

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 840 319**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **02 06666**

⑤① Int Cl⁷ : C 12 N 1/21, A 61 K 39/10, A 61 P 31/04

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 30.05.02.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 05.12.03 Bulletin 03/49.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR DE LILLE — FR
et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE INSERM — FR.

⑦② Inventeur(s) : DEBRIE ANNE SOPHIE, LOCHT
CAMILLE, MIELCAREK NATHALIE et RAZE DOMINI-
QUE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SA.

⑤④ SOUCHES DE BORDETELLA RENDUES DEFICIENTES PAR ATTENUATION GENETIQUE.

⑤⑦ L'invention concerne des souches vivantes de Bordetella rendues déficientes dans la production de la toxine de B. pertussis PTX et, le cas échéant, de la toxine dermonécrotique DNT, ainsi que dans la libération de la toxine cytotrachéale TCT, et ce, par atténuation génétique, en particulier par mutation ou délétion du gène ptx et, le cas échéant, du gène dnf, et par insertion d'un promoteur fort en amont du gène codant la protéine AmpG, laquelle est impliquée dans le recyclage de la toxine TCT. La présente invention a également pour objets des procédés d'obtention de ces souches, ainsi que leur utilisation pour la préparation de vaccins. Enfin, l'invention vise des compositions immunogènes comprenant de telles souches.

FR 2 840 319 - A1



SOUCHES DE *BORDETELLA* RENDUES DEFICIENTES PAR ATTENUATION GENETIQUE

Combinant biologie moléculaire et immunologie, la présente invention relève du domaine de la recherche et la mise au point de nouveaux vaccins pour le traitement d'infections dues à des souches de *Bordetella*, notamment la coqueluche due à *B. pertussis*.

L'invention est relative à des souches vivantes de *Bordetella* rendues déficientes dans la production de la toxine de *B. pertussis* PTX et dans la libération de la toxine cytotrachéale (encore appelée cytotoxine trachéale) TCT, et ce, par atténuation génétique, via la mutation ou la délétion du gène codant la toxine PTX et l'addition d'un promoteur fort en amont du gène codant la protéine AmpG, laquelle est impliquée dans le recyclage de la toxine TCT.

La présente invention concerne également des souches vivantes de *Bordetella* présentant, outre les propriétés susvisées, une déficience dans la production de la toxine dermonécrotique DNT, déficience obtenue par mutation ou délétion du gène codant ladite toxine.

En outre, l'invention a pour objets des souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement et capables de produire une protéine hétérologue sous forme cytoplasmique, et/ou en surface des bactéries, et/ou sous forme sécrétée. Cette protéine hétérologue peut notamment être une protéine hybride comprenant, par exemple, au moins une partie d'une adhésine de *Bordetella*, notamment une partie de l'hémagglutinine filamenteuse FHA.

La présente invention vise également des procédés d'obtention de souches déficientes de *Bordetella* par atténuation génétique.

De plus, l'invention est relative à l'utilisation de telles souches à des fins immunoprophylactiques et/ou thérapeutiques. Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation de souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement pour la vaccination de l'être humain ou de

l'animal contre la coqueluche et/ou diverses autres maladies infectieuses. Entre autres intérêts, ces souches sont susceptibles d'être administrées par voie intranasale.

Enfin, la présente invention a trait à des compositions immunogènes
5 comprenant, en tant que principe actif, des souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement dans une formulation pharmaceutiquement acceptable.

Au cours des dernières décennies, la coqueluche, essentiellement due à la bactérie à Gram négatif *Bordetella pertussis*, est réapparue parmi
10 les maladies infectieuses lourdes de conséquences en termes de santé publique à travers le monde, et plus particulièrement dans les pays en voie de développement. Ainsi, selon une étude récente, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a dénombré plus de 40 millions de cas de coqueluche par an, et la mortalité a été estimée à 360 000 décès par an, ces décès
15 affectant principalement les nourrissons (Ivanoff, B., and S.E. Robertson. 1997. Dev. Biol. Stand. 89 :3-13). Malgré l'introduction du vaccin contre la coqueluche dans les programmes de vaccination de routine chez l'enfant, cette maladie est actuellement considérée comme ré-émergente (Simondon, F., and N. Guiso. 2001. Med. Mal. Infect. 31 :5-11). La
20 coqueluche pose donc un problème de santé publique majeur, obligeant les autorités sanitaires et autres organismes compétents, ainsi que le personnel médical à maintenir, voire renforcer les réseaux de veille épidémiologique autour de cette maladie, et à encourager le développement de moyens de lutte efficaces, faciles d'utilisation et
25 relativement peu coûteux.

Les vaccins contre la coqueluche dits de première génération consistaient en des souches tuées de *B. pertussis*. Ces vaccins cellulaires inactivés (wP pour « whole cell *pertussis* vaccine ») sont utilisés depuis une
cinquantaine d'années environ. Ils ont permis d'observer une diminution
30 considérable de l'incidence de la coqueluche et, par-là même, de la

mortalité liée à cette maladie. Cependant, il s'est avéré que ces vaccins présentaient des effets secondaires parfois graves.

Les vaccins de deuxième génération, désormais utilisés dans de nombreux pays industrialisés, sont des vaccins acellulaires (aP) contenant
5 entre 2 et 5 composants antigéniques bactériens purifiés. Ces vaccins ont été décrits comme induisant moins d'effets secondaires que les vaccins wP. Ils ont, à ce titre, largement remplacé les vaccins de première génération dans le traditionnel "triple" vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche (vaccin DTP).

10 L'analyse des réponses cellulaires T après vaccination a montré que les vaccins wP stimulaient une réponse immunitaire cellulaire de type Th1 chez l'homme et la souris. En revanche, les vaccins aP induisent un profil mixte Th1/Th2 chez l'homme et Th2 chez la souris (Mills *et al.* 1998. Dev. Biol. Stand. 95:31-41.). En outre, des études cliniques récentes ont
15 également indiqué que les taux d'anticorps spécifiques diminuent rapidement après vaccination avec les vaccins DTaP (Cassone *et al.* 1997. Arch. Pediatr. Adolesc. Med. 51:283-289). En définitive, ces derniers induisent une protection immunitaire plus faible et plus transitoire que les vaccins DTwP (Simondon *et al.* 1997. Vaccine. 15:1606-1612). Enfin, les
20 récents vaccins aP restent d'un coût trop élevé pour représenter un moyen de lutte prophylactique et/ou thérapeutique véritablement accessible à de nombreux pays en voie de développement (GAVI. 2001. www.vaccinealliance.org/newsletter/jun2001/update.html).

