

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 55365 B1** (51) Cl. internationale : **C12P 21/00; C12N 9/10**
- (43) Date de publication : **27.09.2023**

- 
- (21) N° Dépôt : **55365**
- (22) Date de Dépôt : **18.03.2020**
- (30) Données de Priorité : **18.03.2019 US 201962819762 P**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/US2020/023415 18.03.2020**
- (71) Demandeur(s) :
- **Janssen Pharmaceuticals, Inc., 1125 Trenton-Harbourton Road Titusville, NJ 08560 (US)**
  - **GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut, 89 1330 Rixensart (BE)**
- (72) Inventeur(s) :
- GEURTSSEN, Jeroen ; POOLMAN, Jan, Theunis ; FAE, Kellen, Cristhina ; BURGHOUT, Pieter, Jan ; WEERDENBURG, Eveline, Marleen ; IBARRA YON, Patricia ; ABBANAT, Darren, Robert ; KEMMLER, Stefan, Jochen ; KOWARIK, Michael, Thomas ; MALLY, Manuela ; BRAUN, Martin, Edward ; CARRANZA SANDMEIER, Maria, Paula ; GAMBILLARA, FONCK, Veronica**
- (74) Mandataire : **SABA & CO., TMP**
- (86) N° de dépôt auprès de l'organisme de validation : EP20718990.3

- 
- (54) Titre : **PROCEDES DE PRODUCTION DE BIOCONJUGUES DE POLYSACCHARIDES O-ANTIGENES D'E. COLI, LEURS COMPOSITIONS ET LEURS PROCEDES D'UTILISATION**
- (57) Abrégé : L'invention concerne des procédés de production de bioconjugués de polysaccharides O-antigènes liés de manière covalente à une protéine porteuse à l'aide de cellules hôtes recombinantes. Les cellules hôtes recombinantes utilisées dans les procédés décrits ici codent une enzyme d'oligosaccharide transférase particulière en fonction du bioconjugué de polysaccharide O-antigène à produire. Les enzymes oligosaccharyltransférases peuvent être de l'oligosaccharyltransférase PglB ou des variants de celles-ci. L'invention concerne également des compositions contenant les

bioconjugués et des procédés d'utilisation des bioconjugués ainsi que des compositions décrits ici pour vacciner un sujet contre l'E. coli pathogène extra-intestinal (ExPEC).

**REVENDICATIONS**

1. Procédé de préparation d'un bioconjugué d'un polysaccharide antigène O<sub>x</sub> d'*E. coli* lié de manière covalente à une protéine porteuse, le procédé comprenant  
5 les étapes consistant à :

(i) fournir une cellule hôte procaryote recombinante comprenant :

a. une séquence nucléotidique d'un groupe de gènes *rfb* pour le polysaccharide antigène O<sub>x</sub> ;

10 b. une séquence nucléotidique codant pour la protéine porteuse comprenant au moins un site de glycosylation comprenant une séquence consensus de glycosylation Asn-X-Ser(Thr), où X est n'importe quel acide aminé sauf Pro (SEQ ID NO : 1), de préférence  
15 une séquence consensus de glycosylation Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), où X et Z sont indépendamment choisis parmi n'importe quel acide aminé sauf Pro (SEQ ID NO : 2) ; et

c. une séquence nucléotidique codant pour une oligosaccharyltransférase PglB<sub>y</sub> ; et  
20

(ii) mettre en culture la cellule hôte procaryote recombinante dans des conditions de production du bioconjugué,  
dans lequel :

25 lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O1A, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés N311V, K482R, D483H et A669V ;

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O4 glucosylé, la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation  
30 d'acide aminé N311V ou les mutations d'acides aminés Y77H et N311V, et la cellule hôte recombinante comprend en outre une séquence codant pour une glucosyltransférase GtrS ayant une identité d'au moins 80 % avec la SEQ ID NO : 4 et étant capable de  
35 modifier un polysaccharide antigène O4 d'*E. coli* par ajout de glucose pour produire le polysaccharide

antigène O4 glucosylé d'*E. coli*, et des séquences nucléotidiques codant pour une translocase GtrA et une glycosyltransférase GtrB ayant une identité de séquence d'au moins 80 % avec les SEQ ID NO : 7 et 8 respectivement, où la translocase est capable de transloquer le glucose lié au bactoprénol et la glycosyltransférase est capable de glucosyler le bactoprénol ;

