide dans lequel le peptide ou les peptides sont insérés, par exemple un polypeptide qui forme une particule

telle qu'une particule de type viral ou une particule subvirale.

Dans un mode de réalisation, une combinaison de peptides de picornavirus est proposée, qui comprend des
5 premier et deuxième peptides de différentes protéines structurales de picornavirus. Par exemple, les premier et deuxième peptides peuvent être des picornavirus VP4 et VP1. Avantageusement, les peptides sont des peptides courts de 20 acides aminés au plus, bien qu'ils
10 puissent être plus longs que cela. Dans un mode de réalisation, les peptides sont dérivés de la région N-terminale des protéines structurales.

Dans un mode de réalisation, les premier et deuxième peptides proviennent d'un entérovirus humain
15 et les peptides d'entérovirus sont capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs entérovirus. Dans un mode de réalisation particulier, l'un ou les deux des premier et deuxième peptides proviennent d'un rhinovirus humain
20 et les peptides de rhinovirus sont capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs sérotypes de rhinovirus c'est-à-dire contre le sérotype de rhinovirus duquel le peptide est dérivé et au moins un autre sérotype de
25 rhinovirus.

Dans un mode de réalisation, le premier peptide comprend les acides aminés 32 à 45 de VP1 ou une variante des acides aminés 32 à 45 de VP1 ayant 1 à
4 additions ou délétions d'acides aminés à l'une ou
30 l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou

additions ou délétions d'acides aminés ou dans la séquence de peptide.

Dans un mode de réalisation particulier, le peptide VP1 est un peptide de rhinovirus humain et, en particulier, comprend le peptide ayant une séquence choisie parmi :

- HRV14 (B) : 32-PILTANETGATMPV-45 [SEQ ID N° : 1]
- HRV8 (A-M) : 32-PALDAAETGHTSSV-45 [SEQ ID N° : 2]
- HRV25(A-m) : 32-PILDAAETGHTSNV-45 [SEQ ID N° : 3]
- 10 HRV_C_026 : 32-QALGAVEIGATADV-45 [SEQ ID : 4]

ou une variante de celles-ci ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés à l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide.

15 Dans un mode de réalisation, le deuxième peptide présente les acides aminés 1 à 16 de VP4 ou une variante des acides aminés 1 à 16 de VP4 ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide.

20 Dans un mode de réalisation particulier, le peptide VP4 est un peptide de rhinovirus humain et, en particulier, comprend le peptide ayant une séquence choisie parmi :

- HRV14 (B) : 1-GAQVSTQKSGSHENQN-16 [SEQ ID N° : 5]
- HRV100(A-M) : 1-GAQVSRQNVGTHSTQN-16 [SEQ ID N° : 6]
- HRV_C_026 : 1-GAQVSRQSVGSHETMI-16 [SEQ ID N° : 7]

30 ou une variante de celles-ci ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre

extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide.

L'invention propose également des peptides de picornavirus individuels, par exemple les peptides de
5 rhinovirus présentant les séquences indiquées dans SEQ ID N° 1 à 7 et des variantes de celles-ci, telles que décrites ici.

Lorsqu'une variante d'une séquence de peptide présente 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés
10 sur l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide, cela signifie que la variante a au moins une différence d'acides aminés par rapport à la séquence de peptide de référence, qui
15 peut comprendre entre 0 et 4 additions ou délétions d'acides aminés sur une extrémité et entre 0 et 4 additions ou délétions sur l'autre extrémité et entre 0 et 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence.

20 Dans un mode de réalisation, un peptide de picornavirus proposé dans ce document consiste en 20 acides aminés au plus de la terminaison N de VP4, ledit peptide comprenant les acides aminés 1 à 16 de VP4 ou une variante des acides aminés 1 à 16 ayant 1 à
25 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide. Dans un mode de réalisation particulier, le peptide VP4 consiste en les acides aminés 1 à 16 de VP4
30 ou une variante ayant une ou deux ou trois ou quatre additions ou délétions ou substitutions d'acides

aminés. D'autres peptides VP4 spécifiques comprennent, par exemple, les acides aminés 1 à [16-20], les acides aminés 2 à [17-21], 3 à [18-22], 4 à [19-23], 5 à [20-24], où l'on comprendra que les nombres entre crochets comprennent tous les nombres figurant individuellement dans l'intervalle indiqué. Avantageusement, le peptide VP4 consiste en 16 acides aminés contigus de VP4 au plus. On comprendra que la numérotation du peptide VP4 telle qu'elle est utilisée ici est indépendante de la méthionine compte tenu du codon de départ.

Dans un autre mode de réalisation, un peptide de picornavirus consiste en 40 acides aminés au plus de la région N-terminale de VP1, ledit peptide comprenant les acides aminés 32 à 45 de VP1 ou une variante des acides aminés 32 à 45 ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide. Dans un mode de réalisation particulier, le peptide VP1 consiste en les acides aminés 32 à 45 de VP4 ou une variante ayant une ou deux ou trois ou quatre additions ou délétions ou substitutions d'acides aminés. Les peptides de VP1 comprennent, par exemple, les acides aminés [5-35] à 45, [6-35] à 46, [7-35] à 47, [8-35] à 48, [9-35] à 49 et de même 32 à [45-72], 33 à [45-73], 34 à [45-74], 35 à [45-75] et 36 à [45-76], où les nombres entre crochets comprennent tous les nombres figurant individuellement dans l'intervalle indiqué. Ces peptides peuvent être associés dans une composition immunogène décrite ici. Ces peptides de picornavirus en général, ou de virus du genre des entérovirus et du

genre des rhinovirus en particulier, sont une caractéristique de la présente invention, individuellement et en combinaison en tant que premier et deuxième peptides.

5 Dans un mode de réalisation, le peptide ou les peptides de picornavirus sont couplés à une protéine vectrice telle que CRM197. Les protéines vectrices appropriées comprennent CRM197, la protéine D dérivée de *Haemophilus influenza* non typable, PhtD, PhtDE, 10 l'adénylatécyclase, l'anatoxine tétanique (TT), le fragment C de l'anatoxine tétanique, des mutants non toxiques de l'anatoxine tétanique, l'anatoxine diphtérique (DT), la pneumolysine (Ply), l'exotoxine A (ExoA) et des nanoparticules telles que des 15 nanoparticules synthétiques. D'autres protéines vectrices appropriées comprennent les protéines de picornavirus, par exemple des protéines non structurales de HRV telles qu'une protéase virale, la polymérase et d'autres protéines impliquées dans la 20 réplication du picornavirus ou d'autres virus. Avantagement, la protéine vectrice est une protéine non structurale du picornavirus telle que HRV, conférant un bénéfice supplémentaire d'une réponse immunitaire contre la protéine non structurale. Les 25 premier et deuxième peptides dans la composition immunogène décrits ici peuvent être couplés à des protéines vectrices identiques ou différentes qui peuvent être sélectionnées dans la liste ci-dessus. Lorsqu'ils sont couplés à la même protéine vectrice, 30 les peptides peuvent être couplés séparément à la même protéine vectrice puis les peptides couplés peuvent

être combinés ou les peptides peuvent exister tout d'abord mélangés l'un à l'autre puis couplés à la protéine vectrice.

Dans un autre mode de réalisation, le peptide ou
5 les peptides sont combinés à ou insérés dans un polypeptide pour donner une construction de polypeptide chimérique. Dans ce mode de réalisation, la composition immunogène comprend au moins une construction de polypeptide chimérique comprenant un polypeptide de
10 squelette et un peptide ou des peptides. Si deux ou plusieurs peptides sont présents, ceux-ci peuvent être dans la même construction de polypeptide chimérique ou dans des constructions de polypeptides chimériques distinctes qui peuvent avoir le même squelette de
15 polypeptide ou un squelette différent. Avantageusement, la construction de polypeptide chimérique forme une particule telle qu'une particule de type viral. Le polypeptide de squelette peut être tout polypeptide approprié, tel que des polypeptides structuraux ou non
20 structuraux de virus tels que le papillomavirus humain (HPV), le rhinovirus, le virus de l'hépatite B, EV-71, le virus de la grippe ou un norovirus.

Dans certains modes de réalisation, les peptides sont présents sur une région exposée de la particule en
25 étant insérés dans une région appropriée du polypeptide de squelette, par exemple une boucle exposée en surface, par exemple dans la boucle « a » de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) ou la région N-terminale ou C-terminale de HBsAg comprenant l'une des
30 terminaisons. Dans certains modes de réalisation, deux des peptides identiques ou différents de HRV sont

insérés dans différents sites dans un polypeptide unique tel que la boucle « a » et la région N-terminale ou C-terminale du polypeptide de HBsAg, donnant ainsi une particule de polypeptide chimérique de HBsAg à double insertion de peptide. Dans un mode de réalisation particulier, un peptide VP1 tel que décrit ici, tel qu'un peptide VP1 32-45 ou une variante de celui-ci, est inséré dans la boucle « a » de HBsAg et un peptide VP4 tel que décrit dans ce document, tel qu'un peptide VP4 1-16 ou une variante de celui-ci, est inséré dans la région N-terminale du même polypeptide de HBsAg ou inversement. Dans un autre aspect de la description est proposée une particule de polypeptide chimérique comprenant un polypeptide de squelette capable de former une particule et au moins un peptide comprenant un épitope d'un polypeptide structural d'un picornavirus. Le polypeptide de squelette peut être par exemple HBsAg, HPV L1 ou une protéine structurale de rhinovirus ou toute autre particule virale, avantageusement, l'une qui soit capable de former une particule telle qu'une VLP.

Dans un mode de réalisation particulier, la particule est un HBsAg chimérique comprenant un polypeptide de HBsAg ou un fragment de celui-ci, dans laquelle sont insérés un ou plusieurs picornavirus VP4 ou peptides de VP1 comme on le décrit dans ce document. Dans un mode de réalisation, HBsAg chimérique comprend deux ou plusieurs peptides de protéines structurales de picornavirus qui peuvent être identiques ou différents. Avantageusement, les peptides sont chacun capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation

croisée contre deux ou plusieurs picornavirus différents, par exemple deux ou plusieurs sérotypes de rhinovirus. Avantageusement, le polypeptide chimérique de HBsAg chimérique forme une particule de type viral.

5 Dans un mode de réalisation est proposée la particule de HBsAg chimérique dans laquelle un peptide VP4 tel que décrit dans ce document, avantageusement, un peptide VP4 qui contient un épitope d'un picornavirus capable d'induire une réponse immunitaire de

10 neutralisation croisée, par exemple un peptide VP4 comprenant VP4 1-16, par exemple, VP4 1-31 ou VP1-24 ou VP1-16, est fusionné à HBsAg à l'extrémité N-terminale ou dans la boucle « a » de HBsAg. Dans un autre mode de réalisation est proposée une particule de HBsAg

15 chimérique dans laquelle un peptide VP1 tel que décrit ici, avantageusement, un peptide VP4 qui contient un épitope d'un picornavirus capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée, par exemple un peptide VP1 comprenant VP1 32-45, est fusionné à HBsAg

20 à l'extrémité N-terminale ou dans la boucle "a" de HBsAg. Dans un autre mode de réalisation est proposée une chimère à peptide double dans lequel à la fois les peptides VP1 et VP4 tels que décrits dans ce document sont insérés dans HBsAg, l'un à l'extrémité N-terminale

25 et l'autre dans la boucle « a ». Dans un mode de réalisation, les peptides VP1 et VP4 proviennent d'un rhinovirus.

Les compositions immunogènes proposées dans ce document peuvent comprendre en outre un adjuvant qui

30 peut être par exemple, un sel minéral tel qu'un sel d'aluminium, par exemple, l'hydroxyde d'aluminium. Dans

un autre mode de réalisation, l'adjuvant comprend le lipide A 3-désacylé monophosphoryle (3D-MPL). Dans un autre mode de réalisation, l'adjuvant comprend QS21.

Un autre aspect de la présente description
5 concerne des molécules d'acide nucléique qui codent pour un peptide ou un polypeptide chimérique tel que décrit ci-dessus. Ces acides nucléiques peuvent être présents dans un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote. Les vecteurs d'expression appropriés
10 comprennent par exemple, une levure telle que *Pichia pastoris*. Des acides nucléiques recombinants, par exemple, des vecteurs d'expression, peuvent être introduits (par exemple, par infection, transfection ou transformation) dans des cellules hôtes. Ces cellules
15 hôtes sont également un aspect de la présente description. Ces cellules hôtes peuvent être utilisées pour produire les polypeptides chimériques, par exemple par réplication de la cellule hôte dans des conditions appropriées pour l'expression du polypeptide
20 recombinant. Eventuellement, le polypeptide peut ensuite être isolé et/ou purifié, par exemple, avant la formulation en une composition immunogène.

L'un quelconque des peptides ou des polypeptides chimériques décrits dans ce document peut être utilisé
25 en médecine, par exemple, en tant que compositions immunogènes (telles que des vaccins) pour la prévention ou le traitement d'une infection provoquée par un picornavirus tel que HRV. Ces compositions sont appropriées pour l'utilisation dans des procédés
30 d'induction d'anticorps contre un picornavirus tel que HRV chez l'être humain en administrant la composition

immunogène à un sujet humain. Avantageusement, l'administration de la composition immunogène au sujet humain induit le développement d'anticorps qui préviennent, améliorent ou traitent l'infection ou la
5 maladie à picornavirus, par exemple, une infection ou maladie à HRV.

Par conséquent, la présente description propose également des compositions immunogènes pour leur utilisation dans la prévention, l'amélioration ou le
10 traitement d'une infection ou d'une maladie à picornavirus. Ces compositions immunogènes comprennent un polypeptide chimérique comprenant un ou plusieurs peptides de picornavirus tels que décrits dans ce document, ledit polypeptide chimérique pouvant se
15 présenter sous la forme d'une particule de VLP telle que décrite ci-dessus, en combinaison avec un excipient, diluant ou véhicule pharmaceutiquement acceptable. Dans certains modes de réalisation, la composition immunogène comprend également un adjuvant.
20 Les adjuvants appropriés comprennent un sel d'aluminium tel que l'hydroxyde d'aluminium, le 3D-MPL et le QS21. Les combinaisons appropriées d'adjuvants comprennent l'hydroxyde d'aluminium et le 3D-MPL ; et les 3D-MPL et QS21 éventuellement préparés avec des liposomes.

25

Définitions

Afin de faciliter l'examen des divers modes de réalisation de la présente description, les explications suivantes des termes sont fournies. Des
30 termes et explications supplémentaires peuvent être proposés dans le contexte de la présente description.

Sauf indication contraire, tous les termes techniques et scientifiques utilisés dans ce document ont la même signification que celle communément admise par l'homme du métier auquel la présente description est destinée. Les définitions des termes courants de biologie moléculaire peuvent être trouvées dans les ouvrages de Benjamin Lewin, *Genes V*, publié par Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9) ; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publié par Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) ; et Robert A. Meyers (éd.), *Molecular Biology and Biotechnology : a Comprehensive Desk Reference*, publié par VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Les articles singuliers « un », « une », et « le/la » comprennent des référents pluriels sauf si le contexte indique clairement le contraire. De même, le mot « ou » est destiné à comprendre « et » sauf si le contexte indique clairement le contraire. Le terme « pluralité » fait référence à deux ou plus. On comprendra en outre que toutes les tailles de base ou les tailles d'acides aminés et tous les poids moléculaires ou valeurs de masse moléculaire, mentionnés pour les acides nucléiques ou les polypeptides, sont approximatifs et sont mentionnés à des fins de description. De plus, les limites numériques mentionnées eu égard aux concentrations ou taux d'une substance telle qu'un antigène, sont entendus comme étant approximatifs. Par conséquent, s'il est indiqué qu'une concentration est d'au moins (par exemple) 200 pg, il est entendu que la

concentration sera comprise comme étant d'au moins à peu près (ou « environ » ou « ~ ») 200 pg.

Bien que des procédés et matériaux similaires ou équivalents à ceux décrits dans ce document puissent être utilisés dans la mise en pratique ou le test de la présente description, des procédés et matériaux appropriés sont décrits ci-dessous. Le terme « comprend » signifie « inclus ». Par conséquent, sauf si le contexte indique le contraire, le mot « comprend » et ses variantes telles que « comprendre » et « comprenant » seront compris comme impliquant l'inclusion d'un composé ou d'une composition mentionné(e) (par exemple, un acide nucléique, un polypeptide, un antigène) ou une étape ou un groupe de composés ou d'étapes mais non l'exclusion de tout autre composé, composition, étapes ou groupes de ceux-ci.

Un « polypeptide » est un polymère dans lequel les monomères sont des résidus d'acides aminés qui sont joints les uns aux autres par des liaisons amide. Un « peptide » est une courte séquence d'acides aminés, par exemple, environ 10 à 50 ou 10 à 40 acides aminés de longueur. Les termes « polypeptide » ou « protéine » ou « peptide » tels qu'ils sont utilisés dans ce document, sont entendus de façon à comprendre toute séquence d'acides aminés et comprennent des séquences modifiées telles que des glycoprotéines. Les termes « polypeptide » et « peptide » sont spécifiquement destinés à couvrir des protéines existant à l'état naturel ainsi que celles qui sont produites de façon recombinante ou synthétique. Le terme « fragment », en référence à un polypeptide, désigne une partie (c'est-

à-dire, une sous-séquence) d'un polypeptide. Le terme « fragment immunogène » désigne tous les fragments d'un polypeptide qui conservent au moins un épitope immunogène prédominant de la protéine ou du polypeptide de pleine longueur de référence. L'orientation dans les protéines structurales de picornavirus et les peptides cités en exemple désigne une orientation N-terminale à C-terminale, définie par l'orientation des fractions amino et carboxy des acides aminés individuels. Les polypeptides et peptides sont traduits de la terminaison N ou amino-terminale vers la terminaison C ou carboxy-terminale.

Les « protéines structurales » d'un virus tel qu'un picornavirus sont des protéines qui sont des composants de la particule virale mature assemblée et peuvent comprendre une protéine de noyau de nucléocapside, des enzymes empaquetées dans la particule virale et les protéines membranaires. Les protéines structurales de picornavirus tels que HRV comprennent VP1, VP2, VP3, VP4. Les protéines structurales ne comprennent pas les « protéines non structurales » du virus qui sont des protéines qui sont produites dans des cellules infectées mais qui ne sont pas présentes dans la particule virale mature. La région « N-terminale » des protéines structurales de picornavirus désigne la moitié N-terminale des protéines de pleine longueur, avantageusement une région dans la moitié N-terminale de la protéine et dans la région N-terminale ou proche de la région N-terminale de la protéine de pleine longueur. Par conséquent, pour VP4 qui n'est que d'environ 70 acides

aminés de longueur, la région N-terminale est considérée comme étant les acides aminés 1 à 35 de la protéine de pleine longueur ou une région dans les acides aminés 1 à 35 sur la terminaison N ou proche de la terminaison N de la protéine de pleine longueur, les
5 acides aminés 1 à 30 ou 1 à 25 ou 1 à 20 de la protéine de pleine longueur ou d'une région dans les acides aminés 1 à 30 ou 1 à 25 ou 1 à 20 sur la terminaison N ou proche de la terminaison N de la protéine de pleine
10 longueur. Pour VP1 qui est une protéine plus longue de près de 300 acides aminés, la région N-terminale est considérée comme étant les acides aminés 1 à 100, avantageusement, 1 à 80 ou 1 à 70 ou 1 à 60 ou 1 à 50
15 de la protéine de pleine longueur ou une région dans les 100 ou 80 ou 70 ou 60 ou 50 acides aminés N-terminaux et sur la terminaison N ou proche de la terminaison N de la protéine.

Le terme « picornavirus » désigne tout virus de la famille des picornaviridés comprenant les virus humains
20 et animaux. L'expression « rhinovirus humain » abrégée par HRV désigne tout sérotype de rhinovirus de la famille des picornaviridés qui est capable d'infecter des êtres humains et a été identifié ou doit encore être identifié en tant que rhinovirus. Il existe
25 plusieurs façons différentes de regrouper les HRV comme on le décrit dans ce document et chaque regroupement contient de multiples « sérotypes » ou « souches » de virus (par exemple, HRV-14, HRV-8, HRV-25, etc.)
30 catégorisés en fonction de similitudes génétiques. Dans le contexte de la présente description, le terme

« sérotype » peut être utilisé pour désigner un HRV, et/ou un polypeptide ou peptide du type de HRV indiqué.

Les termes « polynucléotide » et « séquence d'acide nucléique » désignent une forme polymère de
5 nucléotides d'au moins 10 bases de longueur. Les nucléotides peuvent être des ribonucléotides, des désoxyribonucléotides ou des formes modifiées de l'un ou l'autre nucléotide. Le terme comprend les formes simple et double d'ADN. L'expression « polynucléotide
10 isolé » désigne un polynucléotide qui n'est pas immédiatement contigu aux deux séquences codantes desquelles il est immédiatement contigu (l'une à l'extrémité 5' et l'autre à l'extrémité 3') dans le génome existant à l'état naturel de l'organisme duquel
15 il provient. Dans un mode de réalisation, un polynucléotide code pour un polypeptide. Les directions 5' et 3' d'un acide nucléique sont définies en référence à la capacité de raccordement des unités de nucléotides individuels et nommées en fonction des
20 positions du carbone du cycle du sucre désoxyribose (ou ribose). Le contenu informationnel (codage) d'une séquence de polynucléotide est lu dans une direction 5' à 3'.

L'expression « protéine vectrice » désigne toute
25 protéine à laquelle le peptide est couplé ou fixé ou conjugué, habituellement afin de renforcer ou de faciliter la détection de l'antigène par le système immunitaire. Le terme est destiné à couvrir à la fois les petits peptides et les grands polypeptides
30 (>10 kDa). La protéine vectrice peut comprendre un ou plusieurs épitopes T auxiliaire. Le peptide peut être

couplé à la protéine vectrice par tout moyen tel que la conjugaison chimique.

L'expression « particule de type viral » (VLP) désigne une capsid virale qui ressemble à la structure de la protéine externe du virus natif mais est non infectieuse car elle ne contient pas de matériel génétique viral. L'expression des protéines structurales virales, connues sous le nom de protéines d'enveloppe ou de capsid ou de surface peut entraîner l'auto-assemblage des VLP. Les VLP peuvent être enveloppées ou non enveloppées. Les VLP ont généralement une structure icosaédrique constituée de sous-unités de protéine identique répétées connues sous le nom de capsomères. Les capsomères s'auto-assemblent pour former les VLP. Les « particules » des constructions de polypeptides chimériques sont des structures telles que des agrégats amorphes ou des structures plus ordonnées, par exemple, un capsomère (capsomère) ou une particule de type virale (VLP) ou de petites structures non VLP. Les particules comprenant les VLP, capsomères et les structures moins ordonnées comprennent des particules HBsAg du virus de l'hépatite B constituées du petit antigène de surface de HBV, des particules de HPV constituées des protéines L1 ou L1 et L2 de HPV, des particules de HRV constituées de VP1, VP2, VP3 et VP4 ou VP1, VP2 et VP3 de HRV et des particules d'autres virus tels que le virus de la grippe ou un norovirus ou entérovirus, par exemple, EV-71. Plus récemment, des particules comprenant des VLP ont été produites à partir de composants d'une large diversité de familles de virus comprenant les

parvoviridés (par exemple, virus adéno-associés), les rétroviridés (par exemple, VIH) et les flaviviridés (par exemple, virus de l'hépatite C). Les VLP d'EV71 sont décrits par Cheng-Yu Chung et al 2010. Les VLP
5 peuvent être produites dans divers systèmes de culture cellulaire comprenant des lignées de cellules de mammifères, des lignées de cellules d'insecte, des levures, des cellules de plantes et *E. coli*.

Le terme « hétérologue » eu égard à un acide
10 nucléique, un polypeptide ou un autre composant cellulaire, indique que le composant existe là où on ne le trouve pas normalement à l'état naturel et/ou qu'il provient d'une source ou espèce différente.

Les termes « natif » et « existant à l'état
15 naturel » désignent un élément tel qu'une protéine, un polypeptide ou un acide nucléique qui est présent dans le même état qu'à l'état naturel. Cela signifie que l'élément n'a pas été modifié artificiellement. On comprendra que dans le contexte de la présente
20 description, il existe de nombreux sérotypes natifs/existant à l'état naturel de HRV (et des protéines et polypeptides de HRV), par exemple, obtenus à partir de différents sérotypes de HRV existant à l'état naturel.

25 Une « variante » lorsqu'elle désigne un acide nucléique ou un polypeptide (par exemple, un acide nucléique ou un polypeptide de picornavirus VP1 ou VP4) est un acide nucléique ou un polypeptide qui diffère d'un acide nucléique ou d'un polypeptide de référence.
30 Généralement, la/les différence(s) entre la variante et l'acide nucléique ou le polypeptide de référence

constituent un nombre proportionnellement réduit de différences par rapport au référent. Un acide nucléique variant peut différer de l'acide nucléique de référence auquel il est comparé par l'addition, la délétion ou la substitution d'un ou plusieurs nucléotides ou par la substitution d'un analogue de nucléotide artificiel. De même, un peptide ou polypeptide variant peut différer du polypeptide de référence auquel il est comparé par l'addition, la délétion ou la substitution d'un ou plusieurs acides aminés ou par la substitution d'un analogue d'acide aminé. Des variantes des peptides VP1 et VP4 sont décrites plus précisément et plus spécifiquement dans le présent document.

Un « antigène » est un composé, une composition ou une substance qui peut stimuler la production d'anticorps et/ou une réponse en lymphocytes T chez un animal, comprenant des compositions qui sont injectées, absorbées ou introduites d'une autre façon chez un animal. Le terme « antigène » comprend tous les épitopes antigéniques apparentés. Le terme « épitope » ou l'expression « déterminant antigénique » désigne un site ou un antigène auquel répondent des lymphocytes B et/ou T. L'expression « épitopes antigéniques dominants » ou « épitope dominant » désigne des épitopes auxquels une réponse immunitaire de l'hôte fonctionnellement significative, par exemple, une réponse en anticorps ou une réponse en lymphocytes T est produite. Par conséquent, eu égard à une réponse immunitaire protectrice contre un agent pathogène, les épitopes antigéniques dominants sont les fractions antigéniques qui, lorsqu'elles sont reconnues par le

système immunitaire de l'hôte, entraînent une protection contre une maladie provoquée par l'agent pathogène. Le terme « épitope de lymphocyte T » désigne un épitope qui, lorsqu'il est lié à une molécule de MHC appropriée, est spécifiquement lié par un lymphocyte T (via un récepteur de lymphocyte T). Un « épitope de lymphocyte T » est un épitope qui est lié spécifiquement par un anticorps (ou une molécule du récepteur des lymphocytes B). Un « épitope neutralisant » est un épitope qui est capable d'induire une réponse immunitaire neutralisante.

Un « adjuvant » est un agent qui renforce la production d'une réponse immunitaire de manière non spécifique. Les adjuvants courants comprennent des suspensions de minéraux (alun, hydroxyde d'aluminium, phosphate d'aluminium) sur lesquelles un antigène est adsorbé ; des émulsions comprenant des émulsions eau dans huile et huile dans eau (et leurs variantes comprenant des émulsions doubles et des émulsions réversibles), des liposaccharides, des lipopolysaccharides, des acides nucléiques immunostimulants (tels que des oligonucléotides de CpG), des liposomes, des agonistes du récepteur de type Toll (en particulier, les agonistes TLR2, TLR4, TLR7/8 et TLR9) et leurs diverses combinaisons de ces composants.

Une « composition immunogène » est une composition de matériaux appropriés pour l'administration à un sujet humain ou animal (par exemple, dans un cadre expérimental) qui est capable de provoquer ou d'induire une réponse immunitaire spécifique, par exemple, contre

un agent pathogène tel qu'un picornavirus. En tant que telle, une composition immunogène comprend un ou plusieurs antigènes (par exemple, des antigènes polypeptidiques) ou des épitopes antigéniques. Une
5 composition immunogène peut également comprendre un ou plusieurs composants supplémentaires capables de provoquer ou d'induire ou de renforcer une réponse immunitaire, tels qu'un excipient, un véhicule et/ou un adjuvant. Dans certains cas, des compositions
10 immunogènes sont administrées de façon à provoquer ou induire une réponse immunitaire qui protège le sujet contre des symptômes ou des affections induites par un agent pathogène. Dans certains cas, des symptômes ou maladies provoquées par un agent pathogène sont
15 empêchés (ou réduits ou améliorés) par l'inhibition de la réplication de l'agent pathogène (par exemple, un picornavirus) après l'exposition du sujet à l'agent pathogène. Dans le contexte de la présente description, l'expression « composition immunogène » sera comprise
20 de façon à comprendre les compositions qui sont prévues pour l'administration à un sujet ou une population de sujets afin de provoquer ou induire une réponse protectrice ou palliative contre des picornavirus, par exemple, HRV (c'est-à-dire des compositions vaccinales
25 ou des vaccins).