La présente invention s'inscrit dans le cadre d'une stratégie
25 vaccinale alternative consistant en l'administration par voie intranasale de souches de *Bordetella*, et notamment de souches de *B. pertussis*, vivantes et atténuées génétiquement. La vaccination par voie intranasale revêt un intérêt particulier dans les pays en voie de développement. En effet, en comparaison des immunisations par injection, les immunisations par voie
30 muqueuse diminuent les besoins en personnel médical et en équipement,

et éliminent le problème posé par les contaminations du fait de seringues mal stérilisées et/ou mal utilisées.

Parmi les facteurs de virulence produits par les souches de *Bordetella*, et en particulier les souches de *B. pertussis*, l'on dénombre principalement trois toxines protéiques, la toxine de *B. pertussis* PTX, la toxine dermonécrotique DNT et l'adénylate cyclase AC, ainsi qu'un glycopeptide appelé toxine cytotrachéale TCT.

La toxine PTX est formée de cinq sous-unités différentes, S1 à S5. Les sous-unités S2 à S5 sont responsables de la liaison de la toxine aux récepteurs portés par les cellules cibles. La sous-unité S1, quant à elle, présente une activité ADP-ribosyltransférase (pour plus de détails sur les toxines produites par *B. pertussis*, voir la revue Locht *et al.* 2001. *Curr. Opin. Microbiol.* 4 :82-89).

La toxine DNT, également appelée PEHLT pour "*Pertussis Heat-Labile Toxin*", est un polypeptide monomérique de 159 kDa (pour revue, Locht et Antoine. 1999. *In* : *The Comprehensive Sourcebook of bacterial protein toxins*, Ed. Academic Press, pp. 130-146.). Contrairement aux autres toxines produites puis sécrétées par *B. pertussis*, la toxine DNT reste localisée dans le cytoplasme de la bactérie (Cowell *et al.* 1979. *Infect. Immun.* 25 : 896-901). Le rôle de cette toxine dans la pathogénicité et la virulence des souches de *Bordetella* n'est à ce jour pas totalement élucidé. Cependant, il a été montré que la toxine DNT était hautement létale lorsqu'elle était injectée sous forme purifiée par voie intraveineuse chez la souris (Zhang et Sekura. 1991. *Infect. Immun.* 59 :3754-3759).

La toxine protéique AC présente deux activités adénylate cyclase, dont l'une est responsable de l'hémolyse et l'autre dépend de la calmoduline, protéine cytoplasmique affine pour le calcium et qui en régule le métabolisme. Ces deux activités sont importantes lors des stades précoces d'infection, en ce qu'elles induisent probablement une apoptose des macrophages alvéolaires.

Enfin, la toxine TCT est un glycopeptide de bas poids moléculaire qui dérive du peptidoglycane et est relargué par *B. pertussis* durant sa phase de croissance (Cookson, B.T. *et al.* 1989. *Biochem.* 28 : 1744-1749). La TCT est responsable de la destruction des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, affaiblissant ainsi le processus de « nettoyage » dudit épithélium. Elle pourrait donc être à l'origine de la toux caractéristique de la coqueluche.

Conformément à l'acception usuelle, l'on entend par « virulence » la capacité des bactéries, notamment des *Bordetella*, à se développer chez un organisme hôte en y produisant des substances toxiques ou « toxines ».

La « toxicité » désigne la capacité d'une telle toxine à entraîner des altérations métaboliques, voire, à terme, la mort des cellules au sein de l'organisme hôte.

Au sens de la présente invention, un « organisme hôte » est un homme ou un animal.

L'efficacité d'une souche de *B. pertussis* délétée du gène codant la toxine PTX (gène *ptx*) a déjà été démontrée dans le cadre de la protection de souris contre une infection par la souche sauvage (Mielcarek N. *et al.* 1998. *Nature Biotech.* 16:454-457). L'immunité protectrice a été observée après vaccination à l'aide d'une dose unique de bactéries, ce qui présente un avantage considérable par rapport aux vaccins existants, étant donné que la réduction du nombre d'administrations est considérée par l'OMS comme l'un des objectifs à atteindre en priorité au cours des prochaines décennies. De plus, le taux de protection chez la souris adulte après infection par voie nasale avec la souche sauvage de *B. pertussis* pouvait être corrélé à l'efficacité vaccinale observée chez les enfants (Mills *et al.* 1998. *Infect Immun.* 66:594-602).

Cependant, une telle souche, en ce qu'elle est déficiente dans la production de la seule toxine PTX, demeure capable de produire au moins les trois autres toxines de *Bordetella* évoquées supra, à savoir la toxine DNT, l'AC et la cytotoxine TCT.

En conséquence, la présente invention concerne des souches vivantes de *Bordetella* rendues déficientes dans la production d'au moins deux facteurs de virulence parmi ceux susvisés, et ce, par atténuation génétique.

5 De manière évidente, l'invention ne se limite pas à des souches vivantes et déficientes appartenant à l'espèce *B. pertussis*, mais concerne également toute espèce de *Bordetella* susceptible de présenter un intérêt d'un point de vue médical ou à des fins d'étude et de recherche. Sont en l'occurrence plus particulièrement visées les espèces infectieuses pour
10 l'homme autres que *B. pertussis*, notamment *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*, ou infectieuses pour les animaux, notamment l'espèce *B. bronchiseptica* pour le chien ou le porc, ou *B. avium* pour les oiseaux.

Dans le contexte de l'invention, l'on entend par « atténuation », le fait que sur les quatre toxines sus-citées, importantes pour la virulence et la
15 pathogénicité des souches de *Bordetella*, au moins deux ne soient pas produites, ou soient produites sous une forme non fonctionnelle, par les souches vivantes atténuées génétiquement conformément à l'invention. L'« atténuation génétique » concerne plus précisément des modifications ou altérations génétiques, effectuées soit directement dans les gènes
20 codant lesdites toxines, soit de manière détournée, en ciblant un gène codant une protéine impliquée dans la voie métabolique de synthèse et/ou transport et/ou recyclage desdites toxines.

La présente invention démontre que, lorsque les souches de *Bordetella* sont rendues déficientes dans la production de la seule toxine
25 DNT, elles présentent un profil d'immunogénicité altéré, avec une réduction sensible de la production d'anticorps dirigés contre la FHA (Exemple 6 ci-dessous).

Aussi, dans le cadre du problème posé selon la présente invention, à savoir proposer une alternative aux vaccins existants contre la coqueluche
30 et/ou d'autres maladies infectieuses pour l'homme et l'animal, ladite alternative étant à la fois efficace, d'une utilisation aisée et peu coûteuse, il

ne peut être envisagé de rendre des souches vivantes de *Bordetella* déficientes dans la production de n'importe quelle toxine ou combinaison de toxines, faute de quoi ces souches pourraient ne pas pouvoir être utilisées comme vaccins.