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O6A, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés N311V, K482R, D483H et A669V ;

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O8, la PglB<sub>y</sub> ne comprend aucune mutation d'acide aminé aux positions 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 et 669 ;

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O15, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés N311V, K482R, D483H et A669V ;

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O16, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés Y77H, S80R, Q287P, K289R et N311V ;

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O18A, la PglB<sub>y</sub> ne comprend aucune mutation d'acide aminé aux positions 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 et 669 ; et

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O75, la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation d'acide aminé N311V,

dans lequel, dans chaque cas, les mutations d'acides aminés sont relatives à la PglB de type sauvage ayant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO : 6, et

dans lequel les polysaccharides antigènes O1A, O4 glucosylé, O6A, O8, O15, O16, O18A et O75 ont les structures de formules (O1A) :



respectivement, et chaque n est indépendamment un nombre entier allant de 1 à 100, de préférence de 3 à 50, par exemple de 5 à 40, par exemple de 7 à 25, par exemple de 10 à 20.

5           2. Procédé de la revendication 1, dans lequel l'antigène O<sub>x</sub> est un polysaccharide antigène O4 glucosylé, et la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation d'acide aminé N311V ou les mutations d'acides aminés Y77H et N311V par rapport à la PglB de type sauvage ayant la séquence d'acides aminés de  
10 la SEQ ID NO : 6.

          3. Procédé de la revendication 2, dans lequel la cellule hôte procaryote recombinante comprend en outre une séquence codant pour une GtrS ayant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO : 4, et des séquences nucléotidiques  
15 codant pour une GtrA et une GtrB ayant les séquences d'acides aminés des SEQ ID NO : 7 et 8, respectivement.

          4. Procédé de préparation d'un bioconjugué d'un polysaccharide antigène O<sub>x</sub> d'*E. coli* lié de manière covalente à une protéine porteuse, le procédé comprenant  
20 les étapes consistant à :

(i) fournir une cellule hôte procaryote recombinante comprenant :

          a. une séquence nucléotidique d'un groupe de gènes *rfb* pour le polysaccharide antigène O<sub>x</sub> ;  
25

          b. une séquence nucléotidique codant pour la protéine porteuse comprenant au moins un site de glycosylation comprenant une séquence consensus de glycosylation Asn-X-Ser(Thr), où X est n'importe quel acide aminé sauf Pro (SEQ ID NO : 1), de préférence  
30 une séquence consensus de glycosylation Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), où X et Z sont indépendamment choisis parmi n'importe quel acide aminé sauf Pro (SEQ ID NO : 2) ; et

          c. une séquence nucléotidique codant pour une oligosaccharyltransférase PglB<sub>y</sub> ; et  
35

(ii) mettre en culture la cellule hôte procaryote

recombinante dans des conditions de production du bioconjugué,

5 dans lequel la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation d'acide aminé N311V par rapport à la PglB de type sauvage ayant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO : 6,

10 dans lequel l'antigène O<sub>x</sub> est un polysaccharide antigène O1A, un polysaccharide antigène O4 glucosylé, un polysaccharide antigène O6A, un polysaccharide antigène O15, un polysaccharide antigène O16 ou un polysaccharide antigène O75,

15 et lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O4 glucosylé, la cellule hôte procaryote recombinante comprend en outre une séquence codant pour une glucosyltransférase GtrS ayant une identité d'au moins 80 % avec la SEQ ID NO : 4 et étant capable de modifier un polysaccharide antigène O4 d'*E. coli* par ajout de glucose pour produire le polysaccharide antigène O4 glucosylé d'*E. coli*, et des séquences nucléotidiques codant pour une translocase GtrA et une glycosyltransférase GtrB ayant une identité de séquence d'au moins 80 % avec les SEQ ID NO : 7 et 8 respectivement, où la translocase est capable de transloquer le glucose lié au bactoprénol et la glycosyltransférase est capable de glucosyler le bactoprénol, et