Une « réponse immunitaire » est une réponse d'une cellule du système immunitaire telle qu'un lymphocyte B, un lymphocyte T ou un monocyte, à un stimulus. Une
réponse immunitaire peut être une réponse en
30 lymphocytes B qui entraîne la production d'anticorps spécifiques tels que des anticorps neutralisants

spécifiques d'un antigène. Une réponse immunitaire peut également être une réponse en lymphocytes T telle qu'une réponse en CD4+ ou une réponse en CD8+. Dans certains cas, la réponse est spécifique d'un antigène particulier (c'est-à-dire, une « réponse spécifique à l'antigène »). Si l'antigène est dérivé d'un agent pathogène, la réponse spécifique à un antigène est une « réponse spécifique à un agent pathogène ». Une « réponse immunitaire protectrice » est une réponse immunitaire qui inhibe une fonction ou une activité préjudiciable d'un agent pathogène, qui réduit une infection par un agent pathogène ou qui diminue les symptômes (y compris la mort) qui résultent d'une infection par l'agent pathogène. Une réponse immunitaire protectrice peut être mesurée, par exemple, par l'inhibition de la réplication virale ou de la formation de plaque dans un essai de réduction de plaque ou un essai de neutralisation ELISA ou en mesurant la résistance à une provocation par un agent pathogène *in vivo*. Une réponse immunitaire est une réponse immunitaire de neutralisation croisée lorsqu'elle est induite par un antigène d'un sérotype de picornavirus et neutralise non seulement un virus de ce sérotype mais également un virus d'un sérotype de picornavirus différent. Ainsi par exemple, un peptide de HRV d'un sérotype de HRV peut induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre un autre sérotype de HRV. Un peptide d'un picornavirus peut également induire une réponse de neutralisation croisée contre un autre picornavirus. La neutralisation croisée peut donc avoir lieu entre des virus ou entre des

sérotypes ou des souches du même virus. Une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs virus ou sérotypes comprend la réponse immunitaire contre le virus duquel l'antigène est
5 dérivé et une réponse immunitaire contre un autre virus ou sérotype. Une réponse immunitaire de neutralisation croisée peut comprendre la génération d'anticorps neutralisants qui peut être mesurée par un essai de neutralisation approprié en utilisant un virus ou un
10 pseudovirus pour évaluer une capacité de neutralisation des anticorps.

Les peptides de picornavirus décrits dans ce document peuvent être dits à réaction croisée ou à neutralisation croisée ou à protection croisée. Les
15 peptides à réaction croisée sont des peptides qui sont capables d'induire une réponse immunitaire contre des virus ou des sérotypes supplémentaires à celui dont est dérivé le peptide. Les peptides à neutralisation croisée sont des peptides qui sont capables d'induire
20 une réponse immunitaire de neutralisation croisée c'est-à-dire une réponse immunitaire qui neutralise le virus contre lequel la réponse a été induite et également contre un autre virus apparenté, par exemple, le même virus mais d'un sérotype différent ou un virus
25 différent de la même famille. Un peptide à protection croisée est un peptide qui induit une réponse immunitaire qui peut prévenir une infection ou une maladie provoquée par le virus contre lequel la réponse a été induite et également contre une infection ou une
30 maladie provoquée par un autre virus apparenté, par exemple d'un sérotype différent.

Protéines et peptides structuraux de HRV

La présente invention est centrée sur le besoin de disposer d'un vaccin contre un rhinovirus et concerne l'utilisation de protéines et peptides structuraux de rhinovirus qui peuvent stimuler une réponse immunitaire contre un certain nombre de sérotypes de HRV et donc conférer une protection contre une infection et une maladie à HRV.

Les protéines et peptides de rhinovirus utilisés dans l'invention peuvent être choisis parmi tous les sérotypes de HRV, par exemple HRV 1B, 2, 3, 8, 10, 14, 26, 29, 31, 39, 47, 61, 62, 63, 66, 77, 97, 100 ou d'autres sérotypes qui peuvent être non typés ou non typables. Les sérotypes présentant un intérêt particulier comprennent les sérotypes HRV 8, HRV 25 et HRV 100 de clade A, le sérotype HRV 14 de clade B et le sérotype HRV_C_026 de clade C. Les sérotypes HRV A et C sont associés aux maladies de la plus haute sévérité et donc, la présence de la combinaison d'une séquence de sérotype HRV A et d'une séquence de sérotype HRV C dans une composition décrite dans ce document est spécifiquement envisagée.

Plusieurs structures tridimensionnelles (3D) de capsides de HRV sont disponibles. Pour HRV 14, par exemple, une analyse très détaillée a été publiée par Arnold & Rossmann (1990). La capside a une organisation icosaédrique de symétrie pseudo $T = 3$. La surface du virus est définie par 12 pentons en forme d'étoile, l'un à chaque axe de symétrie d'ordre 5. Ils sont entourés par un sillon ou « canyon » de 20 ang. de

profondeur. On observe également 20 faces triangulaires, une sur chaque axe de symétrie d'ordre 3. Les structures en 3D de HRV 1A, HRV 2, HRV 3 et HRV 16 ont également été déterminées, parfois complexées avec des récepteurs ou des fragments d'anticorps.

Il a été démontré que la dynamique de capsid de HRV 14 ressemble à une « respiration » (Lewis et al 1998). La structure de la capsid semble osciller entre deux états structuraux différents, l'un observé dans les structures 3D dans lesquelles VP4 est profondément enfoui et l'autre dans lequel les terminaisons N de VP4 et VP1 sont accessibles aux protéases. Cela a été démontré également par l'accessibilité de différents fragments de capsid au cours du temps, par protéolyse et spectroscopie de masse (Lewis et al 1998). Cette « respiration » peut être bloquée par des composés antiviraux se liant dans une poche à l'arrière du canyon de la capsid.

Katpally et al (2009) ont montré que des anticorps dirigés contre une séquence consensus des 24 premiers résidus les plus probables du rhinovirus VP4 pouvaient neutraliser de façon croisée HRV 14 et 16 et qu'un peptide correspondant aux 30 premiers acides aminés de HRV 14 VP4 permettait de produire un antisérum qui neutralisait HRV 16 et HRV 29. Toutefois, les inventeurs n'ont pas trouvé qu'en fait, un peptide plus court était plus efficace.

Par conséquent, l'invention propose un peptide VP4 qui présente 20 acides aminés au plus à partir de la terminaison N de VP4, en particulier, les acides aminés 1 à 16 de VP4 et ses variantes.

Miao et al (2009) ont montré qu'un peptide conservé de la terminaison N d'autres entérovirus, spécifiquement, Polio 1 et Cox B3, est reconnu par des anticorps monoclonaux (MAb) générés contre des protéines de VP1 de pleine longueur, de différentes espèces d'entérovirus.

Un peptide conservé équivalent de HRV VP1 est également capable de générer une réponse en anticorps de neutralisation croisée contre différents sérotypes de HRV. Le peptide HRV VP1 provient de la région N-terminale de VP1, en particulier, des acides aminés 32 à 45 de VP1 et ses variantes. En effectuant un alignement de séquences de VP1 et VP4 de tous les picornavirus, on a également découvert de façon surprenante, qu'il existe des peptides similaires de HVR14 VP4 1-16 et HVR14 32-45. Ainsi, les picornavirus autres que le rhinovirus ont également potentiellement des peptides à neutralisation croisée équivalents à ceux de HVR14 VP4 1-16 et HVR14 32-45. Ces peptides de picornavirus sont un autre aspect de l'invention décrite dans ce document.

Tout au long de la description, les séquences de VP1 et VP4 de HRV 14 sont utilisées comme séquences de référence pour déterminer la région de laquelle proviennent les peptides VP1 et VP4 (Palmenberg et al 2010).

Les peptides de rhinovirus choisis sont capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre HRV. Cela signifie que lorsqu'ils sont présentés de façon appropriée, les peptides génèrent une réponse immunitaire, par exemple, une réponse en

anticorps, contre plusieurs sérotypes de HRV. Par conséquent, par exemple, la réponse immunitaire générée neutralise le sérotype de HRV duquel provient le peptide et au moins un autre sérotype de HRV. Par exemple, la réponse de neutralisation croisée peut neutraliser plus de 2 ou plus de 5 ou plus de 10 sérotypes de HRV différents. Dans un mode de réalisation, la réponse de neutralisation croisée neutralise plus de 2 ou plus de 5 ou plus de 10 sérotypes de HRV différents choisis parmi HRV 1B, 2, 3, 8, 10, 14, 26, 29, 31, 39, 47, 61, 62, 63, 66, 77, 97, 100.

De façon appropriée, on choisit le peptide de HRV qui présente un niveau élevé d'identité de séquence (« homologie ») entre les sérotypes de HRV, qui est supérieur à 80 % entre deux sérotypes (ou plus). Dans certains cas, le peptide de HRV a une identité de séquence entre les sérotypes supérieure à 85 %, ou une identité de séquence entre les sérotypes supérieure à 90 %, ou une identité de séquence entre les sérotypes supérieure à 95 %. L'identité de séquence peut également être évaluée en examinant le nombre de différences d'acides aminés, donc, par exemple, on peut choisir le peptide de HRV qui présente uniquement une ou uniquement deux différences d'acides aminés, ou uniquement une ou uniquement deux différences conservatives d'acides aminés ou aucune différence d'acides aminés entre deux sérotypes ou plus sur la longueur du peptide. Dans certains modes de réalisation, on choisit le peptide de HRV qui présente une identité de séquence de 100 % entre au moins deux

sérotypes de HRV, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différences d'acides aminés. Ces peptides de HRV peuvent être nommés dans ce document, séquences « consensus » de VP4 ou VP1.

5 Le peptide de HRV VP4 1-16 décrit dans ce document, de HRV 14 a une identité de séquence de 100 % avec ceux de clade B pour les sérotypes de clade B actuellement connus. Le peptide de HRV VP4 décrit dans ce document, de HRV 100(A-M) a une identité de séquence
10 de 100 % avec ceux de clade A pour les sérotypes de clade A actuellement connus.

Dans un mode de réalisation particulier, le peptide de HRV est une séquence consensus de clade A qui est identique (c'est-à-dire a une identité de
15 séquence de 100 %) entre 2 sérotypes de HRV ou plus choisis parmi les sérotypes de HRV énumérés sur la figure 8 ou la figure 11. Dans un autre mode de réalisation, le peptide de HRV est une séquence consensus de clade B qui est identique entre
20 2 sérotypes de HRV ou plus, choisis parmi les sérotypes de HRV énumérés sur la figure 9 ou la figure 12. Par exemple, dans un exemple de mode de réalisation spécifique, la séquence consensus est identique entre deux sérotypes ou plus de clade A ou de clade B
25 présentés sur les figures 8 et 11, au niveau des acides aminés 32 à 45 de VP1, ou entre deux sérotypes de clade A ou de clade B présentés sur les figures 9 et 12, au niveau des acides aminés 1 à 16 de VP4.

La numérotation commence à l'acide aminé 1 de la
30 terminaison N, la terminaison N étant ici du côté gauche d'une séquence et la terminaison C, du côté

droit. On comprendra évidemment que les peptides peuvent présenter des variabilités. Ainsi par exemple, les peptides peuvent être plus longs ou plus courts de un ou deux ou trois ou quatre acides aminés sur l'une
5 ou l'autre des extrémités, par rapport aux séquences de peptides spécifiques indiquées. Ainsi, par exemple, si l'on utilise un peptide VP4 1-16, il peut être possible d'utiliser un peptide 1 à 14 ou 1 à 15 ou 1 à 17 ou 1 à 18 ou 2 à 14 ou 2 à 15 ou 2 à 16 ou 2 à 17 ou 2 à 18,
10 par exemple, ou un peptide équivalent comportant une ou deux substitutions conservatives d'acides aminés, ou une ou deux délétions d'acides aminés, sans modifier les propriétés immunologiques du peptide ou sans éliminer l'épitope. Un peptide VP4 tel que décrit dans
15 ce document, peut commencer par exemple à l'acide aminé 1, 2, 3 ou 4 et se terminer par exemple à l'acide aminé 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20. De même, pour le peptide VP1 32-45, il peut être possible d'utiliser un peptide plus long contenant les acides aminés 32 à 45, par
20 exemple, 32 à 43 ou 32 à 44 ou 32 à 46 ou 32 à 47 ou 30 à 45 ou 31 à 45 ou 33 à 45 ou 34 à 44 ou un peptide équivalent comportant une ou deux substitutions conservatives d'acides aminés, ou une ou deux délétions d'acides aminés, sans modifier les propriétés
25 immunologiques du peptide ou sans éliminer l'épitope. Un peptide VP1 tel que décrit dans ce document peut commencer par exemple à l'acide aminé 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 et se terminer par exemple à l'acide aminé 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47,
30 48, 49 ou 50, en utilisant ces nombres comme pour HRV14. On comprendra que cette variabilité entre dans

le cadre des peptides décrits dans ce document et que les peptides spécifiques décrits dans ce document sont donnés à titre d'exemple et ne sont pas restrictifs pour ce qui concerne les peptides qui sont capables de
5 conférer une réponse immunitaire de neutralisation croisée telle que décrite dans ce document.

Les peptides HRV VP4 et VP1 à réaction croisée qui sont capables d'induire une réponse immunitaire contre d'autres sérotypes de HRV peuvent être identifiés selon
10 la présente description. Comme on le montre dans ce document, les séquences de HRV de différents sérotypes de HRV peuvent être alignées pour identifier des régions présentant une similitude élevée entre les sérotypes de HRV. De nombreux programmes de séquences
15 sont disponibles pour réaliser ces alignements et identifier l'endroit où se trouve une homologie de séquence. Ceci peut permettre la sélection de peptides HRV VP4 et VP1 qui sont les plus similaires entre les sérotypes de HRV d'intérêt et peuvent donc
20 potentiellement réagir de façon croisée entre certains ou tous les sérotypes de HRV.

De façon appropriée, le peptide ou les peptides de HRV VP4 ou VP1 sont des peptides pouvant réagir de façon croisée, de sorte qu'ils peuvent induire une
25 réponse immunitaire qui reconnaît non seulement les VP4 ou VP1 du sérotype de HRV duquel le peptide VP4 ou VP1 est dérivé mais également un peptide ou une protéine VP4 ou VP1 d'un sérotype de HRV autre que celui duquel il est dérivé. De façon appropriée, le peptide réagit
30 de façon croisée avec 1 ou 2 autres sérotypes ou plus, dans le même clade ou un clade différent. De façon

appropriée, le peptide ou les peptides de HRV VP4 ou VP1 utilisés dans l'invention sont capables de générer une réponse immunitaire de neutralisation croisée qui est une réponse immunitaire qui est capable de neutraliser HRV d'un sérotype de HRV différent du sérotype de HRV duquel le peptide VP4 ou VP1 est dérivé, dans le même clade ou un clade différent. Une neutralisation croisée peut être testée en utilisant des essais bien connus dans l'art tels que l'essai décrit par Katpally et al (2009) ou par Phillips et al (2011) ou l'essai décrit dans ce document à l'exemple 1 qui est adapté de ces essais publiés.

De façon appropriée, le peptide VP4 ou VP1 peut conférer une protection croisée et comprend de façon appropriée, un épitope de neutralisation croisée.

Une protection croisée se produit de façon appropriée lorsqu'un peptide VP4 ou VP1 est capable de générer une réponse immunitaire protectrice contre une infection/maladie provoquée par au moins deux sérotypes de HRV. Une protection croisée peut se produire lorsqu'un peptide consensus VP4 ou VP1 est choisi et présenté dans le contexte d'une protéine vectrice telle que CRM197 ou en tant que construction chimérique dans laquelle le peptide est inséré dans un polypeptide, par exemple, un polypeptide de HBsAg ou HPV ou HRV qui forme une particule telle qu'une particule de type viral.

Une protection croisée peut être évaluée en comparant l'incidence d'une infection et/ou d'une maladie pour un groupe de sérotypes de HRV chez des individus vaccinés avec un peptide HRV VP4 ou VP1 donné

ou une combinaison de ceux-ci, à un groupe non vacciné. Une protection croisée complète contre un sérotype ou un groupe de sérotypes, n'est pas nécessaire selon la présente description ; en effet, tout niveau de protection croisée procure un bénéfice. De façon appropriée, le niveau de protection croisée observé est tel que le groupe vacciné présente 5 % de moins d'infection et/ou de maladie associée à un sérotype ou des sérotypes de HRV non vaccinaux, par rapport à un groupe comparable non vacciné, de manière davantage appropriée, jusqu'à 10 %, jusqu'à 15 %, jusqu'à 20 %, jusqu'à 25 %, jusqu'à 30 %, jusqu'à 35 %, jusqu'à 40 %, jusqu'à 45 %, jusqu'à 50 %, jusqu'à 55 %, jusqu'à 60 %, jusqu'à 65 %, jusqu'à 70 %, jusqu'à 80 %, jusqu'à 90 % ou même jusqu'à 100 % de moins d'infection et/ou de maladie.

Les peptides et constructions de HRV VP1 et VP4 les contenant peuvent être testés pour déterminer l'immunogénicité, la réactivité croisée et la neutralisation croisée, par des techniques standard bien connues dans l'art. Par exemple, les peptides peuvent être injectés dans des modèles animaux ou humains et une mesure des réponses en anticorps et/ou réponses immunitaires cellulaires peut être réalisée, par exemple par ELISA ou une analyse/mesure des cytokines, respectivement. Les procédés de criblage d'anticorps sont bien connus dans l'art. Un essai ELISA peut être utilisé pour évaluer la réactivité croisée des anticorps. Les anticorps peuvent être testés pour déterminer les propriétés de neutralisation et de

neutralisation croisée en utilisant un essai tel que décrit dans ce document à l'exemple 1.

Une protection croisée contre différents sérotypes de HRV différents de celui duquel le peptide VP4 ou VP1
5 est dérivé, peut être identifiée en utilisant un modèle animal, par exemple, un modèle de souris (Bartlett et al2008).

Les peptides de picornavirus tels que les peptides de rhinovirus VP1 et VP4 peuvent être synthétisés
10 chimiquement par des techniques standard ou produits de façon recombinante. Les peptides peuvent se présenter sous la forme de peptides individuels ou de concatamères de peptides liés en séries, par exemple de 2 ou 3 ou 4 ou 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 ou 10 peptides ou
15 plus.

Protéines vectrices pour peptides de picornavirus

Les peptides de picornavirus décrits dans ce document tels que les peptides HRV peuvent être couplés
20 à une protéine vectrice. Le couplage peut s'effectuer par tout moyen approprié, par exemple par l'expression sous forme d'une construction avec la protéine vectrice ou par couplage chimique ou conjugaison du peptide avec la protéine vectrice en utilisant une étape de
25 conjugaison chimique. Les protéines vectrices comprennent CRM197 qui est bien connu. Les protéines vectrices comprennent également KLH qui peut être utilisé dans une composition immunogène pour un animal mais non pour l'utilisation humaine.

30 CRM197 est une forme non toxique de toxine diphtérique mais on ne peut pas la distinguer d'un

point de vue immunologique de la toxine diphtérique. CRM197 est produit par *C. diphtheriae* infecté par la phase non toxigène β 197tox créée par mutagenèse par nitrosoguanidine du corynéphage b (Uchida et al. Nature
5 New Biology (1971) 233 ; 8-11). La protéine CRM197 a le même poids moléculaire que la toxine diphtérique mais diffère de celle-ci par un changement de base unique dans le gène structural. Ceci entraîne un changement d'acide aminé d'une glycine en une glutamine en
10 position 52, ce qui rend le fragment A incapable de se lier à NAD et donc, non toxique (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem. 46 ; 69-94, Rappuoli Applied et Environmental Microbiology Sept 1983 p. 560-564).

La conjugaison de peptides à une protéine vectrice
15 peut être réalisée par de nombreux moyens chimiques différents, bien connus. Les exemples de procédés chimiques comprennent la conjugaison de groupes amino entre le peptide et le véhicule par des réactifs amino-réactifs tels que le glutaraldéhyde ou un réactif
20 d'ester de bis-succinimidyle (DSG - disuccinimidylglutarate ou DSS - disuccinimidylsubérate (Greg T. Hermanson. Bioconjugate techniques. Academic Press. 1996, 218-220 et 194-196) ; ou par condensation de groupes carboxyle et de groupes amino avec des réactifs
25 de carbodiimide (Greg T. Hermanson. Bioconjugate techniques. Academic Press. 1996, 171-173). Il est également possible d'utiliser une liaison thio-éther pour conjuguer des peptides à des protéines vectrices. On peut y parvenir par exemple en ajoutant une fraction
30 comportant un groupe thiol terminal sur le peptide, par exemple en ajoutant une cystéine, puis en faisant

réagir le groupe thiol réactif avec une protéine vectrice dérivatisée de maléimide (voir Greg T. Hermanson. Bioconjugate techniques. Academic Press. 1996). Un autre procédé consiste à coupler un véhicule thiolé avec un groupe sulfhydryle sur le peptide pour former un pont disulfure. Les peptides peuvent également être synthétisés avec un groupe halogénoalkyle supplémentaire tel qu'un groupe iodoalkyle ou bromoalkyle. De façon appropriée, le groupe bromoalkyle est un groupe bromoacétyle. L'utilisation de groupes bromoacétyle pour lier les peptides à des véhicules est décrite dans la littérature (Ivanov et al., 1995, Bioconjugatechemistry, 6, 269-277).

L'amination réductrice peut également être utilisée pour conjuguer une molécule contenant un aldéhyde avec une molécule contenant une amine. Les peptides peuvent également être synthétisés avec un groupe hydrazide supplémentaire. Des macromolécules contenant un aldéhyde peuvent également réagir spontanément avec des composés hydrazide pour former des liaisons hydrazone. Les hydrazides sont des nucléophiles plus puissants et réagissent plus facilement avec les aldéhydes que les amines primaires. La liaison hydrazone est une forme de base de Schiff qui est plus stable que celle formée par l'interaction d'un aldéhyde et d'une amine. Par conséquent, une conjugaison spécifique peut être obtenue par amination réductrice en utilisant des peptides ayant un hydrazide supplémentaire (Shannessy D.J. et Wilcheck. 1990. Analytical Biochemistry 191 : 1-8).

Dans un mode de réalisation, les peptides sont couplés à CRM197 selon des techniques de conjugaison chimiques bien connues, voir par exemple, Mattson et al, MolBiol Reports, 17, 167-183, 1993. Dans un mode de réalisation, CRM197 est purifié à partir de Corynebacterium et la fermentation de CRM197 est réamisée comme on le décrit dans le document WO 2006/100108. Dans un mode de réalisation, le procédé de purification comprend trois étapes chromatographiques (Q-sepharose-XL, hydroxyapatite type I et Octyl-Sepharose) et une étape d'ultrafiltration. La chimie du maléimide peut être utilisée pour conjuguer des peptides ayant une cystéine au niveau N ou C-terminal.

15

Polypeptides chimériques comprenant des peptides de picornavirus

Comme autre moyen de présentation des peptides de picornavirus, on peut utiliser une construction de polypeptide chimérique. Avantageusement, la construction de polypeptide chimérique forme des particules telles que des capsomères ou des particules de type viral (VLP) ou de petites structures de type non VLP.

25

Dans un autre mode de réalisation de l'invention est proposée une construction de polypeptide chimérique comprenant un polypeptide qui forme des particules et un peptide comprenant un épitope d'un polypeptide structural de picornavirus tel qu'un peptide structural de rhinovirus, par exemple de VP1 ou VP4. Les

30

particules peuvent être des capsomères ou des VLP ou de petites structures de type non VLP.

Un exemple de polypeptide qui peut être utilisé dans une construction de polypeptide chimérique avec un peptide de picornavirus tel qu'un peptide ou des peptides de HRV, est un polypeptide d'antigène de surface de l'hépatite B. HBsAg est utilisé depuis les années 1980 comme base de vaccin contre l'hépatite B. HBsAg est également utilisé dans un vaccin candidat contre le paludisme connu sous le nom de RTS,S, qui comprend des polypeptides chimériques de HbsAg ayant un prolongement de 226 acides aminés de la protéine S du virus de l'hépatite B (sérotypage adw) fusionné via sa terminaison N-terminale à un fragment de la protéine circumsporozoïte (CSP) de *P. falciparum*, via quatre acides aminés, Pro, Val, Thr, Asn, représentant les quatre résidus carboxy-terminaux de la protéine preS2 du virus de l'hépatite B (sérotypage adw). RTS,S est décrit dans le document WO 93/10152. Le polypeptide chimérique est exprimé dans une souche de levure qui porte déjà dans son génome, plusieurs copies d'une cassette d'expression de l'antigène de surface de l'hépatite B. La souche obtenue synthétise deux polypeptides, S et RTS, qui se co-assemblent spontanément en particules de lipoprotéine mixtes (RTS, S) qui présentent les séquences de CSP sur leur surface.

Avantageusement, la chimère de peptide de picornavirus/polypeptide de HBsAg forme une particule qui ressemble à une particule HBsAg. Dans un mode de réalisation particulier, le polypeptide de l'antigène S est un segment contigu de 226 acides aminés, spécifiant

la protéine S du virus de l'hépatite B (sérotyp adw). La chimère du peptide de picornavirus/polypeptide HBsAg est construite avantageusement de façon à former spontanément des particules. Les particules peuvent
5 être des particules mixtes comprenant un polypeptide de HBsAg non chimérique conjointement à un peptide de picornavirus/polypeptide de HBsAg chimérique. Les sites appropriés pour l'insertion des peptides de picornavirus tels que le peptide ou les peptides de HRV
10 comprennent la boucle « a », la terminaison N et la terminaison C de HBsAg. Les peptides qui peuvent être inclus dans un HBsAg chimérique comprennent l'un quelconque des peptides décrits ici, comprenant les peptides VP4 tels que les peptides 1 à 16 et les
15 peptides VP1 tels que 32 à 45 et de variantes de l'un ou l'autre ou des deux et d'autres peptides de protéines structurales de picornavirus comprenant VP4 et VP1, tels que les peptides de rhinovirus VP4 et VP1. Dans un mode de réalisation particulier, le peptide
20 dans la construction du polypeptide chimérique contient un épitope neutralisant. Les peptides de HRV contenant un épitope neutralisant peuvent être trouvés dans la littérature et comprennent 1-31 de VP4 (Katpally et al 2009) et 147-162 de HRV14 VP1 (Edlmayret al 2011).

25 Dans le cas de particules de type viral de HPV, il existe des particules de type viral de HPV 16 ou HPV 18 appropriées. La protéine L1 de HPV s'auto-assemble dans des particules de type viral qui ressemblent habituellement aux virus de HPV observés au microscope
30 électronique. Habituellement, elles sont constituées de 72 capsomères qui sont eux-mêmes constitués de

5 polypeptides L1 dans une unité pentamère. De façon appropriée, la protéine L1 est une protéine L1 tronquée capable de s'auto-assembler, par exemple dans des capsomères de VLP. De façon appropriée, L1 est tronquée
5 pour éliminer un signal de localisation nucléaire. De façon appropriée, la troncature est une troncature C-terminale. De façon appropriée, la troncature C-terminale retire moins de 50 acides aminés, par exemple, moins de 40 acides aminés. Dans un mode de réalisation
10 particulier, la troncature C-terminale retire 34 acides aminés de HPV 16 et 35 acides aminés de HPV 18.

L'emplacement du peptide ou des peptides de picornavirus/HRV dans un polypeptide de HPV L1 chimérique décrit dans ce document est important. Un
15 emplacement du peptide de picornavirus est un emplacement des boucles exposées ou le bras entrant dans la terminaison C de la protéine L1. Les boucles et le bras entrant sont trouvés lorsque L1 est sous la forme de capsomères ou de particules de type viral
20 (Chen et al 2000).

Dans l'un quelconque des modes de réalisation décrits dans ce document, le peptide HRV peut être situé sur une position choisie parmi les régions suivantes de la séquence L1, les emplacements
25 correspondants à la séquence de référence de HPV 16 et HPV 18 L1 ou à une position équivalente dans une autre séquence de HPV L1 :

- (i) boucle BC dans les acides aminés 50 à 61
- (ii) boucle DE dans les acides aminés 132 à 142,
30 par exemple, les acides aminés 132 à 141, en particulier, les acides aminés 137 à 138

(iii) boucle EF dans les acides aminés 172 à 182, par exemple 176 à 182, en particulier 176 à 179

(iv) boucle FG dans les acides aminés 271 à 290, par exemple 272 à 275, en particulier 272 à 273

5 (v) boucle HI dans les acides aminés 345-359, par exemple 347 à 350, en particulier 349 à 350

(vi) bras de la terminaison C dans les acides aminés 429 à 445, par exemple 423 à 440, en particulier, 423 à 424, 431 à 433 ou 437 à 438 pour HPV
10 16, et 424 à 425, 432 à 433 ou 439 à 440 pour HPV 18.

Dans un mode de réalisation décrit dans ce document, le peptide de picornavirus peut être inséré dans la séquence polypeptidique sans retirer les acides aminés du polypeptide. En variante, le peptide de
15 picornavirus peut être inséré dans la séquence polypeptidique avec le retrait d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence polypeptidique sur la position d'insertion, par exemple 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 acides aminés
20 de la séquence polypeptidique peuvent être retirés sur le site où le peptide est inséré. Par conséquent, le peptide de picornavirus peut remplacer un ou plusieurs acides aminés dans la séquence polypeptidique, par exemple, le peptide de picornavirus peut remplacer une
25 séquence polypeptidique de longueur équivalente à celle de la séquence du peptide du picornavirus.

Lorsque deux ou plusieurs peptides de picornavirus sont présents dans une construction chimérique de peptide de picornavirus/polypeptide, il peut s'agir de
30 différents peptides de picornavirus du même picornavirus ou de peptides du même picornavirus mais

de sérotypes différents, auquel cas ils peuvent provenir d'une région correspondante dans les différents picornavirus ou de différentes régions dans les différents picornavirus. Par exemple, lorsque des
5 peptides de HRV sont présents dans une construction chimérique de peptide de HRV peptide/polypeptide, ils peuvent être des peptides de HRV différents du même sérotype de HRV ou ils peuvent être des peptides de différents sérotypes de HRV, auquel cas, ils peuvent
10 provenir de la région correspondante dans les différents sérotypes de HRV ou de différentes régions des différents sérotypes de HRV.