5 Selon un premier mode de réalisation, l'invention a pour objets des souches de *Bordetella* déficientes dans la production de la toxine PTX et dans la libération de la cytotoxine TCT. De telles souches sont atténuées génétiquement par mutation ou délétion du gène codant la toxine PTX et par insertion d'un promoteur fort en amont du gène codant la protéine
10 AmpG (gène *ampG*), laquelle participe au recyclage de la cytotoxine TCT.

En effet, la plupart des bactéries à Gram négatif produisent des glycopeptides du type de la TCT par clivage de leur peptidoglycane à l'aide d'enzymes périplasmiques. Cependant, ces produits sont recyclés par les microorganismes en question et ne sont donc pas relargués, contrairement
15 à ce que l'on observe chez *B. pertussis*. Chez *E. coli*, ce mécanisme de recyclage est effectué par le transporteur protéique AmpG, présent dans la membrane cytoplasmique. La détermination de la séquence du génome de *B. pertussis* au Centre Sanger, UK, a révélé, chez cette espèce, la présence d'un gène homologue au gène *ampG* auparavant identifié chez *E.*
20 *coli*. C'est cette observation qui a conduit à envisager, dans le cadre de la présente invention, la surexpression de la protéine AmpG chez les souches de *Bordetella*.

Au sens de l'invention, une « mutation » désigne toute altération de la séquence d'un gène codant une toxine, ladite altération rendant la
25 protéine ainsi codée atoxique. Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle entraînant la modification d'un ou plusieurs résidus responsables de la toxicité de la protéine. Ce peut également être une mutation par décalage de cadre de lecture. En ce cas, la séquence traduite ne correspond pas à la séquence attendue. Enfin, l'on peut envisager une mutation non sens en
30 introduisant en phase au sein du gène un codon stop prématuré. La

protéine alors synthétisée est tronquée d'au moins la ou les régions responsables de sa toxicité.

Selon un deuxième mode de réalisation, l'invention vise des souches de *Bordetella* déficientes dans la production des toxines PTX et DNT, ainsi que dans la libération de la cytotoxine TCT. Là encore, ces souches sont atténuées génétiquement par mutation ou délétion des gènes codant les toxines PTX et DNT (gènes *ptx* et *dnt*), et par insertion d'un promoteur fort en amont du gène *ampG*.

Dans ce dernier mode de réalisation, il peut être envisagé de : (i) muter les gènes *ptx* et *dnt* ; ou (ii) déléter ces deux gènes, en tout ou en partie ; ou encore (iii) muter l'un des deux et déléter l'autre.

Avantageusement, le gène codant la toxine PTX est muté, plutôt que délété. Ce gène présente alors une ou plusieurs mutations, de préférence dans la région codant la sous-unité S1 de la protéine PTX, ladite région étant responsable de la toxicité de celle-ci. A titre d'exemple, l'on peut citer les mutations ponctuelles R9K et E129G caractéristiques de la protéine PTRE, mutant atoxique de PTX (voir Exemple 4 ci-après).

Dans les modes de réalisation précités, la délétion du gène codant la toxine PTX ou la délétion d'au moins un des gènes codant les toxines PTX et DNT peut être totale ou partielle. En cas de délétion partielle, assimilable à une mutation par décalage de cadre de lecture ou une mutation non sens telle que définie supra, au moins la ou les régions responsables de la toxicité de la protéine doivent être délétées, afin que celle-ci soit rendue atoxique.

Les souches de *Bordetella* objets de la présente invention sont capables de surexprimer la protéine AmpG grâce à l'insertion d'un promoteur fort en amont du gène *ampG*. Parmi les promoteurs forts susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention, figure le promoteur du gène de la porine majeure de *Bordetella* (promoteur *Ppor* du gène *por* ; voir Exemple 7), ou tout autre promoteur fort chez ce genre bactérien.

Il convient de noter que la protéine AmpG ainsi surexprimée peut être native ou mutée dès lors qu'elle conserve sa fonction dans le métabolisme de la paroi chez *Bordetella* et, plus précisément, dans le recyclage de la cytotoxine TCT (voir, par exemple, les gènes *ampG1* et *ampG2* dans l'Exemple 7).

D'une manière générale, l'on considère que les protéines codées par des gènes présentant au moins 80 % d'identité en conditions strictes d'hybridation avec les gènes codant les protéines elles-mêmes objets de l'invention, sont des protéines « similaires » à ces dernières dans leur structure et leur fonction (pour les conditions strictes d'hybridation, voir Sambrook et Russel. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA). Il est entendu que ces protéines similaires sont comprises dans le cadre de la présente invention. Par exemple, des protéines similaires aux toxines PTX et DNT, ainsi qu'aux protéines AmpG et FHA (hémagglutinine filamenteuse, voir infra) sont également visées par l'invention.

La délétion ou la mutation d'un gène dans le chromosome de *Bordetella*, et en particulier des gènes *ptx* et *dnt*, peut être effectuée par toute méthode conventionnelle connue de l'homme du métier (Antoine et Loch. 1990. *Infect. Immun.* 58 :1518-1526 ; et Sambrook et Russel. 2001, supra).

A titre d'exemple, un procédé d'obtention d'une souche de *Bordetella* présentant une mutation ou délétion du gène *ptx* ou *dnt* comprend les étapes suivantes :

- a) le croisement d'une souche de *Bordetella* native et virulente ou d'une souche mutée avec une souche mobilisante d'*Escherichia coli* ;
- b) la sélection, à l'aide de marqueurs, des cellules ayant perdu le gène *ptx* ou *dnt*, ou ayant acquis un gène codant une protéine mutée et atoxique.

La perte de la capacité de la souche croisée à produire une toxine et/ou l'acquisition par celle-ci de l'aptitude à synthétiser une protéine mutée et atoxique est le résultat d'un double événement de recombinaison homologue entre la souche parentale et un plasmide de la souche mobilisante, ledit plasmide portant une copie des régions flanquantes et/ou du gène ou d'une partie du gène codant une protéine mutée et atoxique (voir Exemples ci-dessous).

Lors de l'étape b) du procédé supra, les marqueurs de sélection doivent être choisis en fonction des souches de *Bordetella* utilisées. Des exemples de tels marqueurs sont la résistance à des antibiotiques (notamment la gentamicine et/ou la streptomycine) et la résistance à une concentration élevée de sucrose (supérieure à 5 %) dans le milieu de culture.