25 dans lequel les polysaccharides antigènes O1A, O4 glucosylé, O6A, O15, O16 et O75 ont les structures de formules (O1A) :



5, dans lequel la protéine porteuse est choisie dans le groupe consistant en l'exotoxine A détoxifiée de *P. aeruginosa* (EPA), la flagelline d'*E. coli* (FliC), CRM197, la protéine de liaison au maltose (MBP),  
5 l'anatoxine diphtérique, l'anatoxine tétanique, l'hémolysine A détoxifiée de *S. aureus*, le facteur d'agglutination A, le facteur d'agglutination B, l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli*, les variants détoxifiés de l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli*, la  
10 sous-unité B de la toxine cholérique (CTB), la toxine cholérique, les variants détoxifiés de la toxine cholérique, la protéine Sat d'*E. coli*, le domaine passager de la protéine Sat d'*E. coli*, la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*, l'hémocyanine de patelle (KLH),  
15 PcrV de *P. aeruginosa*, la protéine de membrane externe de *Neisseria meningitidis* (OMPC), et la protéine D provenant de *Haemophilus influenzae* non typable.

7. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la protéine porteuse est l'exotoxine A  
20 détoxifiée de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), de préférence dans lequel la protéine porteuse d'EPA comprend 1 à 10, de préférence 2 à 4, plus préférablement 4, des sites de glycosylation, de préférence dans lequel chaque site de glycosylation comprend une séquence consensus de  
25 glycosylation ayant la SEQ ID NO : 2, de préférence dans lequel la protéine porteuse d'EPA comprend la SEQ ID NO : 3.

8. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel la protéine porteuse est l'exotoxine A  
30 détoxifiée de *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), dans lequel la protéine porteuse d'EPA comprend 2 à 4 sites de glycosylation, dans lequel chaque site de glycosylation comprend une séquence consensus de glycosylation ayant la SEQ ID NO : 2.

35 9. Procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel la cellule hôte procaryote recombinante est

une cellule *E. coli*, par exemple une souche *E. coli* K-12, telle que la souche W3110.

10. Cellule hôte procaryote recombinante pour préparer un bioconjugué d'un polysaccharide antigène O<sub>x</sub> d'*E. coli* 5 lié de manière covalente à une protéine porteuse, la cellule hôte procaryote recombinante comprenant :

a. une séquence nucléotidique d'un groupe de gènes *rfb* pour le polysaccharide antigène O<sub>x</sub> ;

b. une séquence nucléotidique codant pour la protéine 10 porteuse comprenant au moins un site de glycosylation comprenant une séquence consensus de glycosylation Asn-X-Ser(Thr), où X peut être n'importe quel acide aminé sauf Pro (SEQ ID NO : 1), de préférence une séquence consensus de glycosylation Asp(Glu)-X-Asn-Z-Ser(Thr), où X et Z sont 15 indépendamment choisis parmi n'importe quel acide aminé sauf Pro (SEQ ID NO : 2) ; et

c. une séquence nucléotidique codant pour une oligosaccharyltransférase PglB<sub>y</sub> où :

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide 20 antigène O1A, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés N311V, K482R, D483H et A669V,

lorsque l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O4 glucosylé, la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation d'acide aminé N311V ou les mutations d'acides aminés 25 Y77H et N311V, et la cellule hôte recombinante comprend en outre une séquence codant pour une glucosyltransférase GtrS ayant une identité d'au moins 80 % avec la SEQ ID NO : 4 et étant capable de modifier un polysaccharide antigène O4 d'*E. coli* par 30 ajout de glucose pour produire le polysaccharide antigène O4 glucosylé d'*E. coli*, et des séquences nucléotidiques codant pour une translocase GtrA et une glycosyltransférase GtrB ayant une identité de séquence d'au moins 80 % avec les SEQ ID NO : 7 et 8 35 respectivement, où la translocase est capable de transloquer le glucose lié au bactoprénol et la

glycosyltransférase est capable de glucosyler le bactoprénol,

5 lorsque l'antigène  $O_x$  est le polysaccharide antigène O6A, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés N311V, K482R, D483H et A669V ;

lorsque l'antigène  $O_x$  est le polysaccharide antigène O8, la PglB<sub>y</sub> ne comprend aucune mutation d'acide aminé aux positions 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 et 669 ;