Dans un mode de réalisation, le peptide de picornavirus tel qu'un peptide de HRV est inséré sur un
15 site qui permet l'assemblage d'un ensemble supramoléculaire de polypeptides chimériques, par exemple dans des particules de polypeptide telles que de particules de type viral (VLP) ou des capsomères ou de petites structures de type non VLP. Par exemple,
20 dans le cas de particules chimériques de HPV, pour conserver la structure de VLP, le peptide de picornavirus est inséré dans le polypeptide L1 sur un site qui n'interfère pas avec les sites impliqués dans la formation de ponts disulfure qui sont impliqués dans
25 la conservation d'interactions inter-capsomères et donc, la conformation de VLP. Habituellement, les VLP chimériques sont de taille similaire ou identique par rapport aux VLP natives c'est-à-dire, dans le cas de HPV, les VLP chimériques sont de taille similaire ou
30 identique par rapport aux VLP dans lesquelles la protéine L1 est de pleine longueur ou tronquée mais ne

contient pas de peptide de picornavirus. Les HPV VLP chimériques peuvent être de l'ordre de 50 nm de diamètre. Dans d'autres modes de réalisation, de petites structures non VLP entre 20 et 35 nm sont
5 formées.

Dans un mode de réalisation comprenant deux peptides de picornavirus ou plus dans un polypeptide, les peptides de picornavirus peuvent être insérés dans des sites identiques ou différents dans la séquence
10 polypeptidique. Lorsque des peptides de picornavirus sont insérés sur le même site, cela peut s'effectuer dans la même boucle et dans la même région hypervariable de la même boucle. Il peut être avantageux d'avoir un court prolongement d'acides
15 aminés entre les peptides de picornavirus, par exemple 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 acides aminés entre les peptides de picornavirus.

Eventuellement, un segment d'espacement d'un ou plusieurs acides aminés tel que des résidus de glycine
20 peut également être inclus dans la terminaison N ou C du peptide de picornavirus. Par exemple, les peptides peuvent comprendre en outre un ou deux ou trois acides aminés d'espacement ajoutés à la terminaison amino ou carboxy (ou entre les peptides liés dans lesquels deux
25 peptides de picornavirus ou plus sont présents). Généralement, le segment d'espacement n'aura pas d'activité biologique spécifique autre que celle de joindre le peptide immunogène à la séquence polypeptidique ou de conserver une distance minimale ou
30 une autre relation spatiale entre eux. Un segment d'espacement peut être nécessaire ou utile pour

conserver la conformation correcte de la particule de polypeptide et/ou une présentation efficace ou améliorée du peptide de picornavirus inséré par rapport à l'absence d'un segment d'espacement.

5 L'un quelconque des peptides de picornavirus peut être modifié, par exemple, par l'insertion (addition), délétion ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés. Par exemple, les peptides de HRV peuvent incorporer des acides aminés qui diffèrent de la
10 séquence HRV de la séquence native (c'est-à-dire existant à l'état naturel) de HRV VP4 ou VP1. Par exemple, les peptides peuvent avoir une ou deux insertions ou substitutions d'acides aminés dans la séquence, ou une délétion d'un ou deux ou de plusieurs
15 acides aminés, par exemple 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou jusqu'à 10 acides aminés par rapport à la séquence native, par exemple pour éliminer l'occurrence d'un pont disulfure entre deux cystéines et/ou la région entre les cystéines. Dans des exemples spécifiques, les
20 modifications présentes dans les peptides de HRV de la présente description, en relation avec une séquence de HRV native sont limitées à 1 ou 2 insertions, délétions ou substitutions d'acides aminés, et/ou une délétion allant jusqu'à 10 acides aminés contigus entre deux
25 résidus de cystéine.

Lorsque des modifications de la séquence de HRV sont effectuées dans les peptides décrits dans ce document, ces modifications peuvent être limitées de sorte qu'une proportion substantielle d'au moins 50 %
30 ou d'au moins 70 % ou d'au moins 90 % ou d'au moins

95 % des acides aminés dans le peptide corresponde aux acides aminés dans la séquence native HRV VP4 ou VP1.

En variante ou de plus, tout peptide de HRV particulier peut être une chimère de deux ou trois
5 peptides de HRV ou plus comme on le décrit dans ce document. Dans le cas de l'une quelconque de ces modifications de la séquence de HRV, le caractère immunogène de la séquence de HRV est conservé. Cela signifie que l'épitope ou les épitopes de HRV dans le
10 peptide qui induit la réponse immunitaire souhaitée sont conservés. L'objet des modifications peut être d'améliorer les propriétés du peptide de HRV, par exemple d'améliorer la réactivité croisée avec des protéines structurales d'autres sérotypes de HRV.

15 Acides nucléiques codant pour des peptides de RVH, construction les contenant et procédés de production de polypeptides chimériques

Un autre aspect de la présente description concerne des molécules d'acide nucléique qui codent
20 pour l'un quelconque des peptides mentionnés précédemment et les polypeptides chimériques contenant les peptides des peptides structuraux de HRV.

Dans certains modes de réalisation, les acides nucléiques recombinants qui codent pour les peptides ou
25 les polypeptides chimériques sont optimisés par un codon pour leur expression dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote choisie.

Pour faciliter la répllication et l'expression, les acides nucléiques qui codent pour les peptides ou les
30 polypeptides chimériques peuvent être incorporés dans

un vecteur tel qu'un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote.

Les peptides et polypeptides chimériques décrits ici peuvent être produits en utilisant des procédures bien établies pour l'expression et la purification de protéines recombinantes. Des procédures suffisantes pour orienter l'homme du métier peuvent être trouvées dans les références suivantes : Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200 ; et Ausubel *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^{ème} éd., John Wiley & Sons, Inc., 999. Des détails supplémentaires et spécifiques sont proposés ci-dessous.

Les cellules hôtes qui comprennent les acides nucléiques codant pour le peptide ou le polypeptide chimérique constituent donc également un aspect de la présente description. Les cellules hôtes appropriées comprennent les cellules hôtes procaryotes (c'est-à-dire bactériennes) telles que *E. coli*, ainsi que de nombreuses cellules hôtes eucaryotes comprenant des champignons (par exemple, une levure telle que *Saccharomyces cerevisiae* et *Picchia pastoris*), des cellules d'insectes, des cellules de plante et des cellules de mammifères (telles que les cellules CHO et HEK293). Les acides nucléiques recombinants qui codent pour les peptides ou les polypeptides chimériques sont introduits (par exemple, transduits, transformés ou transfectés) dans des cellules hôtes, par exemple, via un vecteur tel qu'un vecteur d'expression. Le vecteur peut être un plasmide, une particule virale, un phage, un baculovirus, etc. Les exemples d'hôtes d'expression

appropriés comprennent : des cellules bactériennes telles que *E. coli*, *Streptomyces*, et *Salmonella typhimurium* ; des cellules de champignons tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichiapastoris*, et
5 *Neurosporacrassa* ; des cellules d'insecte telles que *Trichoplusia*, *Drosophila*, *Spodopterafrugiperda* ; des cellules de mammifère telles que 3T3, COS, CHO, BHK, HEK 293 ou de mélanome de Bowes ; des cellules de plantes comprenant des cellules d'algues, etc.

10 Les cellules hôtes peuvent être cultivées dans des milieux nutritifs classiques modifiés si appropriés pour activer des promoteurs, sélectionner des transformants ou amplifier les séquences polynucléotidiques insérées. Les conditions de culture
15 telles que la température, le pH et autres, sont celles qui sont utilisées précédemment avec la cellule hôte choisie pour l'expression et apparaîtront à l'homme du métier et dans les références citées dans ce document, comprenant par exemple, Freshney (1994) *Culture of*
20 *Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, troisième édition, Wiley- Liss, New York et les références citées dans ce document. En plus de l'ouvrage de Sambrook, Berger et Ausubel, des détails relatifs à la culture cellulaire peuvent être trouvés dans les ouvrages de
25 Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY ; Gamborg and Phillips (éd.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* ; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) et
30 Atlas and Parks (éd.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Compositions immunogènes et procédés

Un autre aspect de la présente description concerne des compositions immunogènes qui contiennent
5 des peptides de picornavirus ou des constructions de polypeptides chimériques les contenant, tels que des polypeptides qui forment des particules telles que des VLP ou des particules subvirales telles que des capsomères. Les compositions immunogènes décrites ici
10 comprennent habituellement au moins un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement, un adjuvant. Les véhicules et excipients pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et peuvent être choisis par l'homme du métier.
15 Par exemple, le véhicule ou l'excipient peut comprendre favorablement un tampon. Eventuellement, le véhicule ou excipient peut contenir également au moins un composant qui stabilise la solubilité et/ou favorise la stabilité. Les exemples d'agents de solubilisation/ stabilisation
20 comprennent des détergents, par exemple, la lauryl-sarcosine et/ou le tween. D'autres agents de solubilisation/stabilisation comprennent l'arginine et des polyols vitrifiants (tels que le saccharose, le tréhalose et autres). De nombreux véhicules
25 pharmaceutiquement acceptables et/ou excipients pharmaceutiquement acceptables sont connus dans l'art et sont décrits par exemple dans *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5^{ème} édition (1975).
30 En conséquence, les excipients et véhicules appropriés peuvent être choisis par l'homme du métier

pour produire une formulation appropriée pour la distribution à un sujet par une voie d'administration choisie. Les excipients appropriés comprennent, de manière non restrictive : le glycérol, le polyéthylène glycol (PEG), le sorbitol, le tréhalose, le sel de N-lauroylsarcosine sodium, la L-proline, la sulfobétaïne non détergente, le chlorure de guanidine, l'urée, l'oxyde de triméthylamine, le KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ et autres sels apparentés à cations divalents, le dithiothréitol, le dithioérytrol et le β-mercaptoéthanol. D'autres excipients peuvent être des détergents (comprenant : le Tween 80, le Tween 20, le Triton X-00, le NP-40, l'Empigen BB, l'octylglucoside, le lauroylmaltoside, le Zwittergent 3-08, le Zwittergent 3-0, le Zwittergent 3-2, le Zwittergent 3-4, le Zwittergent 3-6, le CHAPS, le désoxycholate de sodium, le dodécylsulfate de sodium, le bromure de cétyltriméthyl-ammonium).

Eventuellement, les compositions immunogènes comprennent également un adjuvant. L'adjuvant est choisi de façon à être inoffensif et bien toléré dans la population cible. Par exemple, dans le cas d'un adjuvant choisi pour sa sécurité et son efficacité chez de jeunes enfants, on peut choisir une dose d'adjuvant qui est une dilution (par exemple, une dose fractionnée) d'une dose habituellement administrée à un sujet adulte.

Un adjuvant approprié est un dérivé de lipopolysaccharide bactérien non toxique. Un exemple de dérivé non toxique approprié de lipide A, est le lipide A monophosphoryle ou plus particulièrement le lipide A monophosphoryle 3-désacylé (3D-MPL). Le 3D-MPL est

commercialisé sous le nom de MPL par GlaxoSmithKline Biologicals N.A., et est nommé tout au long de ce document, MPL ou 3D-MPL. Voir par exemple, les brevets US n° 4 436 727 ; 4 877 611 ; 4 866 034 et 4 912 094.

5 Le 3D-MPL favorise principalement les réponses en lymphocytes T CD4+ avec un phénotype d'IFN- γ (Th1). Le 3D-MPL peut être produit selon les procédés décrits dans le document GB2220211 A. Chimiquement, il s'agit d'un mélange de lipide A monophosphoryle 3-désacylé

10 comportant 3, 4, 5 ou 6 chaînes acylées. Dans les compositions de la présente invention, de petites particules de 3D-MPL peuvent être utilisées. Le 3D-MPL à petites particules a une taille de particules telle qu'il peut être filtré de façon stérile dans un filtre

15 de 0,22 μm . Ces préparations sont décrites dans le document WO94/21292.

Un lipopolysaccharide, tel que le 3D-MPL, peut être utilisé en quantités entre 1 et 50 μg , par dose humaine de la composition immunogène. Le 3D-MPL peut

20 être utilisé à un niveau d'environ 25 μg , par exemple entre 20 et 30 μg , de façon appropriée, entre 21 et 29 μg ou entre 22 et 28 μg ou entre 23 et 27 μg ou entre 24 et 26 μg ou 25 μg . Dans un autre mode de réalisation, la dose humaine de la composition

25 immunogène comprend le 3D-MPL à un niveau d'environ 10 μg , par exemple entre 5 et 15 μg , de façon appropriée, entre 6 et 14 μg , par exemple entre 7 et 13 μg ou entre 8 et 12 μg ou entre 9 et 11 μg , ou 10 μg . Dans un autre mode de réalisation, la dose humaine de

30 la composition immunogène comprend le 3D-MPL à un niveau d'environ 5 μg , par exemple entre 1 et 9 μg ou

entre 2 et 8 µg ou de façon appropriée, entre 3 et 7 µg ou 4 et µg, ou 5 µg.

Dans d'autres modes de réalisation, le lipopolysaccharide peut être un disaccharide de β(1-6) glucosamine tel que décrit dans le brevet US n° 6 005 099 et le brevet EP n° 0 729 473 B1. L'homme du métier pourra produire facilement divers lipopolysaccharides, tels que le 3D-MPL, sur la base des enseignements figurant dans ces références.

10 Néanmoins, chacune de ces références est incorporée dans la présente demande. En plus des immunostimulants mentionnés précédemment (qui sont de structure similaire à celle des LPS ou MPL ou 3D-MPL), les dérivés de monosaccharide et disaccharide acylés qui

15 sont une sous-partie de la structure de MPL ci-dessus sont également des adjuvants appropriés. Dans d'autres modes de réalisation, l'adjuvant est un dérivé synthétique de lipide A, dont certains sont décrits comme des antagonistes de TLR-4 et comprennent, de

20 manière non restrictive : l'OM174 (2-désoxy-6-o-[2-désoxy-2-[(R)-3-dodécanoyloxytétra-décanoylamino]-4-o-phosphono-β-D-glucopyranosyl]-2-[(R)-3-hydroxytétra-décanoylamino]-α-D-glucopyranosyldihydrogénophosphate), (WO 95/14026) ; l'OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hydroxytétradécanoylamino]décane-1,10-diol,1,10-

25 bis(dihydrogénophosphate) (WO 99/64301 et WO 00/0462) ; et l'OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-dodécanoyloxytétradécanoylamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-

30 hydroxytétradécanoylamino]dècan-1,10-diol,1-dihydrogèno phosphate 10-(6-aminohexanoate) (WO 01/46127).

D'autres ligands de TLR4 qui peuvent être utilisés sont les phosphates d'alkyl-glucosaminide (AGP) tels que ceux décrits dans le document WO 98/50399 ou le brevet US n° 6 303 347 (des procédés de préparation des AGP sont également décrits), de façon appropriée RC527 ou RC529 ou des sels d'AGP pharmaceutiquement acceptables décrits dans le brevet US n° 6 764 840. Certains AGP sont des agonistes de TLR4 et d'autres sont des antagonistes de TLR4. Tous deux sont censés être des adjuvants utiles.

D'autres ligands de TLR-4 appropriés, capables d'entraîner une réponse de signalisation par TLR-4 (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5) sont par exemple, le lipopolysaccharide de bactérie à gram négatif et ses dérivés ou fragments, en particulier, un dérivé non toxique de LPS (tel que le 3D-MPL). D'autres agonistes de TLR appropriés sont : les protéines de choc thermique (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ou 90 ; la protéine A tensioactive, les oligosaccharides de hyaluronane, les fragments de sulfate d'héparane, les fragments de fibronectine, les peptides de fibrinogène et de b-défensine-2, et le dipeptide de muramyle (MDP). Dans un mode de réalisation, l'agoniste de TLR est le HSP 60, 70 ou 90. D'autres ligands de TLR-4 appropriés sont tels que décrits dans les documents WO 2003/011223 et WO 2003/099195, tels que le composé I, le composé II et le composé III décrits en pages 4 et 5 du document WO 2003/011223 ou en pages 3 et 4 du document WO 2003/099195 et en particulier, les composés décrits dans le document WO 2003/011223 sous les noms de ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057,

ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 et ER804764. Par exemple, un ligand de TLR-4 approprié est le ER804057.

Des agonistes de TLR supplémentaires sont également utiles comme adjuvants. L'expression
5 « agoniste de TLR » désigne un agent qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par une voie de signalisation TLR, soit comme ligand direct, soit indirectement par la génération d'un ligand endogène ou exogène. Ces agonistes de TLR naturels ou synthétiques
10 peuvent être utilisés comme adjuvants alternatifs ou supplémentaires. Un bref examen du rôle des TLR comme récepteurs d'adjuvant est proposé par Kaisho & Akira, dans *Biochimica et Biophysica Acta* 1589 : 1-13, 2002. Ces adjuvants potentiels comprennent, de manière non
15 restrictive, des agonistes de TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9. En conséquence, dans un mode de réalisation, l'adjuvant et la composition immunogène comprennent en outre un adjuvant qui est choisi dans le groupe comprenant : un agoniste de TLR-1, un agoniste de TLR-
20 2, un agoniste de TLR-3, un agoniste de TLR-4, un agoniste de TLR-5, un agoniste de TLR-6, un agoniste de TLR-7, un agoniste de TLR-8, un agoniste de TLR-9 ou une combinaison de ceux-ci.

Dans un mode de réalisation de la présente
25 invention, on utilise un agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-1. De façon appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-1 est choisi parmi : les lipopeptides tri-
30 acylés (LP) ; la moduline phénol-soluble ; *Mycobacterium tuberculosis* LP ; le trichlorhydrate de

S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH (Pam3Cys) LP qui imite la terminaison amino acétylée d'une lipoprotéine bactérienne et l'OspA LP de *Borrelia burgdorferi*.

5 Dans un autre mode de réalisation, on utilise un agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-2. De façon appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-2 est l'un
10 ou plusieurs des composés parmi une lipoprotéine, un peptidoglycane, un lipopeptide bactérien de *M. tuberculosis*, de *B. burgdorferi* ou de *T. pallidum* ; des peptidoglycane provenant d'espèces comprenant *Staphylococcus aureus* ; des acides lipotéichoïques, des
15 acides mannuroniques, des porines de *Neisseria*, des fimbriae bactériennes, des facteurs de virulence de *Yersinia*, des virions de CMV, l'hémagglutinine du virus de la rougeole et du zymosane de levure.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise un
20 agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-3. De façon appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-3 est un ARN à brin double (ARNdb) ou un acide polyinosinique-
25 polycytidylique (Poly IC), une configuration d'acide nucléique moléculaire associée à une infection virale.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise un
agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-5. De façon
30 appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une

réponse de signalisation par le biais de TLR-5 est une flagelline bactérienne.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise un agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse
5 de signalisation par le biais de TLR-6. De façon appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-6 est une lipoprotéine mycobactérienne, une LP di-acylée et une moduline phénol-soluble. Des agonistes supplémentaires
10 de TLR6 sont décrits dans le document WO 2003/043572.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise un agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-7. De façon appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une
15 réponse de signalisation par le biais de TLR-7 est un ARN à brin simple (ARNbs), la loxoribine, un analogue de guanosine sur les positions N7 et C8 ou un composé d'imidazoquinoline ou des dérivés de ceux-ci. Dans un mode de réalisation, l'agoniste de TLR est l'imiquimod.
20 D'autres agonistes de TLR7 sont décrits dans le document WO 2002/085905.

Dans un autre mode de réalisation, un agoniste de TLR est utilisé, qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-8. De
25 façon appropriée, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par TLR-8 est un ARN à brin simple (ARNbs), une molécule d'imidazoquinoline ayant une activité antivirale, par exemple le résiquimod (R848) ; le résiquimod peut également être
30 reconnu par TLR-7. D'autres agonistes de TLR-8 qui

peuvent être utilisés comprennent ceux décrits dans le document WO 2004/071459.

Dans un autre mode de réalisation, on utilise un agoniste de TLR qui est capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-9. Dans un mode de réalisation, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-9 et HSP90. En variante, l'agoniste de TLR capable d'entraîner une réponse de signalisation par le biais de TLR-9 est un ADN bactérien ou viral, un ADN contenant des nucléotides de CpG non méthylés, en particulier des contextes de séquence particuliers connus sous le nom de motifs CpG. Les oligonucléotides contenant CpG induisent principalement une réponse Th1. Ces oligonucléotides sont bien connus et sont décrits par exemple, dans les documents WO 96/02555, WO 99/33488 et les brevets U.S. n° 6 008 200 et 5 856 462. De façon appropriée, les nucléotides de CpG sont des oligonucléotides de CpG. Les oligonucléotides appropriés pour leur utilisation dans les compositions immunogènes de la présente invention sont des oligonucléotides contenant CpG, éventuellement contenant deux motifs CpG de dinucléotides séparés par au moins trois, de façon appropriée au moins six nucléotides ou plus. Un motif de CpG est un nucléotide de cytosine suivi par un nucléotide de guanine. Les oligonucléotides de CpG de la présente invention sont habituellement des désoxynucléotides. Dans un mode de réalisation spécifique, l'internucléotide dans l'oligonucléotide est le phosphorodithioate ou, de façon appropriée, une liaison phosphorothioate bien que

des liaisons phosphodiester et autres liaisons par internucléotides entrent dans le cadre de l'invention. Dans le cadre de l'invention sont également compris des oligonucléotides comportant des liaisons
5 internucléotides mixtes. Les procédés de production d'oligonucléotides de phosphorothioate ou de phosphorodithioate sont décrits dans les brevets US n° 5 666 153, 5 278 302 et WO 95/26204.

D'autres adjuvants qui peuvent être utilisés dans
10 des compositions immunogènes avec des peptides de picornavirus ou des constructions de polypeptides chimériques, par exemple, d'eux-mêmes ou en combinaison avec le 3D-MPL, ou un autre adjuvant décrit dans ce document, sont les saponines, telles que QS21.

15 Les saponines sont décrites par Lacaille-Dubois, M. et Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386). Les saponines sont des stéroïdes ou des glycosides triterpènes largement
20 distribués dans le règne végétal et animal marin. Les saponines sont connues pour former des solutions colloïdales dans l'eau, qui moussent lorsqu'elles sont agitées et pour précipiter le cholestérol. Lorsque les saponines sont proches des membranes cellulaires, elles
25 créent des structures de type poreux dans la membrane, ce qui entraîne un éclatement de la membrane. L'hémolyse d'érythrocytes est un exemple de ce phénomène qui est une propriété de certaines saponines mais non de toutes.

30 Les saponines sont connues comme adjuvants dans les vaccins destinés à une administration systémique.

L'adjuvant et l'activité hémolytique des saponines individuelles ont été largement étudiés dans l'art (Lacaille-Dubois and Wagner, supra). Par exemple, le Quil A (dérivé de l'écorce de l'arbre d'Amérique du sud
5 Quillaja Saponaria Molina), et des fractions de celui-ci sont décrits dans le document US 5 057 540 et dans « Saponins as vaccine adjuvants », Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2) : 1-55 ; et EP 0 362 279 B1. Des structures particulières nommés
10 complexes immunostimulants (ISCOMS) comprenant des fractions de Quil A sont hémolytiques et ont été utilisées dans la production de vaccins (Morein, B., EP 0 109 942 B1 ; WO 96/11711 ; WO 96/33739). Les saponines hémolytiques QS21 et QS17 (fractions
15 purifiées par HPLC de Quil A) ont été décrites en tant que puissants adjuvants systémiques et le procédé pour leur production est décrit dans le brevet US n° 5 057 540 et EP 0 362 279 B1 qui sont inclus ci-joint en référence. D'autres saponines qui ont été
20 utilisées dans des études de vaccination systémique comprennent celles dérivées d'autres espèces de plantes telles que le gypsophile et la saponaire (Bomford et al., Vaccine, 10(9) : 572-577, 1992).

Le QS21 est une fraction de Hplc non toxique purifiée, dérivée de l'écorce de Quillaja Saponaria
25 Molina. Un procédé de production de QS21 est décrit dans le brevet US n° 5 057 540. Des formulations d'adjuvant non réactogènes contenant QS21 sont décrites dans le document WO 96/33739. Les références
30 mentionnées ci-dessus sont incorporées en annexe au présent document. Ladite saponine immunologiquement

active telle que QS21, peut être utilisée en quantités entre 1 et 50 µg, par dose humaine de la composition immunogène. Avantageusement, QS21 est utilisé au niveau d'environ 25 µg, par exemple entre 20 et 30 µg, de façon appropriée, entre 21 et 29 µg ou entre 22 et 28 µg ou entre 23 et 27 µg ou entre 24 et 26 µg, ou 25 µg. Dans un autre mode de réalisation, la dose humaine de la composition immunogène comprend QS21 à un niveau d'environ 10 µg, par exemple entre 5 et 15 µg, de façon appropriée, entre 6 et 14 µg, par exemple, entre 7 et 13 µg ou entre 8 et 12 µg ou entre 9 et 11 µg, ou 10 µg. Dans un autre mode de réalisation, la dose humaine de la composition immunogène comprend QS21 à un niveau d'environ 5 µg, par exemple entre 1 et 9 µg, ou entre 2 et 8 µg ou de façon appropriée, entre 3 et 7 µg ou 4 à 6 µg, ou 5 µg. Ces formulations comprenant QS21 et du cholestérol se sont avérées des adjuvants stimulants de Th1 efficaces lorsqu'ils sont formulés conjointement avec un antigène. Par conséquent, par exemple, des peptides de picornavirus et des constructions de polypeptides chimériques peuvent être utilisés favorablement dans des compositions immunogènes avec un adjuvant comprenant une combinaison de QS21 et de cholestérol.

Eventuellement, l'adjuvant peut également comprendre des sels minéraux tels que des sels d'aluminium ou de calcium, en particulier, l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium et le phosphate de calcium. Par exemple, un adjuvant contenant le 3D-MPL en combinaison avec un sel d'aluminium (par exemple, l'hydroxyde d'aluminium ou « alun ») est

approprié pour une formulation dans une composition immunogène contenant des peptides de picornavirus ou une construction de polypeptide chimérique pour l'administration à un sujet humain.

5 Une autre classe d'adjuvants à base de Th1 pour son utilisation dans des formulations avec des peptides de picornavirus et des constructions de polypeptides chimériques comprend des compositions immunostimulantes à base d'OMP. Les compositions immunostimulantes à base
10 d'OMP sont particulièrement appropriées comme adjuvants muqueux, par exemple, pour l'administration intranasale. Les compositions immunostimulantes à base d'OMP sont un genre de préparations de protéines de membrane externe (OMP comprenant certaines porines) de
15 bactéries à gram négatif telles que, de manière non restrictive, *Neisseria* species (voir par exemple, Lowell et al., J. Exp. Med. 167 : 658, 1988 ; Lowell et al., Science 240 : 800, 1988 ; Lynch et al., Biophys. J. 45 : 104, 1984 ; Lowell, dans « New Generation
20 Vaccines » 2^{ème} éd, Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, page 193, 1997 ; le brevet U.S. n° 5 726 292 ; le brevet U.S. n° 4 707 543) qui sont utiles comme véhicules ou dans les compositions pour des immunogènes tels que des antigènes bactériens ou
25 viraux. Certaines compositions immunostimulantes à base d'OMP peuvent être nommées « protéosomes », qui sont hydrophobes et d'une utilisation inoffensive pour l'être humain. Les protéosomes ont la capacité de s'auto-assembler dans des vésicules ou des amas d'OMP
30 de type vésicules d'environ 20 nm à environ 800 nm et de s'incorporer, se coordonner, s'associer de façon non

covalente, (par exemple, de façon électrostatique ou hydrophobe), ou coopérer d'une autre façon avec des antigènes de protéine (Ag), en particulier, des antigènes qui ont une fraction hydrophobe. Tout procédé
5 de préparation qui donne le composant de protéine de membrane externe sous forme vésiculaire ou analogue à une vésicule, comprenant des structures membranaires multimoléculaires ou des compositions d'OMP de type globulaire fondu d'un ou plusieurs OMP, est compris
10 dans la définition du protéosome. Les protéosomes peuvent être préparés, par exemple, comme on le décrit dans l'art (voir par exemple, les brevets U.S. n° 5 726 292 ou U.S. n° 5 985 284). Les protéosomes peuvent également contenir un lipopolysaccharide, un
15 lipooligosaccharide endogène (LPS ou LOS, respectivement) provenant des bactéries utilisées pour produire les porines d'OMP (par exemple, de l'espèce *Neisseria*) qui constitueront généralement moins de 2 % de la préparation d'OMP totale.

20 Les protéosomes sont constitués principalement de protéines de membrane externe extraites chimiquement (OMP) de *Neisseria meningitidis* (principalement, les porines A et B ainsi que l'OMP de classe 4), maintenues en solution par un détergent (Lowell GH. Proteosomes
25 for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. dans : Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, éd, New Generation Vaccines. New York : Marcel Dekker, Inc. 1997 ; 193-206). Les protéosomes peuvent être formulés avec divers antigènes tels que des protéines purifiées
30 ou recombinantes dérivées de sources virales, comprenant les peptides de picornavirus et des

constructions de polypeptide chimériques décrites ici, par exemple par diafiltration ou des procédés de dialyse classique. L'élimination progressive du détergent permet la formation de complexes hydrophobes
5 particulaires d'environ 100 à 200 nm de diamètre (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. dans : Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, éd, New Generation Vaccines. New York : Marcel Dekker, Inc. 1997 ; 193-206).