En outre, la présente invention concerne des souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement telles que décrites supra, et capables de produire une protéine hétérologue.

De telles souches sont caractérisées par le fait qu'elles hébergent et expriment un gène hétérologue, lequel peut être porté par un plasmide ou intégré au chromosome bactérien. Dans les deux cas de mise en œuvre, il est fait appel, pour la construction de telles souches, à des techniques de biologie moléculaire courantes (Sambrook et Russel. 2001, supra).

La protéine hétérologue ainsi produite peut demeurer dans le cytoplasme des cellules bactériennes, et/ou être présentée à la surface desdites cellules, tel un récepteur membranaire, et/ou être sécrétée dans l'organisme hôte, telle une toxine.

De manière préférée, la protéine hétérologue est une protéine hybride et, plus particulièrement, une protéine hybride comprenant au moins une partie d'une adhésine de *Bordetella* et au moins tout ou partie d'une protéine antigénique susceptible d'être produite par des microorganismes pathogènes lors d'infections muqueuses ou systémiques,

ladite protéine antigénique étant hétérologue vis-à-vis de l'adhésine de *Bordetella*.

Selon la présente invention, l'on désigne par « partie », « portion », « région » ou « zone », un fragment d'une protéine, d'une taille supérieure à environ 6 acides aminés consécutifs, suffisant pour observer l'« activité biologique d'intérêt » qui est recherchée. Ainsi, s'agissant de la « partie d'une adhésine », l'activité biologique d'intérêt est précisément la fonction adhésine. A cet égard, l'adhésine de *Bordetella* en question peut être native ou mutée, dès lors que la fonction adhésine recherchée est conservée. Pour la « partie d'une protéine antigénique », l'activité biologique d'intérêt est l'activité antigénique.

L'adhésine principalement produite et sécrétée par les souches de *Bordetella* est l'hémagglutinine filamenteuse (FHA). Cette protéine de 220 kDa (forme mature) est produite sous la forme d'un précurseur de 367 kDa, lequel subit un processus de maturation bidirectionnel, à partir de ses deux extrémités N- et C-terminales. La FHA est capable d'interagir avec : (i) des hydrates de carbone ; (ii) l'héparine ; et (iii) l'intégrine CR3 des macrophages (Locht et al. 2001, supra). Ces activités permettent aux bactéries de se lier à diverses cellules et structures extracellulaires dans l'appareil respiratoire de l'organisme hôte, en particulier les cellules épithéliales et les macrophages.

En sus de la FHA, les souches de *Bordetella* produisent des fimbriae essentiellement composés de sous-unités Fim2 ou Fim3, et FimD (Locht et al. 2001, supra). La sous-unité FimD interagit avec l'intégrine VLA-5 des macrophages, ainsi qu'avec les sucres sulfatés présents dans l'appareil respiratoire de l'organisme hôte. La liaison de FimD à VLA-5 active l'intégrine CR3, récepteur de la FHA, ce qui assure une coopérativité entre les liaisons des pili bactériens et de la FHA aux macrophages.

Ainsi, une protéine hybride produite par les souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement conformément à l'invention comprend

au moins une partie de la FHA ou de FimD, de préférence au moins une partie de la FHA.

Avantageusement, une telle protéine hybride comprend au moins la région N-terminale de la FHA mature contenant le site d'interaction avec l'héparine et suffisante à elle seule pour entraîner la sécrétion de la protéine hybride ainsi formée (demande de brevet internationale WO 95/28486 aux noms de l'Institut Pasteur, l'Institut Pasteur de Lille et l'INSERM). En particulier, cette région de la FHA comprend au moins les acides aminés situés entre les positions 441 et 863, définissant le site d'interaction avec l'héparine (d'après la numérotation proposée dans Delisse-Gathoye *et al.* 1990. Infect. Immun. 58 :2895-2905).

Au sens de la présente invention, une « protéine antigénique » désigne une protéine capable de se lier avec un anticorps produit par un organisme hôte, et ce, par l'intermédiaire d'un « antigène ». Un tel « antigène » correspond à une région de ladite protéine et est responsable de la liaison avec l'anticorps. Plus précisément, cette région responsable de la liaison avec l'anticorps comprend un « épitope », c'est-à-dire une séquence d'au moins 6 acides aminés consécutifs correspondant à la portion spécifique de l'antigène interagissant avec ledit anticorps.

Afin de faciliter la lecture de la présente description, le terme « antigène » pourra désigner l'antigène lui-même, ou bien la protéine antigénique, ou bien encore un épitope dudit antigène. L'homme du métier déduira alors sans ambiguïté du contexte le sens qu'il conviendra de donner à ce terme.

Avantageusement, une protéine hybride produite par une souche vivante de *Bordetella* atténuée génétiquement conformément à l'invention comprend au moins une partie de la FHA telle que définie ci-dessus et au moins un épitope d'une protéine antigénique hétérologue vis-à-vis de ladite FHA.

Un « microorganisme » est, selon l'invention, une bactérie et, de préférence, une bactérie infectieuse et pathogène pour l'homme et/ou

l'animal. En particulier, une telle bactérie est une souche de *Bordetella*, par exemple une souche de *B. pertussis*.

Outre les *Bordetella*, parmi les microorganismes pathogènes susceptibles de produire des protéines antigéniques lors d'infections muqueuses ou systémiques, l'on peut citer par exemple des souches de *Shigella*, *Neisseria* et *Borrelia*.

D'autres exemples de protéines antigéniques sont des toxines ou toxoïdes diphtériques, tétaniques ou cholériques, des antigènes viraux, notamment des antigènes du virus de l'hépatite B, de l'hépatite C, du polyovirus ou du VIH, des antigènes parasitaires tels ceux produits par *Plasmodium*, *Schistosoma* ou par les toxoplasmes.

La présente invention a également pour objets des procédés d'obtention de souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement, telles que décrites ci-dessus.

Selon un premier mode de mise en œuvre, un procédé d'obtention d'une telle souche comprend au moins les étapes suivantes :

- la mutation ou la délétion du gène *ptx* ; et
- l'insertion d'un promoteur fort en amont du gène *ampG*.

Quel que soit le procédé envisagé, il convient de noter que l'ordre des étapes est indifférent pour parvenir au résultat recherché.

Selon un deuxième mode de mise en œuvre, un procédé d'obtention d'une souche vivante de *Bordetella* atténuée génétiquement conformément à la description fournie supra, comprend au moins les étapes suivantes :

- la mutation ou la délétion des gènes *ptx* et *dnt* ; et
- l'insertion d'un promoteur fort en amont du gène *ampG*.