10 lorsque l'antigène  $O_x$  est le polysaccharide antigène O15, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés N311V, K482R, D483H et A669V ;

15 lorsque l'antigène  $O_x$  est le polysaccharide antigène O16, la PglB<sub>y</sub> comprend les mutations d'acides aminés Y77H, S80R, Q287P, K289R et N311V ;

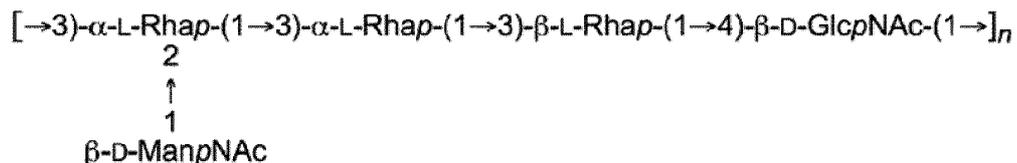
lorsque l'antigène  $O_x$  est le polysaccharide antigène O18A, la PglB<sub>y</sub> ne comprend aucune mutation d'acide aminé aux positions 77, 80, 287, 289, 311, 482, 483 et 669 ; et

20 lorsque l'antigène  $O_x$  est le polysaccharide antigène O75, la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation d'acide aminé N311V,

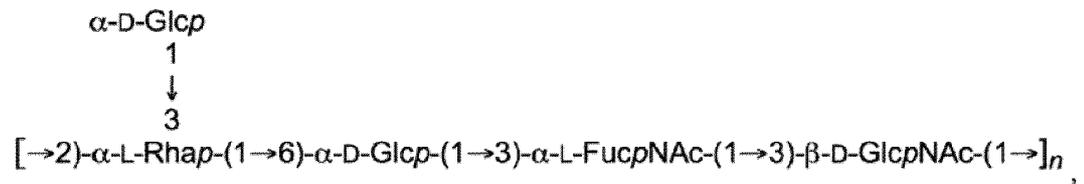
25 dans laquelle, dans chaque cas, les mutations d'acides aminés sont relatives à la PglB de type sauvage ayant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO : 6, et

dans laquelle les polysaccharides antigènes O1A, O4 glucosylé, O6A, O8, O15, O16, O18A et O75 ont les structures de formules (O1A) :

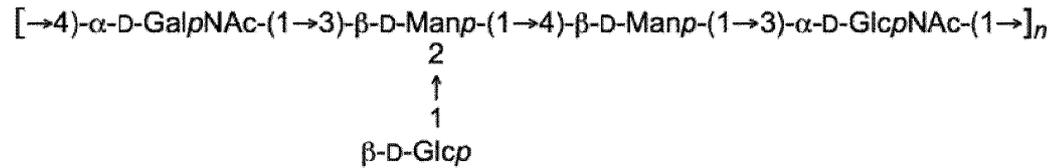
30



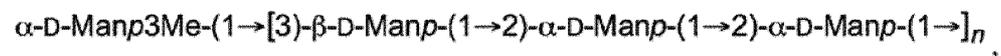
(O4-Glc+):



(O6A):



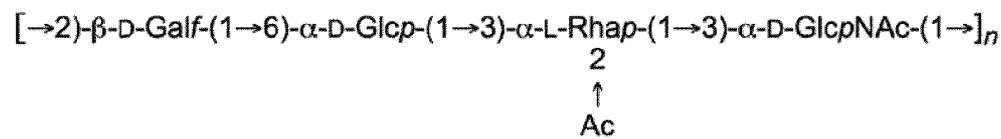
(O8):



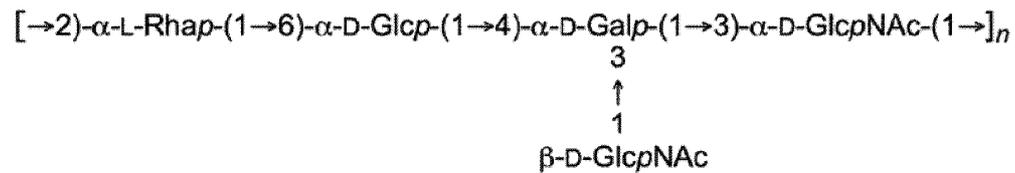
(O15):