10 Les termes « protéosome : LPS ou protolline » tels qu'ils sont utilisés ici désignent des préparations de protéosomes mixtes, par exemple, par addition exogène, avec au moins une sorte de lipo-polysaccharide pour donner une composition OMP-LPS (qui peut faire effet de
15 composition immunostimulante). Par conséquent, la composition d'OMP-LPS peut être constituée de deux des composants basiques de la protolline, qui comprend (1) une préparation de protéine de membrane externe de protéosomes (par exemple, Projuvant) préparée à partir
20 de bactéries à gram négatif telles que *Neisseria meningitidis*, et (2) une préparation d'un ou plusieurs liposaccharides. Un lipo-oligosaccharide peut être endogène (par exemple, contenu à l'état naturel avec la préparation de protéosome d'OMP), peut être mélangé ou
25 combiné avec une préparation d'OMP d'un lipo-oligosaccharide préparé de façon exogène (par exemple, préparé à partir d'une culture de microorganisme différente de celle de la préparation d'OMP), ou peut être une combinaison de ceux-ci. Ce LPS ajouté de façon
30 exogène peut provenir de la même bactérie à gram négatif à partir de laquelle la préparation d'OMP a été

produite ou à partir d'une bactérie à Gram négatif
différente. La protolline doit également être comprise
comme incluant éventuellement des lipides, des
glycolipides, des glycoprotéines, de petites molécules
5 ou autres, et leurs combinaisons. La protolline peut
être préparée par exemple, comme l'a décrit la
publication de la demande de brevet U.S.
n° 2003/0044425.

Des combinaisons de différents adjuvants tels que
10 ceux mentionnés ci-dessus, peuvent également être
utilisées dans des compositions avec les peptides de
picornavirus et les constructions de polypeptides
chimériques. Par exemple, comme on l'a déjà indiqué,
QS21 peut être formulé conjointement avec 3D-MPL. Les
15 rapports de QS21 : 3D-MPL seront habituellement de
l'ordre de 1 : 10 à 10 : 1 ; tels que de 1 : 5 à 5 : 1,
et souvent, substantiellement, de 1 : 1.
Habituellement, le rapport est de l'ordre de 2,5 : 1 à
1 : 1 de 3D-MPL : QS21. Une autre formulation
20 d'adjuvant combinée comprend le 3D-MPL et un sel
d'aluminium tel que l'hydroxyde d'aluminium.
Lorsqu'elle est préparée de façon combinée, cette
combinaison peut renforcer une réponse immunitaire de
Th1 spécifique d'un antigène.

25 Dans certains cas, la formulation d'adjuvant
comprend un sel minéral tel qu'un sel de calcium ou
d'aluminium (alun), par exemple, le phosphate de
calcium, le phosphate d'aluminium ou l'hydroxyde
d'aluminium. En présence d'alun, par exemple en
30 combinaison avec le 3D-MPL, la quantité est
habituellement entre environ 100 µg et 1 mg, par

exemple, d'environ 100 µg ou d'environ 200 µg à environ 750 µg, par exemple environ 500 µg par dose.

Dans certains modes de réalisation, l'adjuvant comprend une émulsion d'huile et d'eau, par exemple, 5 une émulsion huile dans eau. Un exemple d'émulsion huile dans eau comprend une huile métabolisable telle que le squalène, un tocol tel que le tocophérol, par exemple, l'alpha-tocophérol et un tensioactif tel que le trioléate de sorbitane (Span 85™) ou mono-oléate de 10 polyoxyéthylène sorbitane (Tween 80™), dans un véhicule aqueux. Dans certains modes de réalisation, l'émulsion huile dans eau ne contient pas d'immunostimulants(s) supplémentaires, (en particulier, elle ne contient pas de dérivé de lipide A non toxique tel que le 3D-MPL ou 15 une saponine, telle que QS21). Le véhicule aqueux peut être, par exemple, une solution physiologique tamponnée au phosphate. De plus, l'émulsion huile dans eau peut contenir du span 85 et/ou de la lécithine et/ou de la tricapriline.

20 Dans un autre mode de réalisation de l'invention est proposée une composition vaccinale comprenant un antigène ou une composition antigénique et une composition d'adjuvant comprenant une émulsion huile dans eau et éventuellement, un ou plusieurs autres 25 immunostimulants, dans laquelle ladite émulsion huile dans eau comprend 0,5 à 10 mg d'huile métabolisable (de façon appropriée, le squalène), 0,5 à 11 mg de tocol (de façon appropriée, un tocophérol, tel que l'alpha-tocophérol) et 0,4 à 4 mg d'agent émulsifiant.

30 Dans un mode de réalisation spécifique, la formulation d'adjuvant comprend le 3D-MPL préparé sous

la forme d'une émulsion, telle qu'une émulsion huile dans eau. Dans certains cas, l'émulsion a une petite taille de particules de moins de 0,2 μm de diamètre comme le décrit le document WO 94/21292. Par exemple, 5 les particules de 3D-MPL peuvent être suffisamment petites pour être filtrées de façon stérile dans une membrane de 0,22 microns (comme le décrit le brevet européen n° 0 689 454). En variante, le 3D-MPL peut être préparé dans une formulation liposomale. 10 Eventuellement, l'adjuvant contenant le 3D-MPL (ou un dérivé de celui-ci) comprend également un composant immunostimulant supplémentaire.

Il convient de noter que quel que soit l'adjuvant choisi, la concentration dans la formulation finale est 15 calculée de façon à être inoffensive et efficace dans la population cible. Par exemple, des compositions immunogènes peuvent être destinées à induire une réponse immunitaire contre un picornavirus tel que HRV chez des nourrissons humains (par exemple, des 20 nourrissons entre la naissance et 1 an, par exemple entre 0 et 6 mois, à l'âge de l'administration initiale). Dans un autre exemple, les compositions immunogènes peuvent être destinées à induire une réponse immunitaire contre un picornavirus tel que HRV 25 chez des êtres humains âgés. La composition immunogène peut également être destinée à l'administration à des adultes ou des enfants. On comprendra que le choix d'un adjuvant peut être différent dans ces applications différentes et l'adjuvant et la concentration optimaux 30 pour chaque situation peuvent être déterminés de façon empirique par l'homme du métier.

Des constructions de polypeptides chimériques sous la forme de particules pour leur utilisation comme on le décrit dans ce document peuvent être adsorbées sur des adjuvants contenant de l'aluminium. Dans le cas de
5 plusieurs constructions de polypeptides chimériques différentes, par exemple, une particule telle que VLP, l'adjuvant peut être ajouté aux différentes constructions ou particules ou VLP pour les pré-adsorber avant mélange des différentes constructions ou
10 des particules ou VLP pour former la composition immunogène finale.

La composition immunogène peut également comprendre de l'aluminium ou un composé d'aluminium tel qu'un stabilisant et la présente description concerne
15 également une composition stabilisée dans laquelle les constructions de polypeptide chimériques telles que les VLP sont adsorbées sur un sel d'aluminium. De façon appropriée, les VLP sont plus stables dans le temps après adsorption sur un sel d'aluminium qu'en l'absence
20 d'aluminium.

Les compositions immunogènes décrites ici peuvent être administrées sous forme de vaccins par l'une des diverses voies telles que la voie orale, topique, sous-cutanée, muqueuse, intraveineuse, intramusculaire,
25 intranasale, sublinguale, intradermique et par suppositoire. Les distributions par voie intramusculaire, sublinguale et intradermique sont préférées.

Le dosage des peptides ou constructions de
30 polypeptide chimériques tels que les VLP peut varier en fonction de l'état de santé, du sexe, de l'âge et du

poids de l'individu et de la voie d'administration du vaccin. La quantité peut également varier en fonction du nombre de peptides ou de constructions chimériques différents.

5 Une composition immunogène contient habituellement une quantité immunoprotectrice (ou une dose fractionnée de celle-ci) de l'antigène et peut être préparée par des techniques classiques. Une préparation de compositions immunogènes, comprenant celles destinées à
10 l'administration à des sujets humains, est généralement décrite dans *Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 61 *Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach*, édité par Powell and Newman, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, édité par Voller *et al.*,
15 University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. L'encapsulation dans des liposomes est décrite par exemple, par Fullerton, brevet U.S. 4 235 877. La conjugaison de protéines à des macromolécules est décrite, par exemple, par Likhite, brevet U.S.
20 4 372 945 et par Armoret *al.*, brevet U.S. 4 474 757.

Habituellement, la quantité de protéine dans chaque dose de composition immunogène est choisie comme une quantité qui induit une réponse immunoprotectrice sans entraîner d'effets secondaires indésirables
25 significatifs chez le sujet humain. Le terme « immunoprotectrice » dans ce contexte ne signifie pas nécessairement « protectrice de façon complète » contre une infection ; il signifie une protection contre des symptômes ou maladies, en particulier, des maladies
30 graves associées au virus. La quantité d'antigène peut varier en fonction de l'immunogène spécifique qui est

utilisé. Généralement, on s'attend à ce que chaque dose humaine comprenne 1 à 1000 µg de protéine. De façon appropriée, chaque dose de vaccin comprend 1 à 100 µg de chaque conjugué de peptide ou construction de polypeptides chimérique, de façon appropriée au moins 5 µg, ou au moins 10 µg, par exemple, entre 5 et 50 µg de chaque conjugué de peptide ou de construction de polypeptide chimérique, de manière la plus appropriée 10 à 50 µg de chacun, par exemple, 10 µg, 15 µg, 20 µg, 40 µg ou 50 µg. Par exemple, une dose de vaccin peut contenir 10 ou 15 ou 20 ou 30 ou 40 µg de chaque conjugué de peptides ou construction de polypeptides chimériques. La quantité utilisée dans une composition immunogène est choisie sur la base de la population visée (par exemple, nourrissons ou personnes âgées). Une quantité optimale pour une composition particulière peut être assurée par des études standard comprenant l'observation des titres en anticorps et d'autres réponses chez les sujets. Après une vaccination initiale, les sujets peuvent recevoir un rappel environ 4 semaines plus tard.

Les compositions immunogènes décrites dans ce document génèrent de façon appropriée, une réponse immunitaire chez un sujet humain ou animal contre au moins 2 picornavirus différents ou deux sérotypes différents d'un picornavirus tel que deux sérotypes différents de HRV, de façon appropriée 2 ou plus, 3 ou plus, 4 ou plus, 5 ou plus, ou 10 sérotypes différents ou plus.

Les compositions de HRV décrites dans ce document confèrent de façon appropriée, une protection contre

une infection et/ou une maladie d'au moins 2 sérotypes de HRV différents, de façon appropriée 2 ou plus, 3 ou plus, 4 ou plus, 5 ou plus ou 10 sérotypes différents ou plus.

5 En outre, les compositions décrites ici qui comprennent une protéine vectrice ou un polypeptide chimérique tel qu'une VLP, généreront également une réponse immunitaire contre la protéine vectrice ou la VLP elle-même. Il peut s'agir d'une réponse
10 protectrice. Par conséquent, les compositions immunogènes peuvent conférer une protection contre une infection ou une maladie provoquée par le virus natif correspondant à la VLP de la composition immunogène. Par exemple, une particule chimérique de HBsAg ou de
15 VLP contenant un ou plusieurs peptides d'un picornavirus tel que HRV peut protéger contre une infection ou une maladie provoquée par HBsAg ainsi que contre une infection à picornavirus. De même, une
20 particule de protéine non structurale de rhinovirus chimérique ou une VLP contenant un ou plusieurs peptides d'un picornavirus tel que HRV peut conférer une autre réponse immunitaire bénéfique contre la protéine non structurale de picornavirus.

 Eventuellement, la composition immunogène de HRV
25 ou le vaccin peut également être formulé(e) ou co-administré(e) avec d'autres antigènes tels que des antigènes d'autres virus respiratoires tels que le virus de la grippe ou RSV, ou d'autres causes de BPCO telles que *Haemophilus influenzae* non typable,
30 *Moraxella catharralis* et *Streptococcus pneumoniae*.

Pour tous les vaccins décrits ici, le vaccin est utilisé de façon appropriée pour la vaccination chez tout groupe d'âges, en particulier pour la vaccination des populations d'enfants et de personnes âgées.

5 De façon appropriée, le vaccin est distribué selon un calendrier de 2 ou 3 doses, par exemple selon un calendrier de 0, 1 ou de 0, 2 ou de 0, 3 ou de 0, 4 ou de 0, 5 ou de 0, 6 ou de 0, 12 mois ou un calendrier de 0, 1, 6 ou 0, 2, 6 ou 0, 6, 12 mois, respectivement.

10 De façon appropriée, le vaccin est une formulation vaccinale liquide, bien que le vaccin puisse être lyophilisé ou reconstitué avant administration.

Exemples

15

Exemple 1

Immunogénicité des peptides et protéines de pleine longueur associés au Rhinovirus humain

20

Objectifs

Dans cette expérience, on a évalué les points suivants :

25 (1) l'immunogénicité des peptides associés à VP1/VP4 conjugués à KLH ou des protéines de pleine longueur et

(2) la performance des constructions de polypeptides chimérique de peptides de HRV/antigène de surface de l'hépatite B.

30 On a choisi les peptides sur la base des prévisions bioinformatiques et on les a comparées à des

données publiées montrant la capacité de divers peptides à induire des anticorps de neutralisation (croisée) (McCray & Werner, 1987, 1989 ; Katpally et al., 2009 ; Miao et al., 2009 ; Edlmayr et al., 2011).

5 Parallèlement aux peptides, on a produit et purifié des concatémères de protéines de pleine longueur de clade B VP4. Ces concatémères ont été conçus sur la base d'une analyse de séquence d'acides aminés de façon à couvrir le panel entier des séquences existantes dans le cadre
10 B.

La réactivité spécifique et la réactivité croisée de sérums de lapins ont été mesurées à l'aide d'un essai ELISA à base de peptide et des essais de neutralisation croisée.

15

Matériels et méthodes

Schéma de l'étude

L'immunogénicité de peptides apparentés à HRV et
20 de protéines de pleine longueur a été étudiée dans quatre expériences conçues de façon similaire.

Des groupes de lapins de NZW (N = 2-3/groupe) ont été immunisés par voie intramusculaire (dans le muscle tibial) les jours 0, 14, 42 et 70, avec 20 à 100 µg
25 d'antigène formulé avec un adjuvant eau dans huile (Specol, Leonards et al, 1994). Un prélèvement sanguin a été réalisé 14 jours après les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} injections. Sauf indication contraire, la réponse humorale a été mesurée 14 jours après la 4^{ème} injection
30 par ELISA et des essais de neutralisation.

Le tableau 2 ci-dessous montre les peptides qui ont été injectés et également, les deux constructions de concatémères 5x VP4 de pleine longueur que l'on a utilisées. Des constructions de polypeptide chimérique de HBsAg avec des peptides de rhinovirus VP4 ont été préparées comme on le décrit à l'exemple 2.

Tableau 2

Ori- gin	Séquence	Référen ce	Véhicule	Dose	Etude
	NaCl 150 mM - TEMOIN				
VP1	HRV14 : 147-VVQAMYVPPGAPNPKE-162		KLH		
VP4	HRV14: 39-SSAGQSLSDPSKFTEPVKDLMLKGA PALN-68		KLH		
VP1	HRV14 : 1-GLGDELEEVIVEKTKQTVASISSGPK HTQK-30		KLH		
VP1	HRV14 : 32-PILTANETGATMPV-45		KLH	20- 100 µg	2011037 5
VP1	HRV8 : 32-PALDAAETGHTSSV-45		KLH		
VP1	HRV25 : 32-PILDAAETGHTSNV-45		KLH		
VP1	HRV_C_026 : 32-QALGAVEIGATADV-45		KLH		
VP4	HRV14 : 1-GAQVSTQKSGSHENQN-16		KLH		
VP4	HRV100 : 1-GAQVSRQNVGTHSTQN-16		KLH		
VP4	HRV_C_026 : 1-GAQVSRQSVGSHETMI-16		KLH		
VP4	HRV14 : 1-GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTF VINY-31		HB-S N term	20 µg	2011076 5
VP4	HRV14 : 1-GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTF VINY-31		HB-S A boucle		
VP4	HRV14 : 1-GAQVSTQKSGSHENQNILTNGSNQTF TVINY-31		KLH		
	NaCl 150 mM - TEMOIN				
VP4	Concatémère de VP4 pleine longueur, clade B (5x) (HRV14, 26, 35, 52 et CU003) (Rhi004)			20 µg	2012017 4
VP4	Concatémère de VP4 pleine longueur, HRV14 (5x) (Rhi008)				

NaCl - TEMOIN				
---------------	--	--	--	--

Peptides

Des peptides de HRV ont été produits par Polypeptide Laboratories. Les peptides ont été
 5 conjugués à KLH en utilisant du N-hydroxysuccinimide-
 ester d'acide m-maléimidobenzoïque (MBS) après addition
 de cystéine à la région N-terminale et amidation de la
 région C-terminale.

10 Clonage, expression et purification de protéines VP4 de
 clade A (Rhi002), de clade B (Rhi004), de clade C
 (Rhi006) et de sérotype 5x HRV14 de clade B (Rhi008)

Plasmide d'expression et souche recombinante

15 Des gènes codant pour des protéines de pleine
 longueur de polyprotéines VP4 (Rhi002/Rhi004/Rhi006/
 Rhi008) et un marqueur His ont été clonés dans le
 vecteur d'expression pET24b(+) (Novagen) en utilisant
 les sites de restriction NdeI/XhoI selon des procédures
 20 standard. Des constructions finales ont été générées
 par la transformation de souche d'*E. coli* C43 (DE3)
 (Rhi004/Rhi006/Rhi008) ou Rosetta2 (DE3) (Rhi002) avec
 le vecteur d'expression recombinant selon un procédé
 standard avec des cellules traitées par CaCl₂ (Hanahan
 25 D. Plasmid transformation by Simanis, chez Glover, D.
 M. (éd.), DNA cloning. IRL Press London. (1985) :
 p. 109-135.).

Souches hôtes :

30 C43(DE3) est un dérivé de la souche C41 qui est un
 dérivé de BL21. Les souches ayant la désignation (DE3)

sont lysogènes pour un prophage λ qui contient une ARN polymérase T7 inductible par IPTG. Les lysogènes λ DE3 sont conçus pour l'expression de la protéine à partir de vecteurs pET. Cette souche est également déficiente
5 en protéases *lon* et *ompT*. Les souches C43 contiennent des mutations génétiques choisies du point de vue du phénotype, de façon à conférer une tolérance aux protéines toxiques. Cette souche a au moins une mutation qui empêche la mort cellulaire associée à
10 l'expression de nombreuses protéines toxiques recombinantes et est sélectionnée pour sa résistance à une protéine toxique différente et peut exprimer un groupe différent de protéines toxiques.

Génotype : *E. coli* souche C43::DE3, F⁻*ompThsdS_B*(r_B⁻
15 m_B⁻) *gal dcm* (DE3) #

Rosetta2 (DE3) est un dérivé de BL21 conçu pour renforcer l'expression de protéines eucaryotes qui contiennent des codons rarement utilisés dans *E. coli*. Ces souches fournissent les ARNt pour 7 codons rares
20 (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC et CGG). Les souches ayant la désignation (DE3) sont lysogènes pour un prophage λ qui contient une ARN polymérase T7 inductible par IPTG. Les lysogènes λ DE3 sont conçus pour l'expression de la protéine à partir des vecteurs
25 pET. Cette souche est également déficiente en protéases *lon* et *ompT*.

Génotype : *E. coli*, souche Rosetta2::DE3, F⁻*ompThsdS_B*(r_B⁻m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R).

Expression des protéines recombinantes :

Des transformants d'*E. coli* sont prélevés de plaques de gélose et utilisés pour inoculer 200 ml de bouillon LBT ± 1 % (p/v) glucose + kanamycine
5 (50 µg/ml) pour obtenir une O.D._{600 nm} entre 0,1 et 0,2. Les cultures sont incubées pendant la nuit à 37° C, à 250 t/m.

Ces cultures réalisées pendant la nuit ont été diluées à raison de 1 : 20 dans 500 ml de milieu LBT
10 contenant de la kanamycine (50 µg/ml) et cultivées à 37° C à une vitesse d'agitation de 250 t/m jusqu'à atteindre une valeur O.D.₆₂₀ de 0,5/0,6.

A une O.D._{600 nm} autour de 0,6, les cultures ont été induites pour déterminer l'expression des protéines
15 recombinantes par l'addition de 1 mM d'isopropyle β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG ; EMD Chemicals Inc., numéro de catalogue : 5815) et incubées pendant la nuit à 37° C, 250 t/m pour la souche C43 (DE3) (Rhi004/Rhi006/Rhi008) ou pendant 3 h à 37° C, 250 t/m
20 pour la souche Rosetta2(DE3) (Rhi002).

Après l'induction pendant la nuit (environ 16 heures) ou 3 h, la valeur O.D._{600nm} a été évaluée et les cultures ont été centrifugées à 14 000 t/m pendant 15 minutes et les agglomérats ont été congelés
25 séparément à -20° C.

Purification de Rhi002 :

L'agglomérat bactérien a été mis en suspension dans du PBS (pH 7,4). Les bactéries ont été lysées à
30 l'aide d'un système French Press 3 X 20 000 PSI. Les composants solubles (surnageant) et insolubles

(agglomérat) ont été séparés par centrifugation à 20 000 g pendant 30 min à 4° C.

La protéine marquée par 6-His a été purifiée dans des conditions dénaturantes sur IMAC. Les composants
5 insolubles ont été solubilisés dans un tampon de 50 mM de bicine, pH 8,0, contenant 6 M de guanidine, 500 mM de NaCl. Le composant solubilisé a été chargé sur une colonne de 5 ml GE Histrap (GE) pré-équilibrée avec le même tampon que celui utilisé pour la solubilisation de
10 l'agglomérat. Après la charge de la colonne, la colonne a été lavée avec 50 mM de tampon de bicine, pH 8,0, contenant 6 M d'urée et 500 mM de NaCl. L'élution a été réalisée en utilisant 50 mM de tampon de bicine, pH 8,0, contenant 6 M d'urée, 500 mM de NaCl et de
15 l'imidazole (250 mM).

Après analyse du gel, l'élution d'IMAC contenant le fragment Rhi002 a été dialysée contre un tampon de bicine (25 mM bicine, 4 M urée, 500 mM NaCl, 0,1 % acide pluronique - 5 mM EDTA, 1 % saccharose, pH 9,5).
20 La fraction dialysée a été chargée sur une colonne de chromatographie SEC pour une nouvelle étape de purification.

Après la chromatographie SEC, des fractions plus pures ont été sélectionnées et dialysées contre du PBS,
25 pH 7,4 contenant 1 % d'empigène.

La concentration de protéine a été déterminée à l'aide d'un essai de protéine Lowry RC/DC de BioRad. Les protéines ont ainsi été regroupées, filtrées de façon stérile sur un filtre de 0,22 µm, stockées à
30 -80° C.

Purification de Rhi004 :

L'agglomérat bactérien a été remis en suspension dans 20 mM de tampon de bicine, pH 8,3 contenant 500 mM de NaCl-benzonase et un cocktail inhibiteur de protéase
5 sans EDTA (Roche). Les bactéries ont été lysées à l'aide d'un système French Press 2 X 20 000 PSI. Les composants solubles (surnageant) et insolubles (agglomérat) ont été séparés par centrifugation à 20 000 g pendant 30 min à 4° C.

10 La protéine marquée par 6-His a été purifiée dans des conditions natives sur IMAC. Les composants solubles (surnageant) ont été chargés sur une colonne 5 ml GE Histrap (GE) pré-équilibrée avec le même tampon que celui utilisé pour lyser les cellules, sans
15 benzonase, et un cocktail inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche). Après la charge de la colonne, la colonne a été lavée avec un tampon de 20 mM de bicine, pH 8,3 contenant 500 mM de NaCl. L'élution a été réalisée en utilisant un tampon de 20 mM de bicine, pH 8,3
20 contenant 500 mM de NaCl et de l'imidazole (gradient de 500 mM). Après analyse sur gel, des fractions plus pures ont été sélectionnées, concentrées et chargées sur une colonne de chromatographie SEC superdex 75 pour une nouvelle étape de purification.

25 Après la chromatographie SEC dans 20 mM de bicine, pH 8,3 contenant 150 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, des fractions plus pures ont été sélectionnées pour une nouvelle étape de purification. Les fractions plus pures ont été regroupées et chargées sur une colonne de
30 chromatographie SEC G25 dans 20 mM de bicine, pH 8,3 contenant 500 mM de NaCl.

Après l'analyse sur gel, des fractions plus pures ont été sélectionnées et chargées sur une colonne de 5 ml GE Histrap (GE) pré-équilibrée avec 20 mM de tampon de bicine, pH 8,3 contenant 500 mM de NaCl.

5 Après chargement de la colonne, la colonne a été lavée avec un tampon de 20 mM de bicine, pH 8,3 contenant 500 mM de NaCl. L'élution a été réalisée en utilisant un tampon de 20 mM de bicine, pH 8,3, contenant 500 mM de NaCl et de l'imidazole (gradient 500 mM). Après

10 analyse sur gel, des fractions plus pures ont été sélectionnées, regroupées et dialysées à nouveau contre 20 mM de tampon de bicine contenant 150 mM de NaCl et 5 mM d'EDTA.

La concentration de protéine a été déterminée à

15 partir d'un essai de protéine Lowry DC de BioRad. Les protéines ont ainsi été regroupées, filtrées de façon stérile sur un filtre de 0,22 µm, stockées à -80° C.

Purification of Rhi006 :

L'agglomérat bactérien a été mis en suspension

20 dans du PBS (pH 7,4). Les bactéries ont été lysées à l'aide d'un système French Press 1 X 20 000 PSI. Les composants solubles (surnageant) et insolubles (agglomérat) ont été séparés par centrifugation à 20 000 g pendant 30 min à 4° C.

25 La protéine marquée par 6-His a été purifiée dans des conditions dénaturantes sur IMAC. Les composants insolubles ont été solubilisés dans un tampon de 50 mM de bicine, pH 8,0, contenant 6 M de guanidine, 500 mM de NaCl, un cocktail complet d'inhibiteur de protéase

30 sans EDTA (Roche). Le composant solubilisé a été chargé

sur une colonne de 5 ml GE Histrap (GE) pré-équilibrée avec le même tampon que celui utilisé pour la solubilisation de l'agglomérat. Après la charge de la colonne, la colonne a été lavée avec 50 mM de tampon de bicine, pH 8,0, contenant 6 M d'urée et 500 mM de NaCl. L'élution a été réalisée en utilisant 50 mM de tampon de bicine, pH 8,0, contenant 6 M d'urée, 500 mM de NaCl et de l'imidazole (250 mM).

Après analyse du gel, l'élution d'IMAC contenant le fragment Rhi06 a été dialysée contre du PBS, pH 8 contenant 4 M d'urée. La fraction dialysée a été chargée sur une colonne de chromatographie SEC pour une nouvelle étape de purification. Après la chromatographie SEC, des fractions plus pures ont été sélectionnées et dialysées contre du PBS, pH 8 contenant 1 M d'urée et 5 mM d'EDTA.

La concentration de protéine a été déterminée à l'aide d'un essai de protéine Lowry RC/DC de BioRad. Les protéines ont ainsi été regroupées, filtrées de façon stérile sur un filtre de 0,22 µm, stockées à -80° C.

Purification de Rhi008 :

L'agglomérat bactérien a été remis en suspension dans du PBS (pH 7,4) contenant un cocktail complet d'inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche). Les bactéries ont été lysées à l'aide d'un système French Press 2 X 20 000 PSI. Les composants solubles (surnageant) et insolubles (agglomérat) ont été séparés par centrifugation à 20 000 g pendant 30 min à 4° C.

La protéine marquée par 6-His a été purifiée dans des conditions dénaturantes sur IMAC. Les composants insolubles ont été solubilisés dans un tampon de 50 mM de bicine, pH 8,3, contenant 8 M d'urée, 500 mM de NaCl, un cocktail complet d'inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche). Le composant solubilisé a été chargé sur une colonne de 10 ml de résine NiNTA pré-équilibrée avec le même tampon que celui utilisé pour la solubilisation de l'agglomérat. Après la charge de la colonne, la colonne a été lavée avec 50 mM de tampon de bicine, pH 8,3, contenant 8 M d'urée et 500 mM de NaCl. L'élution a été réalisée en utilisant 50 mM de tampon de bicine, pH 8,0, contenant 6 M d'urée, 500 mM de NaCl et de l'imidazole (500 mM).

Après analyse du gel, l'élution d'IMAC contenant le fragment Rhi08 a été dialysée par étape contre un tampon de bicine de 25 mM, pH 8,3 contenant 4 M d'urée et 250 mM de NaCl, puis dans une deuxième étape de dialyse, contre du PBS, pH 7,4.

La concentration de protéine a été déterminée à l'aide d'un essai de protéine Lowry RC/DC de BioRad. Les protéines ont ainsi été regroupées, filtrées de façon stérile sur un filtre de 0,22 µm, stockées à -80° C.

Des constructions de polypeptides chimériques HRV-HBsAg sont décrites à l'exemple 2.