Comme indiqué précédemment, le gène *ptx* est avantageusement muté, de préférence dans la région codant la sous-unité S1 de la protéine PTX (Exemple 4 ci-après).

Dans le cadre des modes de mise en œuvre sus-cités, la ou les délétions peuvent être totales ou partielles.

En cas de délétions partielles, comme en cas de mutations, les protéines synthétisées sont dépourvues de toxicité.

Le promoteur fort sous le contrôle duquel est placé le gène *ampG* est choisi parmi les promoteurs forts de *Bordetella*, et est de préférence le promoteur *Ppor* du gène de la porine majeure de *Bordetella*.

Avantageusement, un procédé d'obtention d'une souche de *Bordetella* déficiente comprend, outre les étapes sus-citées, une étape d'introduction dans la souche d'au moins un gène codant une protéine hétérologue, de préférence une protéine hybride.

Un tel gène peut être porté par un plasmide ou inséré dans le chromosome de ladite souche.

De manière préférée, ledit gène code une protéine hybride comprenant au moins une partie d'une adhésine de *Bordetella* et au moins tout ou partie d'une protéine antigénique hétérologue vis-à-vis de ladite adhésine et susceptible d'être produite par des microorganismes pathogènes lors d'infections muqueuses ou systémiques.

Selon un mode de mise en œuvre particulier, l'adhésine sus-visée est la FHA.

L'expression d'un ou plusieurs gènes codant des protéines hétérologues, notamment des protéines hybrides, peut être placée sous le contrôle d'un promoteur fort de *Bordetella*, tel le promoteur du gène de la porine majeure *Ppor*.

Des protéines hybrides comprenant au moins une partie de la FHA ont notamment été décrites dans les demandes de brevet WO 95/28486 (aux noms de l'Institut Pasteur, l'Institut Pasteur de Lille et l'INSERM) et WO 98/16553 (aux noms de l'Institut Pasteur de Lille et l'INSERM). En particulier, des procédés d'obtention de telles protéines hybrides ont été rapportés dans l'exemple V de la demande WO 95/28486 et l'exemple 5 de la demande WO 98/16553.

Les caractéristiques génotypiques des souches vivantes de *Bordetella* rendues déficientes dans la production d'une ou plusieurs

toxines peuvent être vérifiées par des techniques classiques connues de l'homme du métier. En particulier, elles peuvent être déterminées par Western-blot et/ou analyse de l'ADN génomique par Southern-blot (voir les Exemples ci-dessous et Sambrook et Russel. 2001, supra). S'agissant des
5 souches exprimant une protéine mutée, la séquence des gènes codants peut être vérifiée selon des méthodes conventionnelles de détermination des séquences nucléotidiques.

En outre, la présente invention concerne l'utilisation d'une souche déficiente de *Bordetella* telle que décrite supra pour la préparation de
10 vaccins contre des infections muqueuses ou systémiques liées à des *Bordetella*, et notamment la coqueluche.

Selon un autre mode de mise en œuvre, une souche vivante de *Bordetella* atténuée génétiquement conformément à l'invention peut être utilisée aux fins de la production de tout ou partie d'au moins une protéine
15 antigénique, telle que définie supra, et susceptible d'être produite par des microorganismes pathogènes lors d'infections muqueuses ou systémiques.

Enfin, la présente invention a pour objet une composition immunogène comprenant, en tant que principe actif, au moins une souche déficiente de *Bordetella* comme indiqué ci-dessus, dans une formulation
20 pharmaceutiquement acceptable.

Une « formulation pharmaceutiquement acceptable » correspond, au sens de l'invention, à une formulation médicamenteuse susceptible d'être utilisée chez l'homme ou l'animal, à des doses acceptables *in vivo* eu égard à la toxicité et la pharmacologie des composés concernés, tout en étant
25 efficaces sur le plan thérapeutique, et en particulier d'un point de vue immunogène.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la ou les souches vivantes de *Bordetella* atténuées génétiquement servant de principe actif sont associées à un ou plusieurs adjuvants.

30 Par « adjuvant » ou « composé adjuvant », l'on entend au sens de la présente invention, un composé apte à induire ou à augmenter la réponse

immunitaire spécifique vis-à-vis d'un antigène ou immunogène, ladite réponse consistant indifféremment en une réponse humorale et/ou cellulaire. Cette réponse immunitaire passe généralement par une stimulation de la synthèse d'immunoglobulines spécifiques d'un antigène
5 donné, en particulier des IgG, IgA et IgM, ou de cytokines.

Le principe actif, souche(s) vivante(s) et déficiente(s) de *Bordetella*, ainsi que le ou les adjuvants, sont généralement mélangés à des excipients pharmaceutiquement compatibles, tels que l'eau, un tampon salin, du dextrose, du glycérol, de l'éthanol, ou des mélanges de ceux-ci.

10 De telles compositions immunogènes peuvent être préparées sous la forme de solutions liquides, ou de suspensions injectables, ou encore sous une forme solide, par exemple lyophilisée, adaptée à la mise en solution préalablement à une injection.

De manière préférée, les compositions immunogènes objets de la
15 présente invention sont présentées sous une forme adaptée à l'administration par voie muqueuse, et, plus particulièrement, par voie intranasale. Par exemple, il peut s'agir d'une solution destinée à être instillée, ou d'une poudre à diluer avant instillation, ou encore d'une solution pulvérisable (pour des détails sur les formulations vaccinales, voir la revue
20 Davis S.S. Nasal vaccines. 2001. Adv. Drug Deliv. Rev. 51 :21-42).

Une composition immunogène selon l'invention est formulée de manière à permettre une administration par des voies aussi diverses que la voie nasale, orale, sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, vaginale, rectale, oculaire, ou auriculaire. En particulier, le choix des composés
25 auxiliaires est dicté par le mode d'administration choisi. De tels composés auxiliaires peuvent être notamment des agents mouillants, émulsifiants ou tampons.

Une composition immunogène selon l'invention est de préférence formulée pour une administration par voie intranasale chez l'homme et/ou
30 l'animal.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures suivantes :

- La figure 1 illustre l'analyse par Southern-blot, en utilisant une sonde correspondant au produit d'amplification « *dnt low* » (voir Exemple 1
5 ci-après) marqué à la dig (Roche, Bâle, Suisse), de l'ADN génomique digéré par *XhoI* des souches de *B. pertussis* délétées de la totalité du gène *dnt* : BPSMDN (PTX+, FHA+, DNT-) (piste 2), BPDRDN (PTX-, FHA-, DNT-) (piste 3) et BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-) (piste 5). Les pistes 1 et 4 correspondent au marqueur de poids moléculaire et la piste 6 à l'ADN
10 génomique de la souche sauvage témoin BPSM (PTX+, FHA+, DNT+).