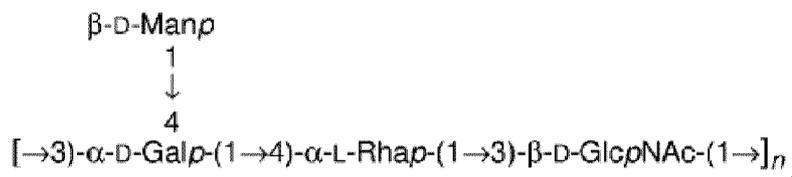
(O16):



(O18A):



(O75):



respectivement, et chaque n est indépendamment un nombre entier allant de 1 à 100, de préférence de 3 à 50, par exemple de 5 à 40, par exemple de 7 à 25, par exemple de 10 à 20.

11. Cellule hôte procaryote recombinante de la revendication 10, dans laquelle l'antigène O<sub>x</sub> est le polysaccharide antigène O4 glucosylé, et la PglB<sub>y</sub> comprend la mutation d'acide aminé N311V ou les mutations d'acides aminés Y77H et N311V par rapport à la PglB de type sauvage  
5 ayant la séquence d'acides aminés de la SEQ ID NO : 6.

12. Cellule hôte recombinante de la revendication 11, où la cellule hôte procaryote recombinante comprend en outre une séquence codant pour une GtrS ayant la séquence  
10 d'acides aminés de la SEQ ID NO : 4, et des séquences nucléotidiques codant pour une GtrA et une GtrB ayant les séquences d'acides aminés des SEQ ID NO : 7 et 8, respectivement.

13. Cellule hôte procaryote recombinante de l'une  
15 quelconque des revendications 10 à 12, dans laquelle la protéine porteuse est choisie dans le groupe consistant en l'exotoxine A détoxifiée de *P. aeruginosa* (EPA), la flagelline d'*E. coli* (FliC), CRM197, la protéine de liaison au maltose (MBP), l'anatoxine diphtérique, l'anatoxine  
20 tétanique, l'hémolysine A détoxifiée de *S. aureus*, le facteur d'agglutination A, le facteur d'agglutination B, l'entérotoxine thermolabile d'*E. coli*, des variants détoxifiés d'entérotoxine thermolabile d'*E. coli*, la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB), la toxine  
25 cholérique, des variants détoxifiés de la toxine cholérique, la protéine Sat d'*E. coli*, le domaine passager de la protéine Sat d'*E. coli*, la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*, l'hémocyanine de patelle (KLH), PcrV de *P. aeruginosa*, la protéine de membrane externe de  
30 *Neisseria meningitidis* (OMPC), et la protéine D provenant de *Haemophilus influenzae* non typable.

14. Cellule hôte procaryote recombinante de l'une  
quelconque des revendications 10 à 13, dans laquelle la protéine porteuse est l'exotoxine A détoxifiée de  
35 *Pseudomonas aeruginosa* (EPA), de préférence dans laquelle la protéine porteuse d'EPA comprend 1 à 10, de préférence 2

à 4, plus préférablement 4, des sites de glycosylation, de  
préférence dans laquelle chaque site de glycosylation  
comprend une séquence consensus de glycosylation ayant la  
SEQ ID NO : 2, de préférence dans laquelle la protéine  
5 porteuse d'EPA comprend la SEQ ID NO : 3.

15. Cellule hôte procaryote recombinante de l'une  
quelconque des revendications 10 à 14, dans laquelle la  
protéine porteuse est l'exotoxine A détoxifiée de  
*Pseudomonas aeruginosa* (EPA), dans laquelle la protéine  
10 porteuse d'EPA comprend 2 à 4 sites de glycosylation, dans  
laquelle chaque site de glycosylation comprend une séquence  
consensus de glycosylation ayant la SEQ ID NO : 2.

16. Cellule hôte procaryote recombinante de l'une  
quelconque des revendications 10 à 15, où la cellule hôte  
15 procaryote recombinante est une cellule *E. coli*, par  
exemple une souche *E. coli* K-12, telle que la souche W3110.