Essai ELISA pour la détection d'anticorps contre des protéines ou peptides

La quantification d'anticorps contre des peptides ou protéines associés à anti-VP1/VP4 a été réalisée par un essai ELISA en utilisant des peptides ou concatémères spécifiques de protéines de pleine
5 longueur comme antigène de revêtement. Les antigènes ont été dilués à une concentration finale de 2 µg/ml dans du PBS et ont été adsorbés pendant la nuit à 4° C dans les puits de plaques de microtitrage à 96 puits (MaxisorpImmuno-plate, Nunc, Danemark). Les plaques ont
10 ensuite été incubées pendant 1 h à 37° C avec du PBS + 0,1 % Tween 20 + 1 % BSA (tampon de saturation). Les sérums dilués dans le tampon de saturation ont été ajoutés aux plaques et incubés pendant 1 h à 30 min à 37° C. Les plaques ont été lavées quatre fois avec du
15 PBS à 0,1 % de Tween 20 et une Ig anti-lapin conjuguée à la biotine (Amersham Biosciences, RU) diluée dans un tampon de saturation a été ajoutée dans chaque puits et on a incubé pendant 1 h à 37° C. Après que les plaques ont été lavées quatre fois avec du PBS à 0,1 % de Tween
20 20, on a ajouté de la streptavidine-peroxydase de raifort (Roche), diluée dans un tampon de saturation, pendant encore 30 min à 37° C. Les plaques ont été lavées 4 fois avec du PBS à 0,1 % de Tween 20 à nouveau, et incubées pendant 20 min à température
25 ambiante avec une solution de 0,04 % d'o-phénylènediamine (Sigma) à 0,03 % de H₂O₂ dans 0,1 % de Tween 20, 0,05 M de tampon de citrate, pH 4,5. La réaction a été stoppée avec du 2NH₂SO₄ et le résultat a été lu à 492/620 nm. Les titres ELISA ont été calculés
30 à partir d'une référence par SoftMaxPro (avec une équation à quatre paramètres) et exprimés en UE/ml.

Production de Rhinovirus

Des souches de HRV2, 8, 10, 14, 39 et 61 ont été achetées auprès de l'ATCC et amplifiées sur des
5 cellules Hela-H1 cultivées dans un milieu d'infection
(MEM contenant 2 % de FCS, 30 mM de MgCl₂ et 1 mM de glutamine). A cette fin, on aensemencé 5 millions de
cellules Hela-H1 dans des plaques de 75 cm² et on les a
cultivées pendant la nuit à 34° C. Les plaques ont
10 ensuite été infectées à une multiplicité d'infection de
15 et ensuite, incubées jusqu'à lyse complète de
monocouches de cellules (24 h à 48 h en fonction de la
souche). Les surnageants ont été recueillis et les
débris éliminés par centrifugation (1 000 g-10 min).
15 Les surnageants purifiés ont été aliquotés, stockés à
-80° C et tiré sur Hela-H1.

Titrage de la production de rhinovirus

Des cellules Hela-H1 ont été ensemencées dans des
20 plaques de 96 puits (5 000 cellules/puits) et cultivées
pendant la nuit à 34° C avec 5 % de CO₂. Les plaques
ont ensuite été infectées avec des dilutions sérielles
doubles (dilution de départ = 1/1000) de suspensions de
rhinovirus testées en 8 exemplaires. Trois à cinq jours
25 après l'infection, la présence d'effets cytopathiques
médiés par HRV a été révélée en mesurant la viabilité
des cellules. A cette fin, les cellules ont été
incubées avec le réactif WST-1 selon les instructions
du fabricant (Promega). Une valeur seuil a ensuite été
30 définie pour chaque plaque en tant que moyenne -
3 écarts types des densités optiques (O.D.) des puits

contenant des cellules non infectées. Les puits présentant une O.D. inférieure à cette valeur seuil ont été qualifiés de positifs à CPE. La concentration virale a été calculée selon la formule de Reed et Muench.

Essai de neutralisation

Des cellules Hela-H1 ont été étalées sur des plaques de 96 puits (5 000 cellules/puits) et incubées pendant la nuit à 37° C avec 5 % de CO₂. Les sérums ont été inactivés à 56° C pendant 30 min. On a placé 100 TCID₅₀ de HRV (du sérotype pertinent, en fonction de l'essai de neutralisation ou de neutralisation croisée) en présence de dilutions sérielles (dilutions doubles à partir de la dilution = 1/2) de sérum de lapin à 37° C pendant 2 h. Le mélange a ensuite été placé sur des monocouches de cellules et on a encore incubé les plaques à 37° C pendant 3 à 5 jours jusqu'à ce que la lyse complète de monocouches de cellules témoins soit réalisée. La viabilité des cellules a ensuite été mesurée en utilisant un réactif WST-1 selon les instructions du fabricant (Promega). Les O.D. ont ensuite été converties en pourcentage d'effet cytopathique et réciproque de la dilution donnant une réduction de 50 % de l'effet cytopathique (CPE) par rapport aux cellules témoins. Le CPE a ensuite été extrapolé selon une régression non linéaire avec le logiciel GraphpadPrism.

Résultats

Immunogénicité des peptides - réponse spécifique des peptides

5 La réponse spécifique des peptides chez les lapins qui ont reçu KLH ou des peptides conjugués à HB-S a été mesurée 14 jours après la 4^{ème} immunisation en utilisant l'essai ELISA à base de peptides décrit dans ce document.

10 Les résultats étaient les suivants et sont présentés sur les figures 2 et 3. Aucune réponse n'a été détectée dans le groupe témoin NaCl.

Conjugués VP1 - KLH (figure 2)

15 Des taux élevés d'anticorps spécifiques de VP1 ont été détectés chez les lapins qui ont reçu

- HRV14 VP1 147-162,
- HRV14 VP1 1-30 and
- HRV14 VP1 32-45

20 Des taux faibles d'anticorps ont été induits par

- les peptides HRV8, HRV25 ou HRV_C_026VP1 32-45,

bien que l'augmentation de la dose d'antigène ait affecté positivement les titres d'anticorps.

Conjugués VP4 - KLH (figure 3)

25 Globalement, les peptides associés à VP4 ont induit des taux plus faibles d'anticorps que les peptides VP1. Toutefois, des titres élevés d'anticorps spécifiques du peptide VP4 ont été mesurés chez les

30 lapins qui ont reçu

- HRV14 VP4 39-68 ou

- HRV14, HRV100 et HRVC VP4 1-16.

Contrairement à l'article publié par Katpally et coll. (2009), HRV14 VP4 1-31 était faiblement immunogène. Toutefois, ceci peut s'expliquer par l'agrégation et la faible solubilité de ce peptide observée après la conjugaison à KLH.

Constructions chimériques de VP4 - HbsAg (figure 3)

L'insertion de HRV14 VP4 1-31 dans la boucle A mais non dans la terminaison N de HbsAg induit des taux élevés d'anticorps spécifiques du peptide chez 2 lapins sur 3. Les résultats sont présentés sur la figure 3.

Immunogénicité des protéines de pleine longueur - réponse spécifique des protéines

L'immunogénicité des protéines de pleine longueur sous la forme de concatémères a été mesurée 14 jours après la 4^{ème} immunisation par ELISA. Les résultats sont présentés sur la figure 4.

- Aucune réponse n'a été détectée dans le groupe NaCl

- Des taux élevés d'anticorps dirigés contre VP4 ont été détectés chez les lapins qui ont reçu les concatémères de clade B ou les protéines HRV14 VP4.

Comparaison des titres d'anticorps neutralisants induits par les peptides et les protéines de pleine longueur

Les taux d'anticorps neutralisants induits par les peptides et protéines associés à VP1/VP4 ont été mesurés 14 jours après la 4^{ème} vaccination en utilisant

un panel de souche de HRV (c'est-à-dire HRV2, 8, 10, 14, 39 et 61). Les résultats sont présentés sur la figure 5 et la figure 6.

5 - Aucun anticorps neutralisation n'a été détecté dans le groupe NaCl témoin

10 - Des anticorps spécifiques et/ou de neutralisation croisée ont été détectés dans tous les groupes qui ont reçu les peptides associés à VP1. De façon importante, le peptide *HRV14 VP1 32-45* a induit la réactivité croisée la plus large car ce peptide particulier a pu neutraliser toutes les souches testées.

15 - Des taux significatifs d'anticorps neutralisants spécifiques et de neutralisation croisée ont été détectés chez les lapins immunisés par les peptides *HRV14 VP4 39-68*, *VP4 1-16* et *HRV100 VP4 1-16* alors qu'une réponse contradictoire a été observée dans d'autres groupes vaccinés avec des peptides conjugués à KLH ou des protéines de pleine longueur. Notamment, le peptide *HRV100 VP4 1-16* a induit la réactivité croisée la plus large car ce peptide particulier a été capable de neutraliser l'ensemble des 6 souches testées. Par conséquent, dans *VP4 1-16*, un peptide plus court que *VP4 1-31* a été identifié, qui est plus conservé et peut introduire une activité de neutralisation croisée plus large.

25

Les protéines VP4 complètes induisent des taux faibles d'anticorps spécifiques des régions 1 à 16

30 Les données recueillies dans des essais de neutralisation ont suggéré qu'un épitope neutralisant se situe dans les régions *VP4 1-16* et qu'une

immunisation avec des séquences de peptides plus longues (1 à 31) ou de protéine VP4 de pleine longueur pouvait donner la mauvaise réponse immunitaire contre des épitopes non neutralisants. Un mécanisme similaire, contribuant à l'évasion immunitaire de HRV, a été décrit pour la protéine VP1 (Niespodziana et al 2012). En effet, la majeure partie des anticorps était dirigée contre la région 1 à 30 de VP1 après immunisation avec la protéine VP1 de pleine longueur et cette région est bien connue pour induire des anticorps à faible neutralisation (croisée) (Niespodziana et al 2012) (et comme on l'a observé dans ces expériences). On a donc vérifié si la protéine de pleine longueur a induit des anticorps dirigés contre la région VP4 1-16. Des sérums de lapin ont été testés pour déterminer la présence d'anticorps spécifiques de VP4 1-16 par ELISA et les titres relatifs (par rapport au groupe vacciné par HRV14 VP4 1-16) ont été calculés. Des taux très faibles d'anticorps VP4 1-16 ont été détectés chez les lapins qui ont reçu VP4 1-31 dans la boucle HBsAg ou la protéine de pleine longueur VP4. Les résultats sont présentés sur la figure 7. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'immunisation avec la protéine VP4 de pleine longueur (ou VP1) a entraîné la mauvaise réponse immunitaire contre les épitopes non neutralisants.

Tableau 3

Titres des anticorps du peptide anti-HRV14 VP4 1-16 induits par le peptide HRV14 VP4 1-16, le peptide HRV14 VP4 1-31 et la protéine VP4 de pleine longueur.

HRV14 VP4 1-16	17561,5
HRV14 VP4 1-31 dans HBS (une boucle)	2163
5x HRV14 complète	427
NaCl	<25

5

Protéines VP4 de pleine longueur

Lapins : l'immunogénicité des protéines de pleine longueur VP4 de clades A et C et protéine HRV14 VP1

10 Dans une autre expérience, on a réalisé des essais ELISA et essais de neutralisation 14 jours post-IV. Comme le monte le tableau 4 ci-dessous, des taux élevés d'IgG anti-VP4 de réaction croisée ont été induits par des concatémères de protéines VP4 et dans une moindre

15 mesure, par la construction chimérique VP4-HBs. Toutefois, même s'i l'on a observé une certaine neutralisation de la souche HRV14, aucune de ces constructions n'a pu induire des anticorps qui neutralisent HRV39. Ces données confirment les

20 résultats précédents suggérant que les protéines HRV VP4 de pleine longueur induisent des taux élevés d'anticorps non neutralisants. De même, la protéine HRV14 VP1 était hautement immunogène mais n'a pas induit d'anticorps fonctionnels.

Tableau 4

		VP4 Complète lg. clade A	VP4 Complète lg. clade C	VP4 Complète lg. HRV14	VP1 Complète lg. HRV14	HRV14 neutra.	HRV39 neutra.
	n° lapin	PIV	PIV	PIV	PIV		
Concatémère	TA 114	716093	171617	133378		15,17	<2
VP4 pleine longueur clade A	TA 115	474532	106675	22081		11,48	<2
	TA 116	755820	64151	157835		<2	<2
Concatémère	TA 117	414859	992334	42522		15,94	<2
VP4 pleine longueur clade C	TA 118	466868	889650	63881		20,78	<2
	TA 119	97803	541508	32296		<2	<2
HRV14 VP4 pleine longueur (HBs)	TA 123	317	2217	69266		2,542	<2
	TA 124	35022	41333	101670		3,615	<2
	TA 125	148	2596	18933		<2	<2
VP1 HRV14	TA 120				365792	11,5	<2
	TA 121				597110	<2	<2
	TA 122				174395	2,542	<2

Conclusions

5 Cette étude démontre que HRV14 VP1 32-45 et HRV100
 VP4 1-16 sont immunogènes et induisent des anticorps à
 large réaction croisée. En revanche, les protéines VP4
 de pleine longueur ont induit des taux élevés
 d'anticorps qui ne se sont pas avérés fonctionnels. Les
 10 données suggèrent que l'immunisation avec les protéines
 VP4 de pleine longueur entraîne une mauvaise réponse
 immunitaire contre des épitopes non neutralisants. Ceci
 a été confirmé par le fait que les protéines VP4 de

pleine longueur n'induisent pas d'anticorps dirigés contre la région VP4 1-16. Ce mécanisme a également été démontré pour la protéine HRV14 VP1 et confirme encore la nécessité que la vaccination avec un peptide dirige
5 la réponse immunitaire contre des anticorps de neutralisation croisée bien conservés.

Exemple 2. Construction de particules mixtes de VP4-S,S exprimant la souche *Pichiapastoris*

10

Introduction

On a produit une construction codant pour le peptide VP4₁₋₃₁ (sérotypé HRV14) fusionnée génétiquement à la terminaison N de l'antigène S du virus de
15 l'hépatite B (HBsAg). Cette protéine de fusion (VP4-S) a été co-exprimée dans la levure *Pichiapastoris*, avec un fragment de HBsAg de type sauvage 230aa (S). La souche obtenue synthétise deux polypeptides, S et la protéine de fusion VP4-S qui se co-assemblent
20 spontanément en particules de lipoprotéine mixte (VP4-S,S).

La souche *Pichiapastoris* utilisée pour la production de ces particules mixtes porte des cassettes d'expression séparées pour chaque protéine. Ces
25 cassettes étaient intégrées de façon stable dans le génome de *Pichia* en utilisant des vecteurs d'intégration linéaires.

Construction du plasmide recombinant peptide VP4-pMK

30 Un fragment d'ADN synthétique codant pour le peptide VP4 (31aa) a été généré par Geneart. Le

fragment a été cloné dans le vecteur pMK en utilisant les sites de clonage *PacI* et *AscI* (plasmide propriété de Geneart). La séquence nucléotidique (optimisée par codon pour l'expression dans *Pichia*) et la séquence d'acides aminés correspondante sont illustrées sur la figure 16-A. La carte du plasmide peptide VP4-pMK est illustrée sur la figure 16-B.

Construction du vecteur d'intégration PHIL-D2mod/VP4-S

10 Le fragment d'ADN synthétique de VP4 a été amplifié par PCR en utilisant le plasmide peptide de VP4-pMK comme matrice et la paire d'amorces suivante :

VP4-Fw : CTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGG

VP4-Rv : TTTGAATAGTATCCCGGGGTAGTTGATAAC

15 Le produit de PCR a été clivé avec *NcoI* and *SmaI*, purifié sur gel et cloné dans le vecteur PHIL-D2mod qui portait déjà le gène S du virus de l'hépatite B (vecteur de fusion PHIL-D2mod/S). Le plasmide recombinant obtenu porte le gène de fusion VP4-S et a été nommé vecteur PHIL-D2mod/VP4-S. Le gène de fusion VP4-S et la séquence d'acides aminés correspondante sont détaillés sur la figure 17.

La carte du vecteur PHIL-D2mod/VP4-S est illustrée sur la figure 20. Dans ce vecteur d'expression, le gène recombinant est sous le contrôle du puissant promoteur AOX1 étroitement régulé, inductible par le méthanol.

Le vecteur du squelette PHIL-D2-mod est un dérivé du vecteur PHIL-D2 disponible dans le commerce (Invitrogen). Le vecteur PHIL-D2 du commerce a été modifié de façon à ce que l'expression d'une protéine hétérologue commence au codon de départ natif ATG du

gène AOX1 de *Pichia* et il produira potentiellement une protéine recombinante avec un marqueur histidine C-terminal. Le vecteur PHIL-D2-mod est illustré sur la figure 19.

5

Construction du vecteur d'intégration PHIL-D2mod/ S

Le vecteur PHIL-D2mod/ S a été conçu pour permettre la production de l'antigène S seul (sans partenaire de fusion).

10 Un fragment d'ADN synthétique codant pour l'antigène S (227aa) a été généré par Geneart. Le gène synthétique était optimisé par un codon pour l'expression dans *Pichiapastoris* (nommé gène Sco). Ce fragment d'ADN synthétique a été cloné dans le vecteur
15 PHIL-D2mod entre les sites *NcoI* et *EcoRI*. Le plasmide recombinant contenant le gène Sco a été nommé PHIL-D2mod/S. La carte du vecteur PHIL-D2mod/S est illustrée sur la figure 21. Dans ce vecteur d'expression, le gène recombinant est sous le contrôle du puissant promoteur
20 AOX1 étroitement régulé, inductible par méthanol.

Génération de la souche de *P.pastoris* co-exprimant les protéines VP4-S et S

Les vecteurs d'expression PHIL-D2mod/VP4-S et
25 PHIL-D2mod/S ont été utilisés pour transformer la souche *Pichiapastoris* GS115 (*his4*). Avant la transformation, les vecteurs ont été digérés avec l'enzyme *NotI* afin de libérer un fragment d'ADN contenant la cassette d'expression (VP4-S ou S) plus le
30 gène HIS4 (pour compléter *his4* dans le génome de l'hôte).

Comme les deux extrémités du fragment d'intégration d'ADN *NotI* sont homologues à la région AOX1 du génome de *Pichia*, il peut s'intégrer dans le locus AOX1 par recombinaison homologue. Au total, 5 100 transformants His⁺ ont été obtenus et des clones d'intégration « multicopie » ont été sélectionnés par analyse d'ADN dot blot semi-quantitative. Certains candidats à « nombre de copies élevé » ont été sélectionnés, induits par le méthanol et leur 10 production de protéine recombinante a été analysée sur gel coloré au bleu de Coomassie et par Western blot. Enfin, le clone transformant n° 49 a été sélectionné pour une nouvelle analyse.

15 Evaluation de la formation de particules

Afin de déterminer si les protéines VP4-S et S produites dans le clone recombinant *Pichia* n°49 s'assemblent en structures particulières, l'extrait soluble a été préparé (après induction au méthanol) et 20 analysé par centrifugation à gradient de densité CsCl. L'extrait soluble (15 mg de protéine totale) a été chargé sur un gradient de 10 ml, 1,5 M, de CsCl (72 heures à 40000 t/m, +8° C dans un rotor Beckman 50 Ti). Des fractions (0,5 ml) ont été recueillies et 25 passées sur un SDS-PAGE à 12 %, transférées sur membrane de nitrocellulose et analysées en utilisant un anticorps monoclonal anti-S (groupe A). Comme le montre la figure 22, les pics de Western blot correspondant à la protéine de fusion VP4-S et la protéine S 30 apparaissent sur la même fraction du gradient correspondant à une masse volumique (ρ) de $\rho = 1,20$

suggérant que des particules mixtes contenant à la fois les monomères VP4-S et S sont formées dans cette souche.

La masse volumique (ρ) de la fraction de pic a été calculée à partir d'une mesure de son indice de réfraction (groupe A).

Groupe B : deux fractions de pic ont été analysées par coloration à l'argent (à gauche) et au bleu de Coomassie (à droite).

10

Purification des particules mixtes VP4-S,S

Le procédé suivant a été utilisé pour les particules mixtes VP4-S,S à partir de la fraction soluble du clone recombinant n° 49 de Pichia.

15 Le procédé de purification comprend les étapes suivantes :

- homogénéisation de la pâte cellulaire (French Press)

- clarification par centrifugation

20 - 2 gradients successifs de de CsCl 1,5 M

- 1 étape de filtration sur gel (HR300)

- Concentration (Amicon)

- Filtration stérile (0,22 μ m)

25 A titre d'exemple, la masse de BMP201 purifiée est illustrée sur la figure 23.

Analyse par ME

Une analyse par microscopie électronique a été réalisée sur la masse purifiée de BMP201. Les particules ont été visualisées après coloration négative avec de l'acide phosphotungstique. L'échelle

30

est équivalente à 100 nm (figure 24). De nombreuses particules (20 à 40 nm) ont pu clairement être identifiées.

Liste de références

Arnold E, Rossmann MG (1990). Analysis of the structure of a common cold virus, human rhinovirus 14, refined at a resolution of 3.0 A. J Mol Biol. 211(4) : 763-801.

Bartlett NW et al (2008) Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. Nat Med. Feb. 14(2) : 199-204. doi: 10.1038/nm1713. Epub 2008 Feb 3.

Chen et al (2000). Mol. Cell 5, 557-567.

Cheng-Yu Chung et al (2010). Vaccine 28 (2010) 6951-6957.

Edlmayr et al (2011). Antibodies induced with recombinant VP1 from human rhinovirus exhibit cross-neutralisation. Eur. Respir. J. 37 : 44-52.

Katpally U, Fu TM, Freed DC, Casimiro DR, Smith TJ (2009). Antibodies to the buried N terminus of rhinovirus VP4 exhibit cross-serotypic neutralization. J Virol. 83(14) : 7040-8.

Leenaars PP, Hendriksel CF, Angulo AF, Koedam MA, Claassen E.(1994) Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. Vet Immunol Immunopathol. Mar. 40(3) : 225-41.

Lewis JK, Bothner B, Smith TJ, Siuzdak G (1998). Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 95(12) : 6774-8.

Lewis-Rogers N, Bendall ML, Crandall KA (2009). Phylogenetic Relationships and Molecular Adaptation Dynamics of Human Rhinoviruses. Mol Biol. Evol. 26(5) : 969-981.

Miao LY et al (2009). Monoclonal Antibodies to VP1 Recognize a Broad Range of Enteroviruses. J. Clin. Microbiol. Vol 47, No 10, 3108-3113.

5 McCray J, Werner G (1987). Different rhinovirus serotypes neutralized by antipeptide antibodies. Nature. Oct 22-28 ; 329(6141) : 736-8.

Niespodziana K et al (2012). Misdirected antibody responses against an N-terminal epitope on human rhinovirus VP1 as explanation for recurrent RV
10 infections. The FASEB Journal. Vol 26, 1001-1008.

Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB (2010). Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. J. Allergy Clin. Immunol. Vol 125, No 6, 1190-1199.

15 Phillips T, Jenkinson L, McCrae C, Thong B, Unitt J. (2011). Development of a high-throughput human rhinovirus infectivity cell-based assay for identifying antiviral compounds. J Virol Methods. May. 173(2) : 182-8.

20 Rollinger JM and Schmidtke M (2009). The Human Rhinovirus : Human-Pathological Impact, Mechanisms of Antirhinoviral Agents, and Strategies for Their Discovery. Medicinal Research Reviews, 31, n° 1, 42-92.

108

REVENDICATIONS

1. Composition immunogène comprenant un premier et un deuxième peptide dérivés d'une protéine structurale d'un picornavirus, lesdits peptides étant capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus, et un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable, dans laquelle lesdits peptides de picornavirus proviennent de la région N-terminale des protéines structurales de picornavirus.

2. Composition immunogène selon la revendication 1, dans laquelle les premier et deuxième peptides proviennent de différentes protéines de picornavirus.

3. Composition immunogène selon la revendication 1 ou la revendication 2, dans laquelle les premier et deuxième peptides proviennent des protéines structurales VP1 et VP4 de picornavirus.

4. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle l'un ou les deux des premier et deuxième peptides de picornavirus consistent en moins de 20 acides aminés de la protéine structurale de picornavirus.

5. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle l'un ou les deux des premier et deuxième peptides proviennent d'un entérovirus humain et les peptides d'entérovirus sont capables d'induire une réponse

immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs entérovirus.

6. Composition immunogène selon la revendication 5, dans laquelle l'un ou les deux des premier et deuxième peptides proviennent d'un rhinovirus humain et les peptides de rhinovirus sont capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs rhinovirus.

7. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle le premier peptide consiste en les acides aminés 32 à 45 de VP1 ou une variante des acides aminés 32 à 45 de VP1 ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide.

8. Composition immunogène selon la revendication 7, dans laquelle le peptide est choisi parmi :

HRV14 (B) : 32-PILTANETGATMPV-45 [SEQ ID N° : 1]

HRV8 (A-M) : 32-PALDAAETGHTSSV-45 [SEQ ID N° : 2]

HRV25(A-m) : 32-PILDAAETGHTSNV-45 [SEQ ID N° : 3]

HRV_C_026 : 32-QALGAVEIGATADV-45 [SEQ ID N° : 4]

ou une variante de celles-ci ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre extrémité et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide.

9. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle le deuxième peptide consiste en les acides aminés 1 à 16 de VP4 ou une variante des acides aminés 1 à 16 de VP4 ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre des extrémités et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés avec la séquence de peptide.

10. Composition immunogène selon la revendication 9, dans laquelle le peptide est choisi parmi :

HRV14 (B) : 1-GAQVSTQKSGSHENQN-16 [SEQ ID N° : 5]

HRV100(A-M) : 1-GAQVSRQNVGTHSTQN-16 [SEQ ID N° : 6]

HRV_C_026 : 1-GAQVSRQSVGSSETMI-16 [SEQ ID N° : 7]

ou une variante de celles-ci ayant 1 à 4 additions ou délétions d'acides aminés sur l'une ou l'autre des extrémités et/ou 1 à 2 substitutions ou additions ou délétions d'acides aminés dans la séquence de peptide.

11. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle les premier et deuxième peptides sont couplés à des protéines vectrices.

12. Composition immunogène selon la revendication 11, dans laquelle les premier et deuxième peptides sont couplés à CRM197.

13. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant au moins une construction de polypeptide chimérique comprenant les premier et deuxième peptides.

14. Composition immunogène selon la revendication 13, dans laquelle les premier et deuxième peptides sont dans des constructions chimériques distinctes.

15. Composition immunogène selon la revendication 13, dans laquelle les premier et deuxième peptides sont dans la même construction de polypeptides chimériques.

16. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, dans laquelle la construction de polypeptides chimériques est sous la forme d'une particule.

17. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, dans laquelle le polypeptide de squelette provient d'un papillomavirus humain (HPV), d'un rhinovirus, de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBsAg), EV-71, du virus de la grippe, d'un norovirus.

18. Composition immunogène selon la revendication 16 ou 17, dans laquelle la particule est une particule de type viral (VLP).

19. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, comprenant en outre un adjuvant.

20. Composition immunogène selon la revendication 19, dans laquelle l'adjuvant comprend un sel d'aluminium.

21. Composition immunogène selon la revendication 20, dans laquelle l'adjuvant comprend l'hydroxyde d'aluminium.

22. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, dans laquelle l'adjuvant comprend le lipide A monophosphorylé 3-O-désacylé (3D-MPL).

23. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 19 à 22, dans laquelle l'adjuvant comprend QS21.

24. Composition immunogène selon la revendication 22 ou 23, dans laquelle l'adjuvant comprend le 3D-MPL et le QS21 dans une formulation de liposome.

25. Utilisation d'une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, dans la prévention ou le traitement d'une infection à picornavirus telle qu'une infection à HRV.

26. Utilisation d'une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 24, dans la production d'un médicament pour la prévention ou le traitement d'une infection à picornavirus telle qu'une infection à HRV.

27. Procédé d'induction d'anticorps neutralisants contre un picornavirus tel que HRV chez des êtres humains, comprenant l'administration à un être humain d'une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 24.

28. Procédé d'induction d'anticorps de neutralisation croisée contre un picornavirus tel que HRV chez des êtres humains, comprenant l'administration à un être humain d'une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 24.

29. Procédé de prévention d'une infection à picornavirus ou une maladie à picornavirus associée à une infection à picornavirus telle qu'une infection à HRV ou une maladie à HRV associée à une infection à HRV, ledit procédé comprenant

M

112

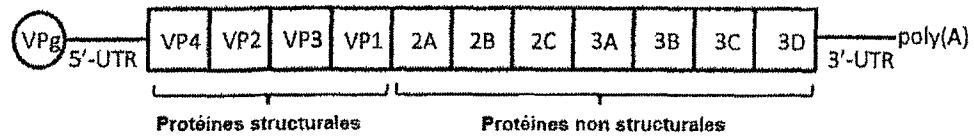
2014/0161

l'administration à un être humain d'une composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 à 24.

30. Procédé de préparation d'une composition immunogène, ledit procédé comprenant la combinaison de (i) deux ou plusieurs peptides de picornavirus à partir de la région N-terminale des protéines structurales de picornavirus, lesdits peptides étant capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus et (ii) d'un diluant, excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable.