- La figure 2 illustre l'efficacité des souches suivantes à adhérer aux cellules A549 et J774 :

A : BPSM (PTX+, FHA+, DNT+)
B : BPSMDN (PTX+, FHA+, DNT-)
15 C : BPRA (PTX-, FHA+, DNT+)
D : BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-)
E : BPDR (PTX-, FHA-, DNT+)
F : BPDRDN (PTX-, FHA-, DNT-).

- La figure 3A illustre la colonisation des poumons de souris OF1 par
20 les souches de *B. pertussis* BPSM (PTX+, FHA+, DNT+) et BPSMDN (PTX+, FHA+, DNT-).

- La figure 3B illustre le nombre de bactéries BPSM présentes dans les poumons de souris OF1 préalablement immunisées intranasalement avec les souches de la figure 3A (BPSM ou BPSMDN), ou
25 intrapéritonéalement avec le vaccin Tetravac-acellulaire (DTaPPol ; Aventis-Pasteur, France), puis infectées intranasalement 2 mois plus tard avec la souche BPSM. Le groupe contrôle correspond à des souris naïves infectées intranasalement avec la souche BPSM. Les colonnes blanches et noires correspondent respectivement aux nombres de *B. pertussis* viables
30 estimés dans les poumons 3 heures et 7 jours après l'infection. Les barres au-dessus des colonnes représentent les écarts-type (EC).

- La figure 4A représente la colonisation des poumons de souris OF1 par les souches de *B. pertussis* BPRA (PTX-, FHA+, DNT+) et BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-).

- La figure 4B illustre le nombre de bactéries BPSM présentes dans
5 les poumons de souris OF1 préalablement immunisées intranasalement avec la souche BPSM, ou BPRA, ou encore BPRADN, puis infectées intranasalement 2 mois plus tard avec la souche BPSM. Le groupe contrôle correspond à des souris naïves infectées intranasalement avec la souche BPSM. Les colonnes blanches, grises et noires correspondent
10 respectivement aux nombres de *B. pertussis* viables estimés dans les poumons 3 heures, 10 jours et 14 jours après l'infection. Les barres au-dessus des colonnes représentent les EC.

- La figure 5 illustre l'analyse sur gel d'agarose des produits d'amplification issus des réactions de PCR réalisées sur colonies à partir
15 de clones BPRA (PTX-, FHA+, DNT+) (piste 2), BPREDN (PTRE+, FHA+, DNT-) (piste 3), et BPSM (PTX+, FHA+, DNT+) (piste 4). La piste 1 correspond au marqueur de poids moléculaire.

- La figure 6 représente l'évolution de la colonisation par la souche BPREDN (PTRE+, FHA+, DNT-) des poumons de souris OF1 infectées à
20 l'âge de 3 semaines ou 8 semaines.

- La figure 7 représente les réponses sériques IgG observées 44 jours après administration intranasale de souris OF1 par la souche BPSM (PTX+, FHA+, DNT+) ou BPSMDN (PTX+, FHA+, DNT-), lesdites réponses étant dirigées contre :

- 25 A) la FHA, ou
 B) les antigènes totaux de BPSM.

Les barres au-dessus des colonnes représentent les EC.

- La figure 8 représente la cinétique de la réponse sérique IgG anti-FHA après administration de la souche de *B. pertussis* BPSMDN (PTX+,
30 FHA+, DNT-), ou BPRA (PTX-, FHA+, DNT+), ou encore BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-).

- La figure 9 illustre l'analyse sur gel d'agarose des produits issus des réactions de PCR réalisées sur colonies à partir de clones BPSM de *B. pertussis* contenant le plasmide pCR2.1-PporG1 (piste 2), ou pBBR-PporG1 (piste 3), ou encore pBBR-PporG2 (piste 4). La piste 1 correspond
5 au marqueur de poids moléculaire et la piste 5 à la construction plasmidique pCR2.1-PporG1.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants, donnés à titre purement illustratif. Il est entendu que la présente invention ne se limite en aucune façon auxdits exemples.

10

EXEMPLES

Exemple 1 : Construction d'une souche de *B. pertussis* déficiente dans la production de la toxine DNT

Le pouvoir potentiellement immunomodulateur de la toxine DNT a été montré lors d'une étude révélant que l'injection intraveineuse de DNT purifiée entraînait une diminution de la production d'anticorps contre des
15 antigènes coadministrés (Horiguchi *et al.* 1992. FEMS Microbiol. Lett. 90 : 229-234). Le rôle de la toxine DNT dans la virulence de la bactérie chez l'homme reste encore méconnu. Il a cependant été montré que l'injection de picogrammes de DNT entraînaît des lésions nécrotiques chez la souris
20 nouveau-né, et la dose létale chez des souris adultes était obtenue avec des nanogrammes de toxine (Zhang et Sekura. 1991, supra).

Afin de déterminer le rôle de la toxine DNT dans l'efficacité protectrice de *B. pertussis*, le gène *dnt* codant cette dernière a été délété du chromosome de la souche BPSM (Sm^R, Gen^S, Nal^R) (Menozzi, F.D. *et*
25 *al.* 1994, Infect. Immun. 62 :769-778). Pour ce faire, la souche BPSM a été croisée avec la souche mobilisante *E. coli* SM10(pJQDN) (Sm^S, Gen^R, Nal^S) sur un milieu solide Bordet-Gengou (milieu BG) contenant du sang défibriné de mouton et supplémenté par 10 mM MgCl₂ (Bordet, J. et Gengou, O. 1906. Ann. Institut Pasteur (Paris). 20 :731-741).

30 La construction du plasmide pJQDN a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les régions flanquantes 5' et 3' du gène

dnt ont été amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne) en utilisant l'ADN génomique de la souche BPSM comme matrice. Les oligonucléotides A: 5'-TATAGAATTCGCTCGGTTTCGCTGGTCAAGG-3' (SEQ ID No. 1) et B: 5'-TATATCTAGAGCAATGCCGATTCATCTTTA-3' (SEQ ID No. 2) ont été utilisés pour amplifier la région en amont (« *dnt up* ») tandis que les oligonucléotides C: 5'-TATATCTAGAGCGGCCTTTATTGCTTTTCC-3' (SEQ ID No. 3) et D: 5'-TATAAAGCTTCTCATGCACGCCGGCTTCTC-3' (SEQ ID No. 4) ont servi à l'amplification de la région en aval (« *dnt low* »).

Les fragments « *dnt up* » (799 pb) et « *dnt low* » (712 pb) ont respectivement été digérés par les couples d'enzymes de restriction *EcoRI* et *XbaI*, et *XbaI* et *HindIII*, dont les sites de coupure sont situés de part et d'autre desdits fragments. Les deux produits de digestion « *dnt up* » et « *dnt low* » ci-dessus ont été ligaturés en utilisant le kit Fast Link (TEBU, Madison, WI, USA). Le mélange de ligature ainsi obtenu a ensuite été utilisé comme matrice dans une réaction de PCR utilisant les oligonucléotides A et D ci-dessus. Le fragment PCR de 1505 pb obtenu a été cloné dans le plasmide pCR2.1-Topo (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Le fragment issu de la digestion par *EcoRI* de cette construction a été introduit dans le site *EcoRI* unique du plasmide pJQ200mp18rpsL (Pradel *et al.* 2000. *Infect.Immun.* 68 : 1919-1927). Le plasmide résultant, nommé pJQDN, a été transformé dans *E. coli* SM10 (Simon *et al.* 1983. *Bio/Technology.* 1 :784-791). Cette souche a ensuite été conjuguée avec la souche de *Bordetella* BPSM. Les deux événements de recombinaison homologue ont été sélectionnés comme décrit dans Loch *et al.* (1992, *supra*). La souche de *B. pertussis* ainsi obtenue a été nommée BPSMDN. Son génotype a été analysé par Southern blot pour s'assurer de la délétion du gène *dnt* (figure 1, piste 2). Les surnageants de culture de 4 clones BPSMDN ont été analysés par immunoblot en utilisant un anticorps polyclonal anti-FHA pour s'assurer que la production de la FHA n'était pas altérée dans la souche mutée.

La capacité de *B. pertussis* à adhérer à plusieurs types cellulaires présents dans les poumons étant essentielle lors de la première étape de l'infection, l'adhérence de BPSMDN a été comparée à celle de la souche sauvage BPSM sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines (A549 ; ATCC n°CCL-185) et sur une lignée de macrophages murins (J774 ; ATCC n°TIB-67). Dans cette expérience, illustrée par la figure 2, les lignées cellulaires A549 et J774 ont été cultivées pendant deux jours dans du milieu RPMI modifié comme décrit dans Alonso *et al.* (2001. Infect. Immun. 69 :6038-6043). Il a ainsi été observé que la souche BPSMDN était capable d'adhérer aux cellules A549 et J774 de manière aussi efficace que la souche sauvage BPSM (figure 2, colonnes A et B). Aussi, la DNT n'est pas apparue comme une adhésine requise pour l'attachement des bactéries aux cellules épithéliales et aux macrophages.

Exemple 2 : Protection contre une infection par *B. pertussis* de souris préalablement immunisées avec une souche déficiente dans la production de la toxine DNT

Dans un premier temps, la capacité de la souche BPSMDN à coloniser le tractus respiratoire des souris a été vérifiée. 4×10^6 bactéries en suspension dans du PBS stérile (cellules grattées d'une culture sur milieu solide BG) ont été instillées par voie intranasale, à raison de 20 μ l par narine, à des souris OF1 (souche non consanguine, souris femelles âgées de 6 à 8 semaines), sous anesthésie au pentobarbital.

Les poumons de 3 souris ont été prélevés 3 heures, puis 7, 14, 21 et 32 jours après l'administration. Les poumons ont été homogénéisés dans 5 ml de PBS stérile. Les bactéries ont été comptées 3 à 4 jours après étalement des broyats sur du milieu solide BG contenant 100 μ g/ml de streptomycine (BGS). Comme le montre la figure 3A, le nombre de bactéries BPSMDN augmentait dans les poumons des souris durant les sept premiers jours après l'administration intranasale, puis chutait au cours

des quatre semaines suivantes, à l'instar du nombre de bactéries correspondant à la souche sauvage BPSM.

Afin de déterminer si la souche déficiente dans la production de la toxine DNT protégeait de manière efficace contre une infection par la souche virulente de *B. pertussis*, des souris OF1 ont été infectées par la souche BPSM deux mois après l'administration intranasale de la souche BPSMDN.

Le vaccin commercial Tetravac-acellulaire, correspondant au vaccin diphtérique, tétanique, pertussique acellulaire et poliomyélitique inactivé et adsorbé (DTaPPol; Aventis-Pasteur, France), injecté par voie intrapéritonéale (100 µl soit 1/5 de la dose humaine), ainsi que la souche sauvage BPSM administrée par voie intranasale, ont été utilisés comme références pour la protection contre une infection avec BPSM. Le groupe contrôle correspondait à des souris naïves infectées intranasalement avec la souche BPSM.

L'on convient, afin de faciliter la lecture des Exemples, que l'expression « souris X » signifie « souris immunisées par X », où « X » représente la souche bactérienne ayant servi à l'immunisation des souris. Par exemple, « souris BPSM » et « souris BPSMDN » signifient respectivement « souris immunisées par la souche BPSM » et « souris immunisées par la souche BPSMDN ».

Sept jours après la seconde infection par BPSM, aucune bactérie viable n'était détectée dans les poumons des souris BPSMDN, pas plus que dans les poumons de souris BPSM (figure 3B). Comme attendu, les bactéries BPSM colonisaient les poumons des souris naïves du groupe contrôle. Les souris ayant reçu le vaccin commercial contre la coqueluche présentaient une réduction du nombre de bactéries d'un facteur 100 environ par rapport au groupe contrôle. Aussi, la souche BPSMDN était capable de protéger les souris contre une infection par la souche virulente BPSM.

Exemple 3 : Construction d'une souche déficiente dans la production des toxines DNT et PTX et analyse de son pouvoir protecteur

Le gène *dnt* a été délété du chromosome de la souche BPRA (PTX-, FHA+, DNT+) (Antoine, R. and Locht, C. 1990. Infect. Immun. 58 :1518-
5 1526) par conjugaison avec la souche mobilisante *E. coli* SM10(pJQDN) comme décrit dans l'Exemple 1. La souche de *B. pertussis* ainsi obtenue a été appelée BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-). Son génotype a été analysé par Southern-blot afin de vérifier la délétion du gène *dnt* (figure 1, piste 5).

La capacité de la souche BPRADN à coloniser le tractus respiratoire
10 des souris a été étudiée. Comme le montre la figure 4A, la souche BPRADN ne se multipliait pas au cours de la première semaine qui suivait l'administration. Cependant, la persistance des bactéries BPRADN au niveau des poumons durait aussi longtemps que celle de la souche parentale BPRA.