M

Figure 1



Protéines	Fonctions
5 VPg	Petite protéine virale.
VP1-VP4	Protéines de capside.
2A	Protéase, blocage de la protéine hôte, stimulation de l'initiation d'une synthèse d'ARN à brin négatif
2B	Perméabilité de la membrane, impliquée dans le début de la synthèse de l'ARN viral, inhibition de la sécrétion de protéine du système de Golgi.
10 2C	Formation de vésicule, direction des complexes de réplication aux membranes cellulaires, entraînant le désassemblage du système de Golgi et du réticulum endoplasmique, NTPase.
15 2BC	Liaison de l'ARN, formation de vésicule, perméabilité de la membrane (fusion 2B-2C).
3A	Inhibition du transport intracellulaire
3B	VPg, amorce de protéine pour la synthèse de l'ARN viral.
3AB	VPg d'ancrage dans les membranes pour l'étape d'amorçage de la synthèse de l'ARN, interaction de l'association membranaire de 3D et
20 3CD	des complexes de réplication (fusion 3A-3B).
3C	Protéase, inhibe la transcription de l'hôte
3D	ARN polymérase dépendante de l'ARN, uridylation de VPg
3CD	Traitement de la protéine virale (fusion 3C-3D).

Figure 2

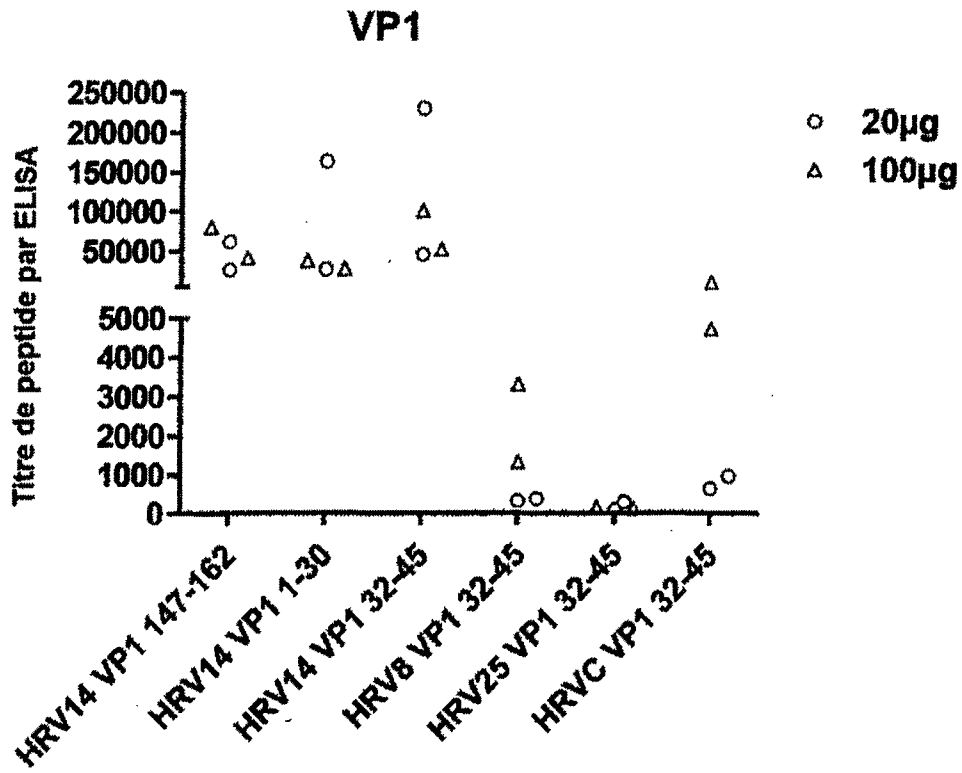


Figure 3

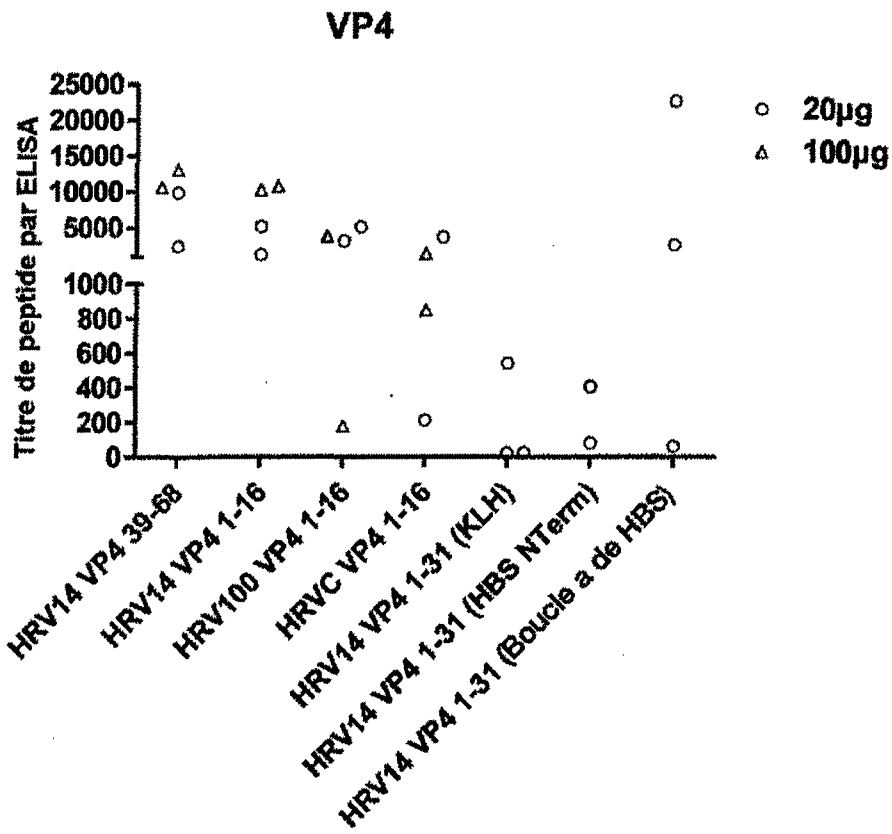


Figure 4

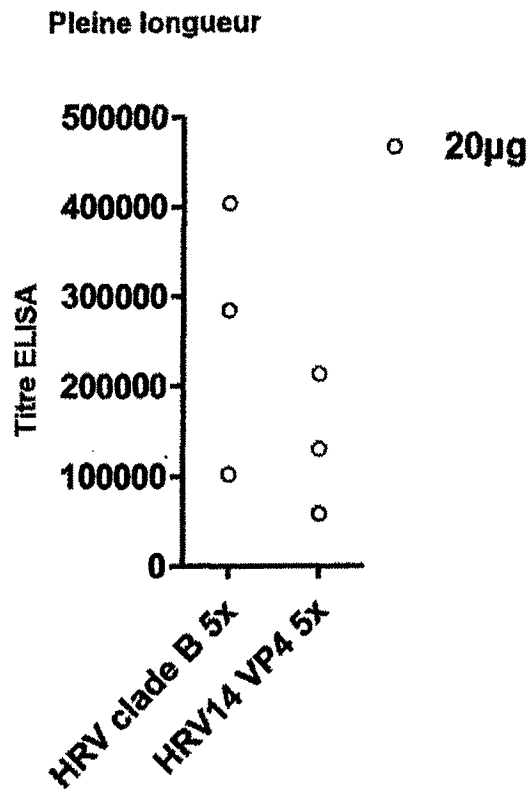
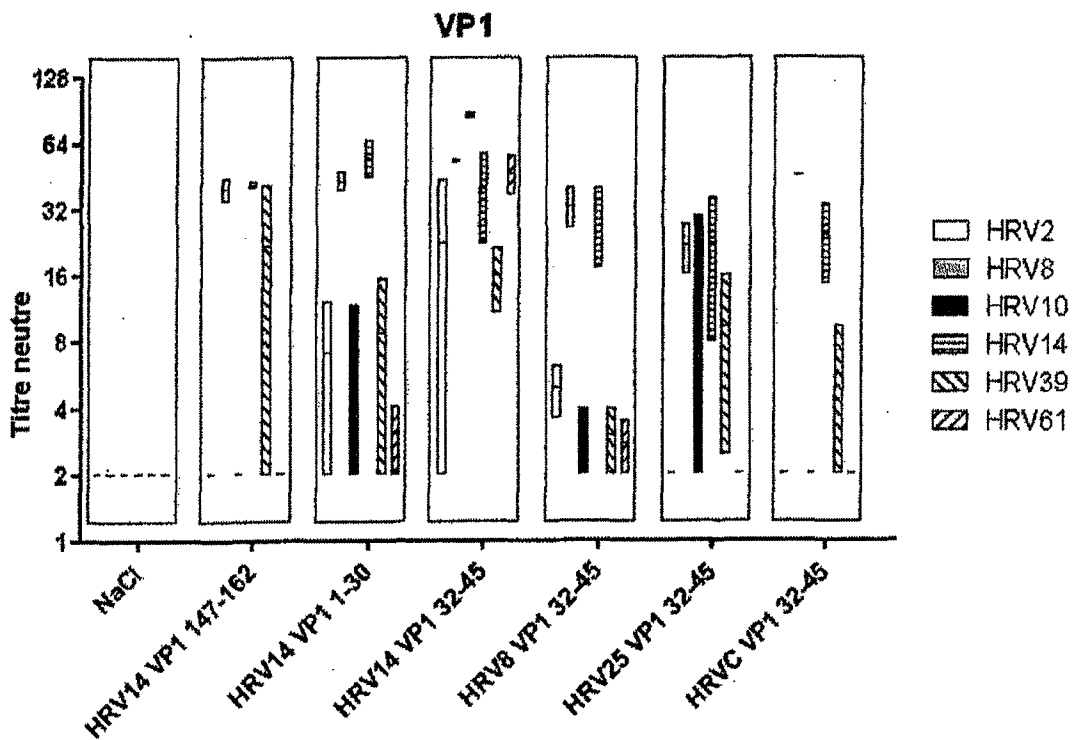
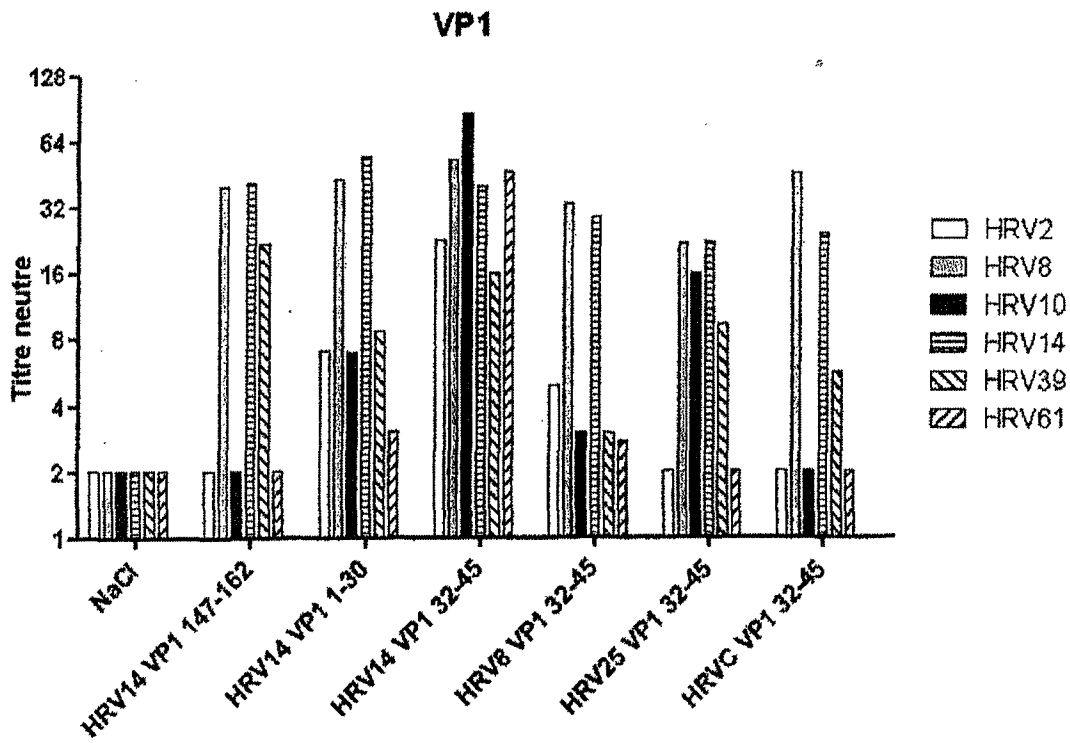
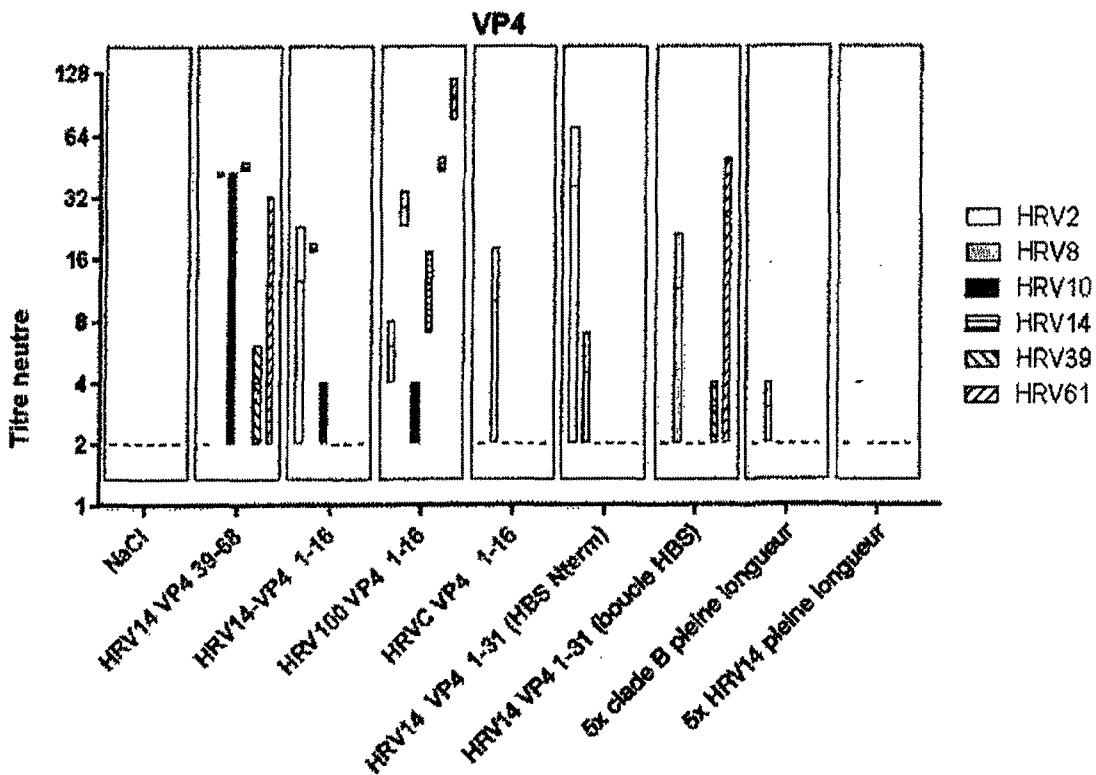
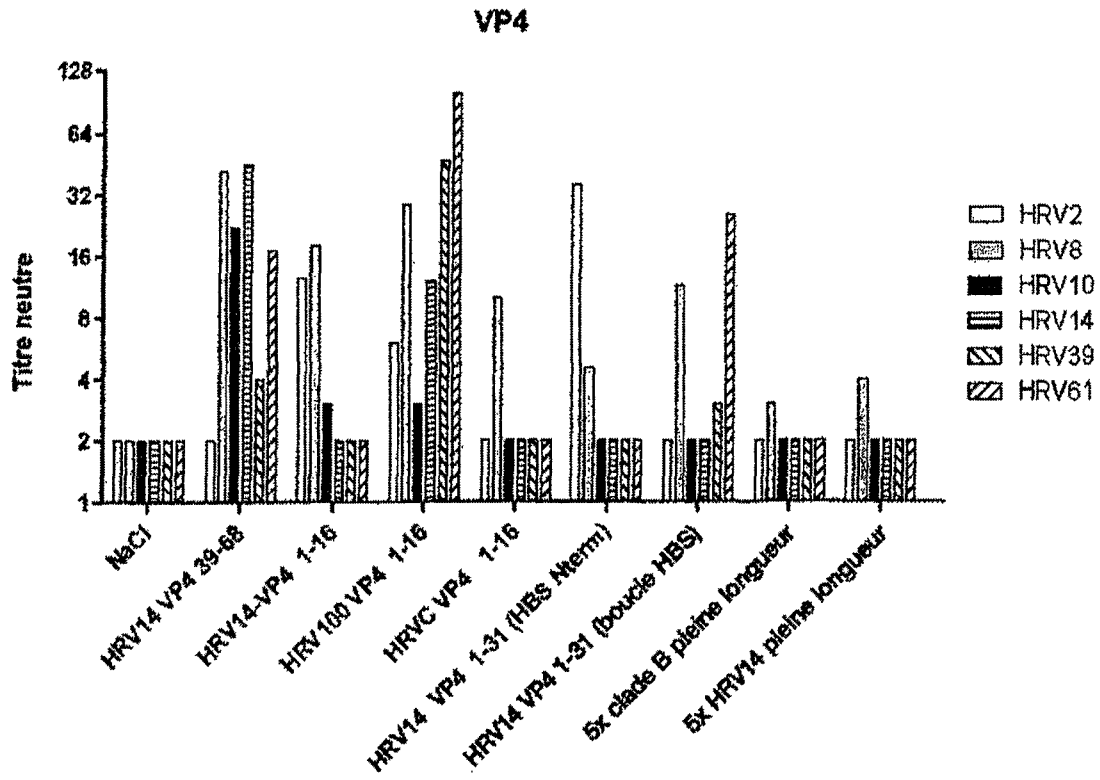


Figure 5



Sur les 2 versions de la figure 5 ci-dessus, la première montre des bâtons classiques (= moyenne) et la deuxième montre des bâtons flottants (min. et max. = titres des 2 animaux + moyenne)

Figure 6



Sur les 2 versions de la figure 6 ci-dessus, la première montre des bâtons classiques (= moyenne) et la deuxième montre des bâtons flottants (min. et max. = titres des 2 animaux + moyenne)

Figure 7

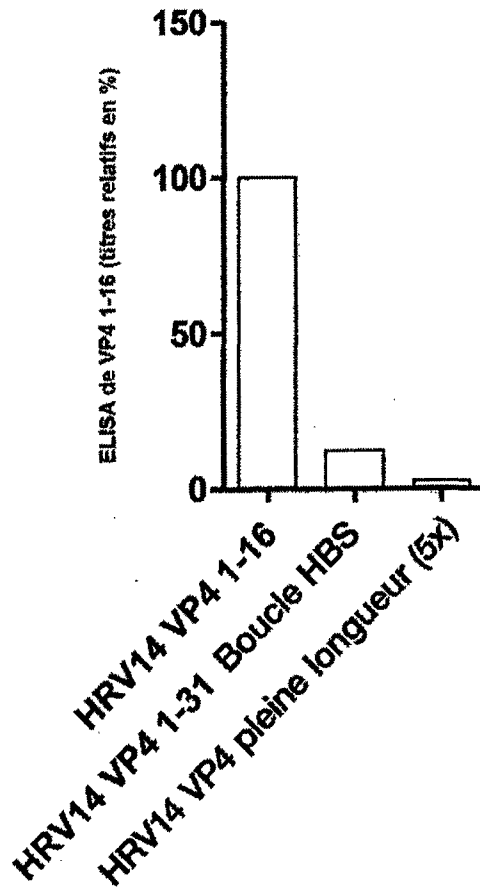


Figure 8 Alignement des peptides de HRV A VP1 qui sont similaires par alignement aux peptides 32 à 35 de HRV14

hrv1_A_B9V432	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv1b_A_P12916	:	FLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv2_A_P04936	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv7_A_A5GZF2	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv8_A_B9V434	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv9_A_B9V435	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv10_A_A5GZE7	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv11_A_A7KC06	:	PLLDAAETGHTSKV	:	14
hrv12_A_A7KC07	:	PLLDAAETGHTSQT	:	14
hrv13_A_B9V437	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv15_A_A5GZE2	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv16_A_Q82122	:	FVLDAAETGHTNKI	:	14
hrv18_A_B9V439	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv19_A_B9V440	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv20_A_B9V441	:	PLLDAAETGHTNQV	:	14
hrv21_A_B9V442	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv22_A_B9V443	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv23_A_A5GZE6	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv24_A_A7KC08	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv25_A_B9V444	:	FLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv28_A_A5GZF7	:	PLLDAAETGHTSQT	:	14
hrv29_A_B9V446	:	FLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv30_A_A5GZG1	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv31_A_B9V447	:	FLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv32_A_B9V448	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv33_A_B9V449	:	PLLDAAETGHTNNV	:	14
hrv34_A_A5GZF0	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv36_A_A5GZF4	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv38_A_A5GZE4	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv39_A_Q5XLP5	:	TLLDAAETGHTSSI	:	14
hrv40_A_B9V450	:	PLLDAAETGHTSNI	:	14
hrv41_A_A5GZE0	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv43_A_B9V452	:	PLLDAAETGHTSQV	:	14
hrv44_A_A5GZE8	:	FLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv45_A_B9V453	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv46_A_A5GZF5	:	PLLDAAETGHTSQI	:	14
hrv47_A_B9V454	:	FLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv49_A_A5GZE5	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv50_A_B9V456	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv51_A_B9V457	:	PLLDAAETGHTSQV	:	14
hrv53_A_A5GZF6	:	PLLDAAETGHTSQT	:	14
hrv54_A_B9V459	:	PLLDAAETGHTSGI	:	14
hrv55_A_A5GZG0	:	FVLDAAETGHTSNV	:	14
hrv56_A_B9V461	:	PLLDAAETGHTSAI	:	14
hrv57_A_B9V462	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv58_A_B9V463	:	PLLDAAETGHTSSV	:	14
hrv59_A_A5GZE9	:	PLLDAAETGHTSSI	:	14
hrv60_A_B9V464	:	PLLDAAETGHTSNV	:	14
hrv61_A_B9V465	:	FVLDAAETGHTSNV	:	14

hrv62_A_B9V466 : PILDAAETGHTSN : 14
 hrv63_A_B9V467 : PVLDAAEETGHTSNI : 14
 hrv64_A_A7KC09 : PILDAAETGHTSN : 14
 hrv65_A_B9V468 : PILDAAETGHTSQ : 14
 hrv66_A_B9V469 : PILDAAETGHTSK : 14
 hrv67_A_B9V470 : PILDAAETGHTSS : 14
 hrv68_A_B9V471 : PILDAAETGHTNO : 14
 hrv71_A_B9V473 : PILDAAETGHTNO : 14
 hrv73_A_A5GZE1 : PILDAAETGHTSG : 14
 hrv74_A_A5GZE3 : PILDAAETGHTSN : 14
 hrv75_A_A5GZF9 : PILDAAETGHTSH : 14
 hrv76_A_A5GZF1 : PILDAAETGHTSS : 14
 hrv77_A_B9V475 : PILDAAETGHTSS : 14
 hrv78_A_A7KC10 : PVLDAAEETGHTNO : 14
 hrv80_A_B9V477 : PILDAAETGHTSQ : 14
 hrv81_A_B9V478 : PVLDAAEETGHTSNI : 14
 hrv82_A_B9V481 : PILDAAETGHTST : 14
 hrv85_A_B9V484 : PILDAAETGHTSSI : 14
 hrv88_A_A5GZF3 : PILDAAETGHTSS : 14
 hrv89_A_B9V486 : PILDAAETGHTSS : 14
 hrv90_A_B9V488 : PILDAAETGHTSD : 14
 hrv94_A_A7KC11 : PILDAAETGHTSN : 14
 hrv95_A_B9V491 : PILDAAETGHTSS : 14
 hrv96_A_B9V492 : PVLDAAEETGHTSN : 14
 hrv98_A_B9V494 : PILDAAETGHTSGI : 14
 hrv100_A_B9V496 : PILDAAETGHTSN : 14
 hrv_A_A101 : PVLDAAEETGHTSQ : 14
 hrv_A_AMS323 : PILDAAETGHTNO : 14
 hrv_A_CU107 : PILDAAETGHTSQ : 14
 hrv_A_CU150 : PVLDAAEETGHTSNI : 14
 hrv_A_N13 : PILDAAETGHTSN : 14
 hrvA_A_A101v1 : PILDAAETGHTNOT : 14
 hrvA_A_A5GZF8 : PILDAAETGHTST : 14

Figure 9 Alignement des peptides de HRV B VP1 qui sont similaires par alignement aux peptides 32 à 45 de HRV14

*

hrv3_B_A5GZD4	:	PA	T	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14	
hrv4_B_A5GZD9	:	PA	T	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14	
hrv5_B_B9V433	:	PS	L	T	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv6_B_A5GZD5	:	PI	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	T	:	14
hrv14_B_P03303	:	PI	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	V	:	14
hrv17_B_A7KC12	:	PA	L	S	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv26_B_B9V445	:	PA	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	T	:	14
hrv27_B_A7KC13	:	PT	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv35_B_A5GZD6	:	PM	L	T	A	N	E	T	G	A	S	M	P	V	:	14
hrv35_B_B9V4A8	:	PT	L	T	A	N	E	T	G	A	S	M	P	V	:	14
hrv37_B_A7KC15	:	PT	L	T	A	N	E	T	G	A	I	M	P	T	:	14
hrv42_B_B9V451	:	PS	L	T	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv48_B_A5GZD7	:	PA	L	S	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv52_B_A7KC16	:	PA	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv69_B_B9V472	:	PA	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv70_B_A5GZD8	:	PA	L	S	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv72_B_B9V474	:	PT	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	V	:	14
hrv79_B_B9V476	:	PT	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	T	:	14
hrv83_B_B9V482	:	PI	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	T	:	14
hrv84_B_B9V483	:	PT	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	Q	T	:	14
hrv86_B_B9V485	:	PS	L	S	A	N	E	T	G	A	T	M	P	T	:	14
hrv91_B_B9V489	:	PA	L	S	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv92_B_B9V490	:	PT	L	T	A	N	E	T	G	A	T	M	P	T	:	14
hrv93_B_A7KC17	:	PT	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv97_B_B9V493	:	PT	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv99_B_B9V495	:	PA	L	T	A	N	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv_B_CU003	:	PA	L	S	A	S	E	T	G	A	T	L	P	T	:	14
hrv_B_CU211	:	PT	L	T	A	N	E	T	G	A	S	M	P	V	:	14

Figure 10 Alignement des peptides de HRV C VP1 qui sont similaires par alignement aux peptides 32 à 45 de HRV14

*

```

hrv_C_C15      : SI G M I S S N A : 14
hrv_C_024     : SA G M I S S T T : 14
hrv_C_025     : TA S M I S S D V : 14
hrv_C_026     : QA G V I T A D V : 14
hrv_C_CL170085 : TA S M I S S D V : 14
hrv_C_CU072   : TA G M I S S D A : 14
hrv_C_CU184   : QT G L I T A E I : 14
hrv_C_N10     : SA N M V V T P D V : 14
hrv_C_N4      : SA G M I S S S V : 14
hrv_C_NAT001  : QT G L I T A E I : 14
hrv_C_NAT045  : TV N M V V T P D A : 14
hrv_C_NY074   : QA G L I T A D V : 14
hrv_C_QCE     : QA G L I T A D L : 14
hrv_C_QPM     : QA G V I T A D V : 14

```

Figure 11 Alignement des peptides de HRV A VP4 qui sont similaires par alignement aux peptides 1 à 16 de HRV14

hrv1 A B9V432	:	:	16
hrv1b A P12916	:	:	16
hrv2 A P04936	:	:	16
hrv7 A A5GZF2	:	:	16
hrv8 A B9V434	:	:	16
hrv9 A B9V435	:	:	16
hrv10 A A5GZE7	:	:	16
hrv11 A A7KC06	:	:	16
hrv12 A A7KC07	:	:	16
hrv13 A B9V437	:	:	16
hrv15 A A5GZE2	:	:	16
hrv16 A Q82122	:	:	16
hrv18 A B9V439	:	:	16
hrv19 A B9V440	:	:	16
hrv20 A B9V441	:	:	16
hrv21 A B9V442	:	:	16
hrv22 A B9V443	:	:	16
hrv23 A A5GZE6	:	:	16
hrv24 A A7KC08	:	:	16
hrv25 A B9V444	:	:	16
hrv28 A A5GZF7	:	:	16
hrv29 A B9V446	:	:	16
hrv30 A A5GZG1	:	:	16
hrv31 A B9V447	:	:	16
hrv32 A B9V448	:	:	16
hrv33 A B9V449	:	:	16
hrv34 A A5GZF0	:	:	16
hrv36 A A5GZF4	:	:	16
hrv38 A A5GZE4	:	:	16
hrv39 A Q5XLP5	:	:	16
hrv40 A B9V450	:	:	16
hrv41 A A5GZE0	:	:	16
hrv43 A B9V452	:	:	16
hrv44 A A5GZE8	:	:	16
hrv45 A B9V453	:	:	16
hrv46 A A5GZF5	:	:	16
hrv47 A B9V454	:	:	16
hrv49 A A5GZE5	:	:	16
hrv50 A B9V456	:	:	16
hrv51 A B9V457	:	:	16
hrv53 A A5GZF6	:	:	16
hrv54 A B9V459	:	:	16
hrv55 A A5GZG0	:	:	16
hrv56 A B9V461	:	:	16
hrv57 A B9V462	:	:	16
hrv58 A B9V463	:	:	16
hrv59 A A5GZE9	:	:	16
hrv60 A B9V464	:	:	16
hrv61 A B9V465	:	:	16
hrv62 A B9V466	:	:	16
hrv63 A B9V467	:	:	16
hrv64 A A7KC09	:	:	16
hrv65 A B9V468	:	:	16
hrv66 A B9V469	:	:	16
hrv67 A B9V470	:	:	16
hrv68 A B9V471	:	:	16
hrv71 A B9V473	:	:	16
hrv73 A A5GZE1	:	:	16
hrv74 A A5GZE3	:	:	16
hrv75 A A5GZF9	:	:	16
hrv76 A A5GZF1	:	:	16

hrv77	A	B9V475	:		:	16
hrv78	A	A7KC10	:		:	16
hrv80	A	B9V477	:		:	16
hrv81	A	B9V478	:		:	16
hrv82	A	B9V481	:		:	16
hrv85	A	B9V484	:		:	16
hrv88	A	A5GZF3	:		:	16
hrv89	A	B9V486	:		:	16
hrv90	A	B9V488	:		:	16
hrv94	A	A7KC11	:		:	16
hrv95	A	B9V491	:		:	16
hrv96	A	B9V492	:		:	16
hrv98	A	B9V494	:		:	16
hrv100	A	B9V496	:		:	16
hrv	A	A101	:		:	16
hrv	A	AMS323	:		:	16
hrv	A	CU107	:		:	16
hrv	A	CU150	:		:	16
hrv	A	N13	:		:	16
hrvA	A	A101v1	:		:	16
hrvA_A	A	A5GZF8	:		:	16

Figure 12 Alignement des peptides de HRV B VP4 qui sont similaires par alignement aux peptides 1 à 16 de HRV14

hrv3 B A5GZD4	:		:	16
hrv4 B A5GZD9	:		:	16
hrv5 B B9V433	:		:	16
hrv6 B A5GZD5	:		:	16
hrv14 B P03303	:		:	16
hrv17 B A7KC12	:		:	16
hrv26 B B9V445	:		:	16
hrv27 B A7KC13	:		:	16
hrv35 B A5GZD6	:		:	16
hrv37 B A7KC15	:		:	16
hrv42 B B9V451	:		:	16
hrv48 B A5GZD7	:		:	16
hrv52 B A7KC16	:		:	16
hrv69 B B9V472	:		:	16
hrv70 B A5GZD8	:		:	16
hrv72 B B9V474	:		:	16
hrv79 B B9V476	:		:	16
hrv83 B B9V482	:		:	16
hrv84 B B9V483	:		:	16
hrv86 B B9V485	:		:	16
hrv91 B B9V489	:		:	16
hrv92 B B9V490	:		:	16
hrv93 B A7KC17	:		:	16
hrv97 B B9V493	:		:	16
hrv99 B B9V495	:		:	16
hrv B CU003	:		:	16
hrv_B_CU211	:		:	16

Figure 13 Alignement des peptides de HRV C VP4 qui sont similaires par alignement aux peptides 1 à 16 de HRV14

hrv C C15	:	R	NN	T	NGV	:	16
hrv C 024	:	K	N		NSV	:	16
hrv C 025	:	K	N		SGI	:	16
hrv C 026	:	R	S		TMI	:	16
hrv C CL170085	:	K	N		SGI	:	16
hrv C CU072	:	K	N		NTV	:	16
hrv C CU184	:	R	S		TMI	:	16
hrv C N10	:	R	K		DNAI	:	16
hrv C N4	:	K	NT		SAI	:	16
hrv C NAT001	:	R	S		TMI	:	16
hrv C NAT045	:	K	N		NSV	:	16
hrv C NY074	:	K	S		TMV	:	16
hrv C QCE	:	R	S		TMI	:	16
hrv_C_QFM	:	R	S		TMI	:	16

Figure 14 Alignement des résidus N-termin. Des protéines VP1 de certains picornavirus. Les peptides similaires à HRV14 sont marqués dans l'encadré.

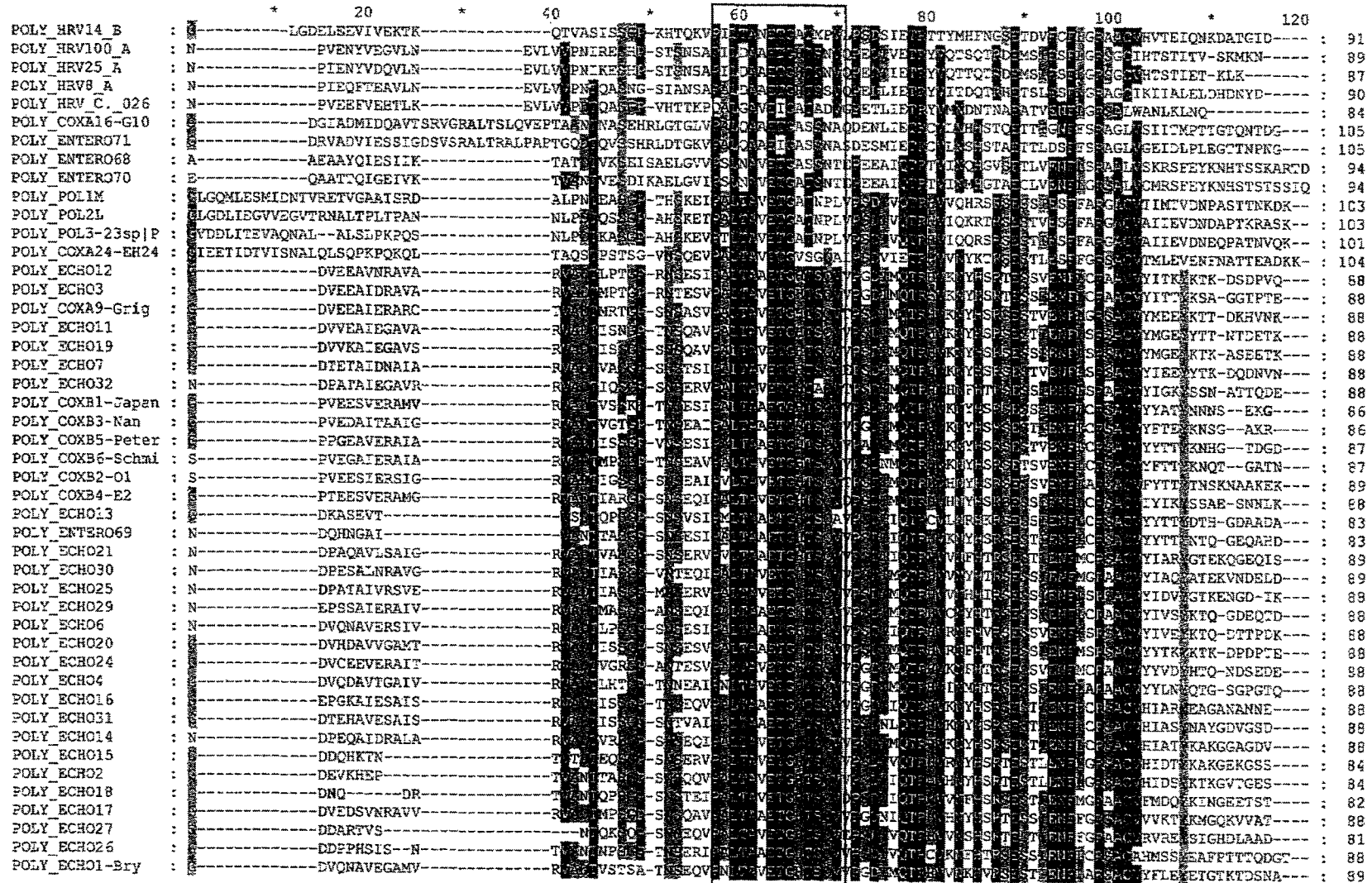
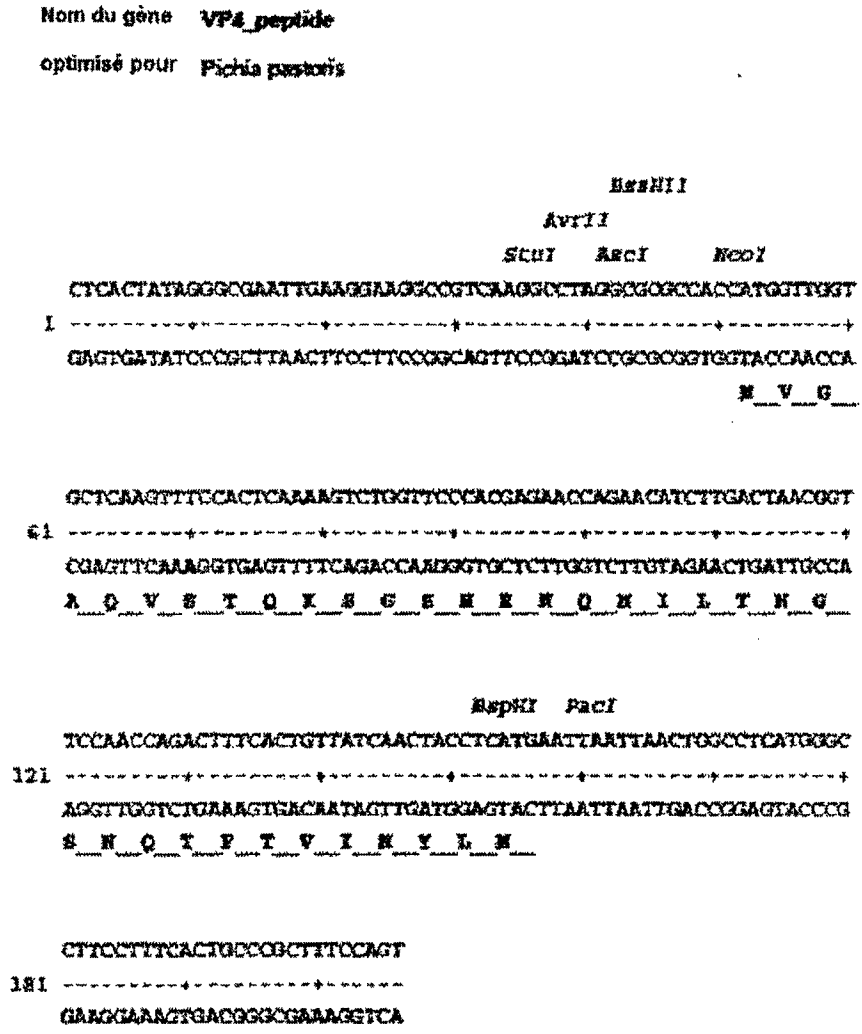


Figure 16:

A. Carte de l'ADN synthétique de VP4 et du plasmide peptide VP4-pMK



B. Carte du plasmide peptide VP4-pMK

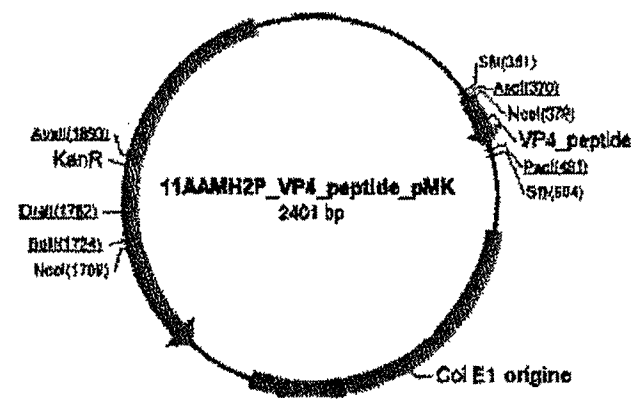


Figure 17 Séquences de fusion VP4-S**1. Séquence de nucléotides**

gène de fusion VP4-S : 792 pb

```

1  ATGGTTGGTG  CTCAGSTTC  CACTCAAAG  TCTGGTCCC  ACCAGAACCA  GAACATCTG
61  ACTAAGGGTT  CCAACDAGAC  TTCACCTGTT  ATCAACTACC  CCGTGGCCCA  CATGGAAAAC
121  ATCACCTCTG  GTTCTTGGG  TCCATTATTG  GTTTTACAAG  CTGGTTTCTT  CTTGTTGACC
181  AGAATTTTAA  CTATPCCACA  ATCTTTGGAC  TCATGGTGGA  CCTCCTTGAA  CTTCTTGGGT
241  GGTTCTCCAG  TTTGTTTGGG  TCAAAACTCC  CAATCCCCAA  CTTCCAACCA  TTCTCCTACT
301  TCTTGTCAC  CAATCTGTCC  AGGTTACAGA  TGGATGTGTT  TGAGAAGATT  TATCATTTTC
361  TTGTTTATCC  TATTGTTGTG  TTTGATCTTC  CTATTGGTTT  TGTTGGATTA  CCAAGGTATG
421  TTACCAGTTT  GTCCATTGAT  CCCAGGTTCC  ACTACTACCA  ACACTGGTCC  ATGTAAGACC
481  TGTACTACTC  CAGCTCAAGG  TAACTCAATG  TTTCCATCTT  GTTGTGTGAC  CAAGCCAACC
541  GACGGTAACT  GTACTTGTAT  CCCAATTCCA  TCTTCCTGGG  CTTTCGCTAA  GTACTTGTGG
601  GAATGGGCTT  CCGTTAGATT  CTCTTGGTTG  TCTTTGTTGG  TTCCATTCTG  TCAATGGTTC
661  GTPGGTTTGT  CCCCACCCTG  CTGGTTGTCT  GCTATCTGGA  TGATGTGGTA  CTGGGGTCCA
721  TCTTGTACT  CTATCGTCTC  TCCATTCTAT  CCATTGTTAC  CAATCTTCTT  CTGTTTGTGG
781  GCTACATTT  AA

```

Caractères gras : 2 acides aminés introduits par construction génétique

Italique : souche HRV14 de rhinovirus humain : peptide (31aa) dérivé de VP4, protéine de capside

Minuscules : 4 acides aminés de pré-S2

Noir : protéine S (HBsAg)

2. Séquence d'acides aminés

Protéine de fusion VP4-S : 263aa

```

1  M V G A Q V S T Q K  S S H E N Q N I L  E M G S N Q T F T V  I N Y P V E R M E N  I T S G F L G P L L  V L Q A G F F L L T
61  R I L T I P Q S L D  S W N T S L N F L G  G S P V C L G Q N S  Q S P T S N H S P T  S C P I C P G Y R  W M C L R R F I I F
121  L F I L L L C L I F  L L V L L D Y Q G M  L P V C P L I P G S  T T T N T G P C K T  C T T P A Q G N S M  F P S C C C T K P T
181  D G N C I C I P I P  S S W A F A K Y L W  E W A S V R E S W L  S L L V P F V Q W E  V G L S P T V W L S  A I W M M W Y W G F
241  S L Y S I V S P F I  F L L P I F F C L W  V Y I

```

Caractères gras : 2 acides aminés introduits par construction génétique

Italique : souche HRV14 de rhinovirus humain : peptide (31aa) dérivé de VP4, protéine de capside

Minuscules : 4 acides aminés de pré-S2

Noir : protéine S (HBsAg)

Figure 18 Séquences Sco

1. Séquence de nucléotides

```

1 ATGGTTGAGA ACATCACTTC CGGTTTCTTG GGACCATTGT TGGTTTTGCA GGCTGGATTG
61 TTCTTATTGA CTAGAACTCT GACTATCCCA CAGTCTTTGG ACTCTTGGT GACTTCCTTG
121 AACTTCTTGG GAGGTTCTCC AGTTTGTTTG GGACAAAAC CCCAATCTCC AACTTCTAAC
181 CACTCCCCAA CTTCAATGTC ACCAATCTGT CCAGGTTACA GATGGATGT TTTGAGAAGA
241 TTCATCATT TCTTGTTTCA CTTGTTGTTG TGTGTTGATCT TCTTGTGGT TTTGTTGGAC
301 TACCAGGGAA TGTGCCCAGT TTGTCCATTG ATTCCAGGTT CCACTACTAC AAACACTGGT
361 CCATGTAAGA CTTGTACTAC TCCAGCTCAG GGAAACTCTA TGTCCCACAT CTGTTGTTGT
421 ACTAAGCCAA CTGACGGTAA CTGTAATTGT ATCCCAATTC CATCCTCTG GGCTTTGGCT
481 AAGTACTTGT GGGAAATGGC TTCTGTTAGA TTCTCCTGGT TGTCTTGTG GGTTCCTTC
541 GTTCAGTGGT TCGTTGGTTT GTCTCCAAC GTTTGGTGT CCGCTATCTG GATGATGTGG
601 TACTGGGGAC CATCTTTGTA CTCATCGTT TCCCATTCA TCCCATTGT GCCAATCTTT
661 TTCTGTTTGT GGGTTTACAT CTAG

```

2. Séquence d'acides aminés

```

1 MVENITSGFL GELLVLQAGF FLTRILTIQ QSLDSWWTSL NFLGGSPVCL GONSQSPTSN
61 HSPTSCPPIC PGYRMMCLRR FIIFLFILL CLIFLLVLLD YQGMPLVCP I PGSTTTNTG
121 PKTCTTPAQ GNSMFPSCCC TKPTDGNCTC IPIPSSWAF KYLWENASVR FSWLSLLVPF
181 VQWFVGLSPT VWLSAIWMMW YWGPSLYSIV SFFIPLLEIF FCLWVYI

```


Figure 20 Carte de plasmide du vecteur recombinant PHIL-D2mod/VP4-S

L'intégration a été réalisée en coupant le plasmide recombinant avec une enzyme de restriction *NotI*. Le fragment *NotI* contenant la cassette d'expression de VP4-S plus le marqueur de sélection ont été utilisés pour transformer la souche GS115

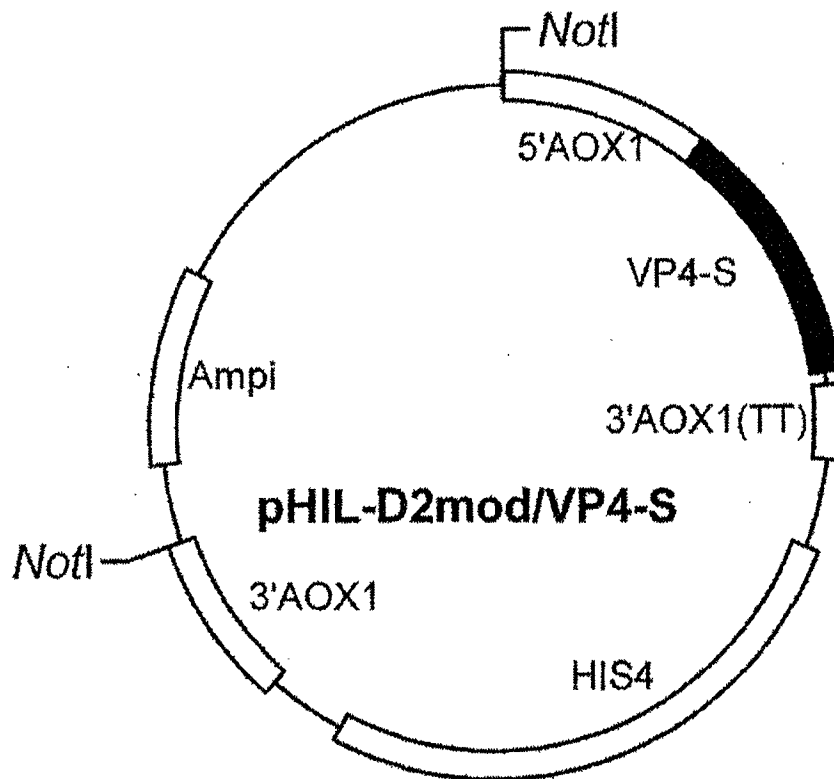


Figure 21 Carte de plasmide du vecteur recombinant PHIL-D2mod/S

L'intégration a été réalisée en coupant le plasmide recombinant avec une enzyme de restriction *NotI*. Le fragment *NotI* contenant la cassette d'expression de S plus le marqueur de sélection ont été utilisés pour transformer la souche GS115

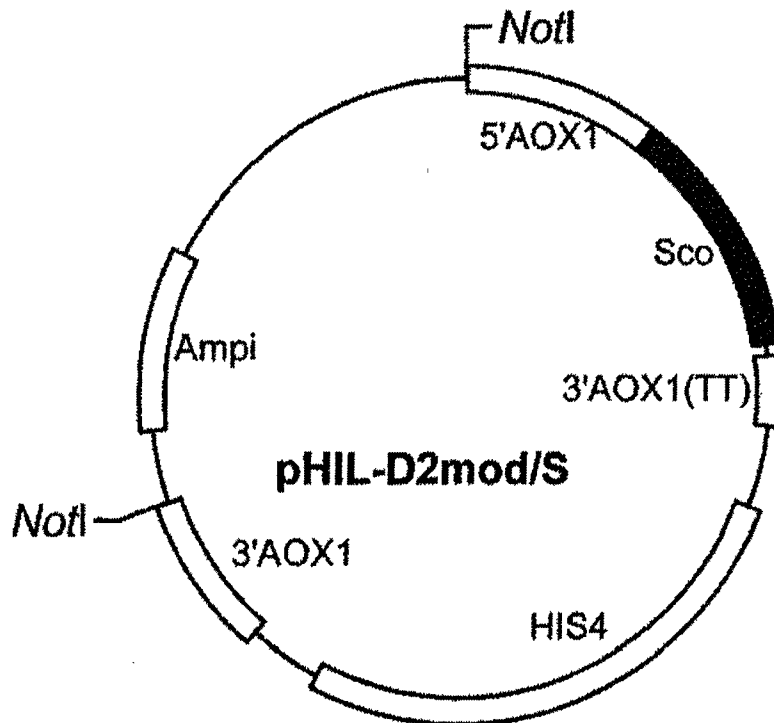


Figure 22 Analyse à gradient de CsCl

Souche 49 (VP4-S,S)

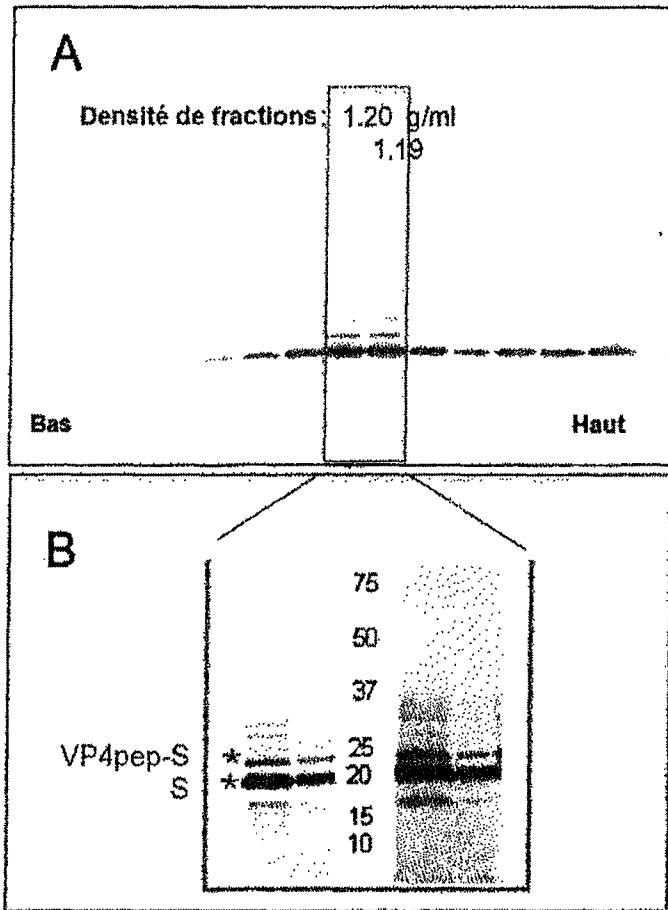
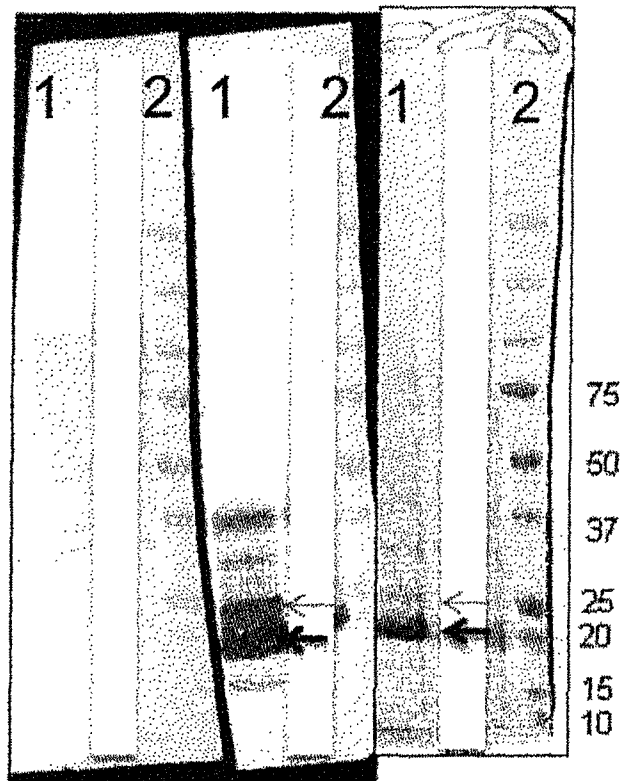


Figure 23 Masse purifiée de BMP 201

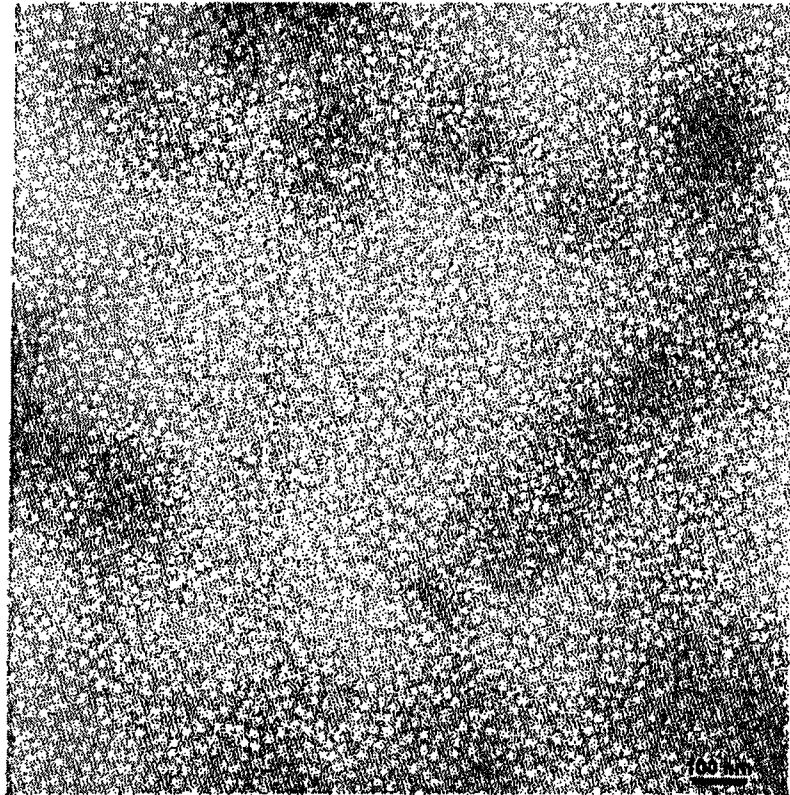


WB anti-levure WB anti-S Coomassie

1: BMP201

2: Marqueur PM

Figure 24 Analyse au ME réalisée sur BMP 201.



Coloration négative à l'acide phosphotungstique

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ETABLI EN VERTU DE L'ARTICLE 21 § 9 DE LA LOI BELGE SUR LES BREVETS D'INVENTION DU 28 MARS 1984

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE	REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE		
	BPGSKL003BE00		
Demande nationale belge n°	Date du dépôt		
2014/00161	13-03-2014		
	Date de priorité revendiquée		
	15-03-2013		
Déposant (Nom)			
GlaxoSmithKline Biologicals s.a.			
Date de la requête d'une recherche de type international	Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international		
20-05-2014	SN 62023		
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
A61K39/125	C07K7/08	C07K14/095	
II. DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification	Symboles de la classification		
IPC	A61K	C07K	C12N
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. <input type="checkbox"/> IL A ETE ESTIME QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV. <input checked="" type="checkbox"/> ABSENCE D'UNITE DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE A L'ETENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K39/125 C07K7/08 C07K14/095 ADD.</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>		
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61K C07K C12N</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
<p>Catégorie *</p>	<p>Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</p>	<p>no. des revendications visées</p>
<p>X</p>	<p>ABSENCE D'UNITE D'INVENTION voir feuille supplémentaire B ----- WO 2008/057158 A2 (ACAMBIS INC [US]; KALNIN KIRILL [US]; YAN YANHUA [US]; KLEANTHOS HARO) 15 mai 2008 (2008-05-15)</p> <p>* page 9, ligne 7 - page 11, ligne 2; revendications; figures 4,15; exemples * * page 11, ligne 5 - page 15, ligne 21 * ----- -/--</p>	<p>1,2,4-9, 14, 16-18, 20-22, 24,50-55</p>
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p>		
<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou sous autres moyens. "P" document publié avant la date de dépôt, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>		
<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<p>Date à laquelle la recherche de type international a été effectivement achevée</p> <p>19 septembre 2014</p>		<p>Date d'expédition du rapport de recherche de type international</p>
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>Loubradou, Gabriel</p>

C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,D	<p>U. KATPALLY ET AL: "Antibodies to the Buried N Terminus of Rhinovirus VP4 Exhibit Cross-Serotypic Neutralization", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 83, no. 14, 15 juillet 2009 (2009-07-15), pages 7040-7048, XP055066241, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00557-09 cité dans la demande * abrégé; figures 6,8 * * page 7046, colonne de gauche, alinéa 2 - page 7048, colonne de gauche, alinéa 1 *</p>	<p>1-7, 10-25, 50-55</p>
A	<p>EP 0 358 485 A2 (WELLCOME FOUND [GB]) 14 mars 1990 (1990-03-14) * revendications; figure 1; exemples *</p>	<p>1-25, 50-55</p>
A	<p>WO 92/03475 A1 (REPLICO MEDICAL AB [SE]) 5 mars 1992 (1992-03-05) * revendication 1 *</p>	<p>1-25, 50-55</p>
A,D	<p>MCCRAY J ET AL: "DIFFERENT RHINOVIRUS SEROTYPES NEUTRALIZED BY ANTIPEPTIDE ANTIBODIES", NATURE (LONDON), vol. 329, no. 6141, 1987, pages 736-738, XP002725976, ISSN: 0028-0836 cité dans la demande * abrégé; tableau 2 *</p>	<p>1-25, 50-55</p>
A,D	<p>EDLMAYR J ET AL: "Antibodies induced with recombinant VP1 from human rhinovirus exhibit cross-neutralisation", EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, WILEY INTERSCIENCE, vol. 37, no. 1, 1 janvier 2011 (2011-01-01), pages 44-52, XP008132310, ISSN: 1399-3003, DOI: 10.1183/09031936.00149109 cité dans la demande * abrégé * * page 51, colonne de gauche, alinéa 3 - colonne de droite, alinéa 1 *</p>	<p>1-25, 50-55</p>
	<p>----- -/--</p>	

C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LIU J N ET AL: "Combined peptides of human enterovirus 71 protect against virus infection in mice", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 46, 28 octobre 2010 (2010-10-28), pages 7444-7451, XP027434001, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.08.080 [extrait le 2010-09-08] * abrégé * * page 7450, colonne de gauche, alinéa 2 *</p>	<p>1-25, 50-55</p>
A	<p>DELPEYROUX F ET AL: "Structural factors modulate the activity of antigenic poliovirus sequences expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 64, no. 12, 1 janvier 1990 (1990-01-01), pages 6090-6100, XP002979831, ISSN: 0022-538X * abrégé; figures 1,6 * * page 6095, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 *</p>	<p>17-19</p>
A	<p>WO 2006/029887 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; COHEN JOSEPH D [BE]; TORNIEPORTH NADIA) 23 mars 2006 (2006-03-23) * page 5, ligne 15 - page 6, ligne 18 * * page 15, ligne 19 - ligne 24 *</p>	<p>17-19</p>
A	<p>PUMPENS P ET AL: "EVALUATION OF HBS, HBC, AND FRCP VIRUS-LIKE PARTICLES FOR EXPRESSION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 E7 ONCOPROTEIN EPITOPES", INTERVIROLOGY, KARGER, CH, vol. 45, no. 1, 1 janvier 2002 (2002-01-01), pages 24-32, XP008026494, ISSN: 0300-5526, DOI: 10.1159/000050084 * abrégé; figure 1 *</p>	<p>17-19</p>

-/--

C (suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>KOTIW MICHAEL ET AL: "Immunological response to parenteral vaccination with recombinant hepatitis B virus surface antigen virus-like particles expressing Helicobacter pylori KatA epitopes in a murine H. pylori challenge model.", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY : CVI FEB 2012, vol. 19, no. 2, février 2012 (2012-02), pages 268-276, XP002729859, ISSN: 1556-679X * page 269, colonne de gauche, dernière ligne - colonne de droite, ligne 1 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	17-19
A	<p>ZHANG Y-L ET AL: "Enhanced immunogenicity of modified hepatitis B virus core particle fused with multiepitopes of foot-and-mouth disease virus", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, BLACKWELL SCIENCE PUBL., OXFORD, GB, vol. 65, no. 4, 1 avril 2007 (2007-04-01), pages 320-328, XP009136276, ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/J.1365-3083.2007.01900.X [extrait le 2007-03-22] * abrégé *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25, 50-55

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

Numéro de la demande
SN 62023
BE 201400161

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

1. revendications: 1-25, 55(complètement); 50-54(en partie)
Objet des revendications 1 à 25 et 55, et objet des revendications 50 à 54 dans la mesure où il se réfère aux revendications 1 à 25.

2. revendications: 26-28, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 26 à 28 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID N0:5.

3. revendications: 26-28, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 26 à 28 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID N0:6.

4. revendications: 26-28, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 26 à 28 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID N0:7.

5. revendications: 29-31, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 29 à 31 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID N0:1.

6. revendications: 29-31, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 29 à 31 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID N0:2

7. revendications: 29-31, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 29 à 31 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID N0:3.

8. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)
Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est HBsAg et objet des revendications 49 à 54 correspondant.

9. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)

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

Numéro de la demande

SN 62023
BE 201400161

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

Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est HPV L1 et objet des revendications 49 à 54 correspondant.

10. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)

Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est une protéine structurale de rhinovirus et où le peptide provient de la région N-terminale de picornavirus VP4 et objet des revendications 49 à 54 correspondant.

11. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)

Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est une protéine structurale de rhinovirus et où le peptide provient de la région N-terminale de picornavirus VP1 et objet des revendications 49 à 54 correspondant.

La recherche a été limitée au premier sujet.

Il est fait référence aux documents suivants :

D1: U. KATPALLY ET AL: "Antibodies to the Buried N Terminus of Rhinovirus VP4 Exhibit Cross-Serotypic Neutralization", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 83, no. 14, 15 juillet 2009 (2009-07-15), pages 7040-7048, XP055066241, ISSN: 0022-538X, DOI:10.1128/JVI.00557-09, cité dans la demande

D2: EP 0 358 485 A2 (WELLCOME FOUND [GB]) 14 mars 1990 (1990-03-14)

D3: WO 92/03475 A1 (REPLICO MEDICAL AB [SE]) 5 mars 1992 (1992-03-05)

D4: WO 2008/057158 A2 (ACAMBIS INC [US]; KALNIN KIRILL [US]; YAN YANHUA [US]; KLEANTHOUS HARO) 15 mai 2008 (2008-05-15)

D5: MCCRAY J ET AL: "DIFFERENT RHINOVIRUS SEROTYPES NEUTRALIZED BY ANTIPEPTIDE ANTIBODIES", NATURE (LONDON), vol. 329, no. 6141, 1987, pages 736-738, XP002725976, ISSN: 0028-0836, cité dans la demande

Les raisons pour lesquelles les inventions ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général sont les suivantes :

Lorsqu'une pluralité d'inventions est revendiquée dans une demande de brevet, il n'est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention que s'il existe une relation technique entre ces inventions, portant sur un ou plusieurs éléments techniques particuliers identiques ou correspondants. L'expression "éléments techniques particuliers" s'entend des éléments techniques qui déterminent une contribution de chacune des inventions revendiquées, considérée comme un tout, par rapport à l'état de la technique.

Les inventions 1 à 11 ont en commun l'élément technique de se rapporter à un épitope d'une protéine structurale de picornavirus (élément technique

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

Numéro de la demande

SN 62023
BE 201400161

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

A).

Les inventions 2 à 4 ont en commun l'élément technique de se rapporter à des peptides d'une région particulière de VP4 d'un rhinovirus humain (élément technique B).

Les inventions 5 à 7 ont en commun l'élément technique de se rapporter à des peptides d'une région particulière de VP1 d'un rhinovirus humain (élément technique C).

Les inventions 8 à 11 ont en commun les éléments techniques de la revendication 32 (éléments techniques D).

Les inventions 10 et 11 ont en commun les éléments technique de la revendication 32 dans laquelle la protéine squelette est une protéine structurale de rhinovirus (éléments techniques E).

Aucun de ces éléments techniques n'est considéré comme représentant un "élément technique particulier" car ils sont anticipés par un ou plusieurs des documents D1 à D4 :

- D1 décrit le peptide CT4 qui a la séquence du présent SEQ ID NO: 5 ainsi que des variants de CT4 ayant des acides aminés supplémentaires en position C-terminale (cf. D1, Figure 8). D1 anticipe donc les éléments techniques A et B.

- D2 décrit le peptide correspondant aux résidus 32 à 41 de VP1 de HRV2 (i.e. PALDAAETGH (cf. D2: figure 1)) ainsi que des peptides comprenant la séquence correspondante et ayant jusqu'à 40 acides aminés (cf. D2, revendications 3 et 7). Le peptide PALDAAETGH anticipe les définitions de la revendication 31 fondées sur les peptides de SEQ ID NO: 2 et 3 (délétion de 4 résidus en position C-terminale et, délétion de 4 résidus en position C-terminale et substitution d'un résidu, respectivement). D2 décrit également des vaccins comprenant ledit peptide. D2 anticipe donc les éléments techniques A et C.

- D3 décrit des peptides qui ont au plus 35 acides aminés et qui comprennent les séquences A[A/V]ETGHTSNV ou AAETGHTS[S/N]V (cf. D3, revendication 1). Ces peptides anticipent les définitions de la revendication 31 fondées sur les peptide de SEQ ID NO: 2 et 3 (dans les deux cas, délétion de 4 résidus en position N-terminale). D3 anticipe donc les éléments techniques A et C.

- D4 décrit des protéines VP1 chimériques ayant l'épitope NimIV interverti entre les sérotypes 14 et 6 (CR6), et les sérotypes 14 et 72 (CR72) (cf. D4, les exemples). Ces protéines chimériques comprennent plusieurs peptides ayant des épitopes neutralisants: NimI, NimII et NimIII de HRV14, NimIV de HRV6 ou HRV72, le peptide de SEQ ID NO: 1 (provenant de HRV14) ainsi que tout autre épitope neutralisant présent sur la protéine VP1 de HRV14 (par exemple le peptide MYVPPGAPNP (position 151-160) (cf. D5, l'abrégé et le tableau 2)). D4 anticipe donc les éléments techniques A, D et E.

En conclusion, les groupes d'inventions ne sont pas liés entre eux par des caractéristiques techniques particulières communes ou correspondantes et ils définissent 11 inventions différentes qui ne sont pas liées par un seul concept inventif général. La présente demande ne satisfait donc pas aux exigences d'unité de l'invention.

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n°

BE 201400161

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
W0 2008057158	A2	15-05-2008	AU 2007318206 A1	15-05-2008
			BR P10719443 A2	10-12-2013
			CA 2664628 A1	15-05-2008
			CN 101678095 A	24-03-2010
			EP 2066343 A2	10-06-2009
			EP 2548573 A1	23-01-2013
			JP 2010504759 A	18-02-2010
			KR 20090092764 A	01-09-2009
			US 2010297169 A1	25-11-2010
			US 2014161833 A1	12-06-2014
			W0 2008057158 A2	15-05-2008
			ZA 200901993 A	28-07-2010
			EP 0358485	A2
DK 442189 A	09-03-1990			
EP 0358485 A2	14-03-1990			
JP H02223594 A	05-09-1990			
ZA 8906820 A	27-06-1990			
W0 9203475	A1	05-03-1992	AU 649473 B2	26-05-1994
			AU 8400291 A	17-03-1992
			EP 0546031 A1	16-06-1993
			SE 470074 B	01-11-1993
			W0 9203475 A1	05-03-1992
W0 2006029887	A2	23-03-2006	AU 2005284223 A1	23-03-2006
			BR P10515334 A	22-07-2008
			CA 2579527 A1	23-03-2006
			CN 101056653 A	17-10-2007
			CN 104027795 A	10-09-2014
			EP 1791558 A2	06-06-2007
			JP 2008513400 A	01-05-2008
			JP 2012116849 A	21-06-2012
			KR 20070052342 A	21-05-2007
			MA 28885 B1	03-09-2007
			RU 2007109608 A	27-10-2008
			SG 159520 A1	30-03-2010
			SG 193159 A1	30-09-2013
			US 2008102091 A1	01-05-2008
			W0 2006029887 A2	23-03-2006



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN62023	Date du dépôt (jour/mois/année) 13.03.2014	Date de priorité (jour/mois/année) 15.03.2013	Demande n° BE201400161
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A61K39/125 C07K7/08 C07K14/095			
Déposant GlaxoSmithKline Biologicals s.a.			

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

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

Cadre n°1 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 internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

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

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

- l'ensemble de la demande
- les revendications nos 26-49, 56(complètement); 50-54(en partie)

parce que :

- la demande ou les revendications nos. en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue d'effectuer une recherche:
- les revendications, la description, ou les dessins ou les revendications nos. en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable :
- les revendications, ou les revendications nos en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable :
- il n'a pas été établi de rapport de recherche pour toute la demande ou pour les revendications nos 26-49, 56(complètement); 50-54(en partie) en question.
- une opinion valable n'a pas pu être formulée en l'absence d'un listage, le cas échéant sous format conforme à la norme internationale (OMPI ST.25), des séquences de nucléotides ou d'acides aminés.
- une opinion valable n'a pas pu être formulée en l'absence des tableaux relatifs au listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés, ou ceux-ci n'étant pas fournis sous forme électronique selon la norme internationale (OMPI ST.25).
- Voir le cadre supplémentaire pour de plus amples détails.

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

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

voir feuille séparée

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

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

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE201400161

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	3, 10-13, 15, 19, 23, 25
	Non : Revendications	1, 2, 4-9, 14, 16-18, 20-22, 24, 55(complètement); 50-54(en partie)
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-25, 55(complètement); 50-54(en partie)
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-25, 55(complètement); 50-54(en partie)
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Il est fait référence aux documents suivants :

- D1 U. KATPALLY ET AL: "Antibodies to the Buried N Terminus of Rhinovirus VP4 Exhibit Cross-Serotypic Neutralization",
JOURNAL OF VIROLOGY,
vol. 83, no. 14, 15 juillet 2009 (2009-07-15), pages 7040-7048,
XP055066241,
ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00557-09
cité dans la demande
- D2 EP 0 358 485 A2 (WELLCOME FOUND [GB]) 14 mars 1990 (1990-03-14)
- D3 WO 92/03475 A1 (REPLICO MEDICAL AB [SE]) 5 mars 1992
(1992-03-05)
- D4 WO 2008/057158 A2 (ACAMBIS INC [US]; KALNIN KIRILL [US]; YAN
YANHUA [US]; KLEANTHOS HARO) 15 mai 2008 (2008-05-15)
- D5 MCCRAY J ET AL: "DIFFERENT RHINOVIRUS SEROTYPES
NEUTRALIZED BY ANTIPEPTIDE ANTIBODIES",
NATURE (LONDON),
vol. 329, no. 6141, 1987, pages 736-738, XP002725976,
ISSN: 0028-0836
cité dans la demande
- D6 EDLMAYR J ET AL: "Antibodies induced with recombinant VP1 from
human rhinovirus exhibit cross-neutralisation",
EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, WILEY INTERSCIENCE,
vol. 37, no. 1, 1 janvier 2011 (2011-01-01), pages 44-52, XP008132310,
ISSN: 1399-3003, DOI: 10.1183/09031936.00149109
cité dans la demande
- D7 LIU J N ET AL: "Combined peptides of human enterovirus 71 protect
against virus infection in mice",
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB,
vol. 28, no. 46, 28 octobre 2010 (2010-10-28), pages 7444-7451,
XP027434001,
ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.08.080
[extrait le 2010-09-08]

- D8 DELPEYROUX F ET AL: "Structural factors modulate the activity of antigenic poliovirus sequences expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles",
JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US,
vol. 64, no. 12, 1 janvier 1990 (1990-01-01), pages 6090-6100,
XP002979831,
ISSN: 0022-538X
- D9 WO 2006/029887 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; COHEN JOSEPH D [BE]; TORNIEPORTH NADIA) 23 mars 2006 (2006-03-23)
- D10 PUMPENS P ET AL: "EVALUATION OF HBS, HBC, AND FRCP VIRUS-LIKE PARTICLES FOR EXPRESSION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 E7 ONCOPROTEIN EPITOPES",
INTERVIROLOGY, KARGER, CH,
vol. 45, no. 1, 1 janvier 2002 (2002-01-01), pages 24-32, XP008026494,
ISSN: 0300-5526, DOI: 10.1159/000050084
- D11 KOTIW MICHAEL ET AL: "Immunological response to parenteral vaccination with recombinant hepatitis B virus surface antigen virus-like particles expressing Helicobacter pylori KatA epitopes in a murine H. pylori challenge model.",
CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY : CVI FEB 2012,
vol. 19, no. 2, février 2012 (2012-02), pages 268-276, XP002729859,
ISSN: 1556-679X

Ad point IV

Absence d'unité de l'invention

- 1 On considère qu'il existe 11 inventions couvertes par les revendications suivantes :
1. revendications: 1-25, 55(complètement); 50-54(en partie)
Objet des revendications 1 à 25 et 55, et objet des revendications 50 à 54 dans la mesure où il se réfère aux revendications 1 à 25.

2. revendications: 26-28, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 26 à 28 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID NO:5.
3. revendications: 26-28, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 26 à 28 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID NO:6.
4. revendications: 26-28, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 26 à 28 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID NO:7.
5. revendications: 29-31, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 29 à 31 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID NO:1.
6. revendications: 29-31, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 29 à 31 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID NO:2
7. revendications: 29-31, 49-54(toutes en partie)
Objet des revendications 29 à 31 et 49 à 54 dans la mesure où le peptide est le peptide du SEQ ID NO:3.
8. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)
Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est HBsAg et objet des revendications 49 à 54 correspondant.
9. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)
Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est HPV L1 et objet des revendications 49 à 54 correspondant.
10. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)
Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est une protéine structurale de rhinovirus et où le peptide provient de la région N-terminale de picornavirus VP4, et objet des revendications 49 à 54 correspondant.

11. revendications: 32-54, 56(toutes en partie)

Objet des revendications 32 à 49 et 56 dans la mesure où le polypeptide de squelette est une protéine structurale de rhinovirus et où le peptide provient de la région N-terminale de picornavirus VP1, et objet des revendications 49 à 54 correspondant.

- 1.1 Les raisons pour lesquelles les inventions ne sont pas liées entre elles de telle sorte qu'elles ne forment qu'un seul concept inventif général sont les suivantes :

Lorsqu'une pluralité d'inventions est revendiquée dans une demande de brevet, il n'est satisfait à l'exigence d'unité de l'invention que s'il existe une relation technique entre ces inventions, portant sur un ou plusieurs éléments techniques particuliers identiques ou correspondants. L'expression "éléments techniques particuliers" s'entend des éléments techniques qui déterminent une contribution de chacune des inventions revendiquées, considérée comme un tout, par rapport à l'état de la technique.

Les inventions 1 à 11 ont en commun l'élément technique de se rapporter à un épitope d'une protéine structurale de picornavirus (élément technique A).

Les inventions 2 à 4 ont en commun l'élément technique de se rapporter à des peptides d'une région particulière de VP4 d'un rhinovirus humain (élément technique B).

Les inventions 5 à 7 ont en commun l'élément technique de se rapporter à des peptides d'une région particulière de VP1 d'un rhinovirus humain (élément technique C).

Les inventions 8 à 11 ont en commun les éléments techniques de la revendication 32 (éléments techniques D).

Les inventions 10 et 11 ont en commun les éléments techniques de la revendication 32 dans laquelle la protéine squelette est une protéine structurale de rhinovirus (éléments techniques E).

Aucun de ces éléments techniques n'est considéré comme représentant un "élément technique particulier" car ils sont anticipés par un ou plusieurs des documents D1 à D4 :

- D1 décrit le peptide CT4 qui a la séquence du présent SEQ ID NO: 5 ainsi que des variants de CT4 ayant des acides aminés supplémentaires en position C-terminale (cf. D1, Figure 8). D1 anticipe donc les éléments techniques A et B.

- D2 décrit le peptide correspondant aux résidus 32 à 41 de VP1 de HRV2 (i.e. PALDAAETGH (cf. D2: figure 1)) ainsi que des peptides comprenant la séquence correspondante et ayant jusqu'à 40 acides aminés (cf. D2, revendications 3 et 7). Le peptide PALDAAETGH anticipe les définitions de la revendication 31 fondées sur les peptides de SEQ ID NO: 2 et 3 (délétion de 4 résidus en position C-terminale et, délétion de 4 résidus en position C-terminale et substitution d'un résidu, respectivement). D2 décrit également des vaccins comprenant ledit peptide. D2 anticipe donc les éléments techniques A et C.

- D3 décrit des peptides qui ont au plus 35 acides aminés et qui comprennent les séquences A[A/V]ETGHTSNV ou AAETGHTS[S/N]V (cf. D3, revendication 1). Ces peptides anticipent les définitions de la revendication 31 fondées sur les peptide de SEQ ID NO: 2 et 3 (dans les deux cas, délétion de 4 résidus en position N-terminale). D3 anticipe donc les éléments techniques A et C.

- D4 décrit des protéines VP1 chimériques ayant l'épitope NimIV interverti entre les sérotypes 14 et 6 (CR6), et les sérotypes 14 et 72 (CR72) (cf. D4, les exemples). Ces protéines chimériques comprennent plusieurs peptides ayant des épitopes neutralisants: NimI, NimII et NimIII de HRV14, NimIV de HRV6 ou HRV72, le peptide de SEQ ID NO: 1 (provenant de HRV14) ainsi que tout autre épitope neutralisant présent sur la protéine VP1 de HRV14 (par exemple le peptide MYVPPGAPNP (position 151-160) (cf. D5, l'abrégé et le tableau 2)). D4 anticipe donc les éléments techniques A, D et E.

- 1.2 En conclusion, les groupes d'inventions ne sont pas liés entre eux par des caractéristiques techniques particulières communes ou correspondantes et ils définissent 11 inventions différentes qui ne sont pas liées par un seul concept inventif général.

La présente demande ne satisfait donc pas aux exigences d'unité de l'invention.

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

Invention 1: revendications: 1-25, 55(complètement); 50-54(en partie)

Objet des revendications 1 à 25 et 55, et objet des revendications 50 à 54 dans la mesure où il se réfère aux revendications 1 à 25.

- 1 La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 1, 2, 4 à 9, 14, 16 à 18, 20 à 22, 24 et 50 à 55 n'étant pas nouveau.
- 1.1 Il est noté que dans le cadre des présentes revendication le terme "peptide" n'est pas utilisé dans son sens habituel car les revendications couvrent clairement des peptides "compris" dans des protéines chimériques (cf. par exemple les présentes revendications 14 à 19). Au vu de cette utilisation particulière du terme "peptide", toute fraction de séquence d'un polypeptide est considérée comme correspondant à un peptide.
- 1.2 D4 décrit des protéines VP1 chimériques ayant l'épitope NimIV interverti entre les sérotypes 14 et 6 (CR6), et les sérotypes 14 et 72 (CR72) (cf. D4, les exemples). Ces protéines chimériques comprennent plusieurs peptides ayant des épitopes neutralisants: NimI, NimII et NimIII de HRV14, NimIV de HRV6 ou HRV72, le peptide de SEQ ID NO: 1 (provenant de HRV14) ainsi que tout autre épitope neutralisant présent sur la protéine VP1 de HRV14 (par exemple le peptide MYVPPGAPNP (position 151-160) (cf. D5, l'abrégé et le tableau 2)).
- 1.3 Le peptide de SEQ ID NO: 1 est capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs rhinovirus. Cette propriété est également partagée par NimIV (cf. D4, page 18, ligne 26 à page 19, ligne 20) et par exemple par le peptide MYVPPGAPNP (position 151-160 sur la protéine VP1 de HRV14) (cf. D5, l'abrégé et le tableau 2).
- D4 décrit par ailleurs:
- des compositions pharmaceutiques comprenant les protéines chimériques ci-dessus et un diluant, excipient ou véhicule acceptable (cf. D4, page 11, lignes 5 à 16).
 - des compositions pharmaceutiques comprenant les protéines chimériques ci-dessus et des adjuvants dont l'hydroxyde d'aluminium et QS21(cf. D4, page 15, lignes 1 à 21).

- l'utilisation de la composition comme vaccin contre les rhinovirus (cf. D4, page 11, ligne 5 à page 14, ligne 30).

- des compositions immunogènes comprenant plusieurs protéines chimériques (cf. D4, page 9, ligne 23 à page 10, ligne 12)

D4 anticipe donc les revendications 1, 2, 4 à 9, 14, 16 à 18, 20 à 22, 24 et 50 à 55.

2 La présente demande ne remplit pas les conditions de brevetabilité, l'objet des revendications 3, 10 à 13, 15, 19, 23 à 25 n'impliquant pas d'activité inventive.

2.1 Revendication 3, 10 et 11:

D1 est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche. D1 divulgue que le peptide correspondant aux positions 1 à 30 de HVR14 permet d'obtenir une réponse immunitaire de neutralisation croisée (cf. D1, page 7043, colonne de droite à page 7044, colonne de droite, second paragraph). Une réponse immunitaire de neutralisation croisée est également observée avec un peptide plus court (24-mer) correspondant aux positions 1 à 24 (cf. D1, Figure 5). Afin de trouver un peptide plus efficace, des expériences ont été réalisées pour déterminer contre quelle partie du peptide était dirigée la réponse immunitaire. CT4 (i.e. le peptide de SEQ ID NO:5 de la présente demande) a été identifié comme étant le peptide le plus court reconnu par les anticorps quand des troncations sont introduites en position C-terminale (cf. D1, Figure 8). Il a également été noté que les réponses immunitaires obtenues avec le 30-mer et le 24-mer étaient différentes puisque les anticorps monoclonaux contre le 30-mer ne reconnaissent pas le 24-mer. D1 conclut en suggérant une analyse systématique afin de déterminer quel peptide est le plus efficace pour éliciter une réponse immunitaire (cf. D1, page 7048, colonne de gauche, premier alinéa). Les candidats naturels pour cette analyse systématique sont le 30-mer, le 24-mer et les peptides plus courts reconnus par les anticorps contre le 24-mer dont CT4, CT3 et CT2 qui tombent tous dans la définition de la revendication 11 (cf. D1, Figure 8).

2.2 La revendication 3 diffère de D1 en ce qu'un des peptides de D1 dérivé de VP4 et ayant la propriété requise est combiné avec un second peptide non défini provenant d'une protéine structurale VP1 de picornavirus et capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus.

Le problème technique peut être formulé comme étant la mise à disposition d'une composition immunogène alternative comprenant des épitopes capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus.

Il est bien connu dans l'art que plusieurs peptides de VP1 (y compris des peptides compris dans la protéine VP1 complète (i.e. *de facto* la protéine VP1 complète) sont capables d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus. (cf. par exemple D5, l'abrégé et le tableau 2; D6, l'abrégé).

Au vu des connaissances générales selon lesquelles la combinaison d'épitopes pertinents est une solution pour augmenter la couverture procurée par un vaccin et est nécessaire pour éviter de possibles mutations d'échappement (cf. par exemple D7, page 7450, colonne de gauche, second alinéa), il est considéré évident pour l'homme du métier de combiner l'un des peptides antigénique pertinent de D1 avec des peptides appropriés de D5 ou D6.

Par souci d'être complet, il est de plus noté que la présente demande n'apporte aucune contribution à l'art en ce qui concerne la combinaison de peptides car aucun des exemples ne se rapporte à de telles combinaisons.

la revendication 3 n'implique donc pas une activité inventive.

- 2.3 Les revendications 10 et 11 diffèrent de D1 en ce que le peptide est CT4, CT3, CT2 ou un peptide structurellement proche et en ce que la composition immunogène comprend un second peptide non défini capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus.

Le problème peut être formulé comme étant la mise à disposition d'une composition immunogène comprenant des épitope capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus.

La sélection de CT4, CT3 ou CT2 comme premier peptide capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus dérive, comme indiqué précédemment, directement de l'enseignement de D1.

Dans la mesure où le second peptide capable d'induire une réponse immunitaire de neutralisation croisée contre deux ou plusieurs picornavirus ou sérotypes de picornavirus n'est pas défini, n'importe quel peptide de l'art antérieur peut être choisi et la combinaison de ce peptide avec le peptide

CT4, CT3 ou CT2 ne peut impliquer une activité inventive. Notamment, aucune synergie particulière entre les deux peptides ne peut être considérée inhérente.

Il est donc considéré que les revendications 10 et 11 n'impliquent pas une activité inventive.

2.4 Revendications 12, 13, 15, 19, 23 et 25

Les revendications 12, 13, 15, 19, 23 et 25 correspondent à des modes de réalisation triviaux et/ou sélectionnés de façon arbitraire.

A cet égard, les points suivants peuvent être notés:

- le couplage de peptides antigéniques à des protéines vectrices est usuel dans l'art (cf. par exemple D1, page 7041, colonne de droite, second alinéa) et le couplage à CRM197 n'est pas testé dans les exemples de la présente demande.
- des compositions immunogènes selon la revendication 15 n'ont pas été testées dans les exemples de la présente demande.
- l'utilisation de VLP (par exemple une VLP dérivée de HBsAg) comme véhicule d'épitopes hétérologues est bien connue dans l'art (cf. par exemple D8 à D11).
- les adjuvants des présentes revendications 23 et 25 ne sont pas testés dans les exemples de la présente demande.

Il est donc considéré que les revendications 12, 13, 15, 19, 23 et 25 n'impliquent pas une activité inventive.