La capacité de la souche BPRADN à protéger les souris contre une
15 seconde infection avec la souche sauvage BPSM a été évaluée. Les souris ont été immunisées avec 4×10^6 bactéries de la souche BPSM (PTX+, FHA+, DNT+), ou BPRA (PTX-, FHA+, DNT+), ou encore BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-) en suivant le protocole d'immunisation décrit dans l'Exemple
20 2 supra. Le groupe contrôle correspondait à des souris non-immunisées.

Deux mois après l'immunisation, les souris ont été infectées par voie intranasale avec la souche sauvage BPSM.

Trois souris par groupe ont été sacrifiées à différents intervalles de temps, sur une durée totale de 14 jours, et le nombre de bactéries *B. pertussis* viables a été estimé par poumon (figure 4B).
25

Les souris du groupe contrôle présentaient une augmentation du nombre de bactéries BPSM dans les poumons durant les 10 premiers jours, puis ce nombre diminuait à partir du quatorzième jour. Chez les souris BPSM et BPRA, le nombre de bactéries diminuait rapidement après
30 la seconde infection par BPSM pour devenir indétectable dès le dixième jour. Le nombre de bactéries BPSM diminuait également dans les poumons

des souris BPRADN, mais plus lentement, et devenait nul au quatorzième jour après l'infection.

Donc, la souche BPRADN, déficiente dans la production de PTX et DNT, était capable de protéger les souris contre une colonisation efficace des muqueuses respiratoires par la souche virulente BPSM.

Exemple 4 : Construction d'une souche déficiente dans la production de la toxine DNT et exprimant une toxine PTX rendue enzymatiquement inactive par mutation

La toxine PTX étant un antigène protecteur majeur contre *B. pertussis*, une ou plusieurs mutations entraînant une perte des fonctions cytotoxiques tout en conservant les propriétés immunogéniques de la protéine, pourraient être préférables à l'absence totale de son expression chez la souche vivante de *B. pertussis* destinée à être utilisée comme vaccin.

Dans ce contexte, une souche déficiente dans la production de la toxine DNT et exprimant une toxine PTX rendue enzymatiquement inactive par mutation (ci-après dénommée toxine PTRE), a été construite. A cette fin, la souche BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-) a été croisée sur milieu solide BG avec la souche *E. coli* SM10(pJQ-PTRE) afin d'introduire le gène *ptre* codant la protéine PTRE par double recombinaison homologue au niveau du locus chromosomique occupé en temps normal par le gène *ptx*. La protéine PTRE correspond à une forme mutée atoxique de PTX et comprend les substitutions R9K et E129G dans la sous-unité S1 de PTX, ladite sous-unité étant responsable de l'activité enzymatique de la toxine (Lobet, Y. *et al.* 1993. J. Exp. Med. 177 :79-87).

Le gène *ptre* provient du plasmide pPTRE dérivant lui-même du plasmide pPT2 (Antoine, R. and C. Loch. 1992. Zentbl. Bakteriologie. Suppl. 23 : 292-293). Le fragment *EcoRI* de pPTRE contenant le gène *ptre* a été inséré dans le site *EcoRI* unique du plasmide pJQ200mp18rpsL. Le plasmide résultant, appelé pJQ-PTRE, a été transformé dans la souche

d'*E. coli* SM10. Le gène *ptre* a été introduit par double recombinaison homologue dans le chromosome des souches BPRA (PTX-, FHA+, DNT+) et BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-) pour donner respectivement les souches BPRE (PTRE+, FHA+, DNT+) et BPREDN (PTRE+, FHA+, DNT-). La présence du gène *ptre* dans la souche BPREDN a été vérifiée par PCR sur colonies à l'aide des oligonucléotides E : 5'-GCATCGCGTATTCGTTCTAGACCT-3' (SEQ ID No. 5) et F: 5'-CGTCGGCCAGGGCGGGGGAAAGATG-3' (SEQ ID No. 6) qui permettent l'amplification du gène codant la sous-unité S2 (838pb) de PTX conservée dans PTRE (figure 5, piste 3).

Exemple 5 : Analyse de la capacité de la souche BPREDN à coloniser le tractus respiratoire murin

La capacité de la souche BPREDN à coloniser le tractus respiratoire de souris, respectivement âgées de 3 et 8 semaines au moment de l'infection, a été vérifiée. Comme le montre la figure 6, le nombre de bactéries BPREDN augmentait dans les poumons de souris durant les sept premiers jours suivant l'administration intranasale, puis chutait au cours des deux semaines suivantes.

Exemple 6 : Analyse de l'immunogénicité des souches de *B. pertussis* déficientes dans la production de la toxine DNT après administration intranasale

Afin de déterminer si la toxine DNT joue un rôle dans l'immunogénicité de *B. pertussis*, des souris ont été immunisées avec la souche BPSM (PTX+, FHA+, DNT+) ou BPSMDN (PTX+, FHA+, DNT-) par voie intranasale conformément au protocole décrit dans l'Exemple 2 supra. Les souris ont été saignées 44 jours plus tard par ponction au niveau du plexus rétroorbital. Les sérums ont été conservés à -20°C pour analyse. Les taux d'anticorps ont été déterminés selon la technique ELISA (Enzyme-

Linked ImmunoSorbant Assay : dosage par immunoabsorption en présence d'une enzyme) pour 3 à 5 souris par groupe (figure 7).

Comme l'illustre la figure 7A, une réduction significative de la réponse anti-FHA était observée chez les souris BPSMDN, en comparaison de la réponse des souris BPSM. Sur cette figure, le crochet horizontal et l'astérisque indiquent que la différence est significativement différente [$p \leq 0,05$] en appliquant le test de Student aux résultats obtenus. De manière remarquable, cette différence était spécifique de la réponse anti-FHA puisqu'elle n'était pas observée s'agissant de la réponse IgG sérique contre les antigènes totaux de BPSM (figure 7B). Donc, la production de la toxine DNT par *B. pertussis* influençait l'induction d'une réponse immunitaire spécifique contre la FHA.

Il a précédemment été montré que l'administration intranasale de la souche BPRA (PTX-, FHA+, DNT+) induisait une réponse sérique spécifique anti-FHA plus précoce et plus élevée que l'administration de la souche BPSM (PTX+, FHA+, DNT+) (Mielcarek *et al.* 1998. Nat. Biotechnol. 16 :454-457, demande de brevet FR 96 12461, demande internationale de brevet WO 98/16553).

Afin d'évaluer l'immunogénicité d'une souche déficiente dans la production des deux toxines PTX et DNT, des souris OF1 ont été immunisées par voie intranasale avec 4×10^6 bactéries BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-) dans 40 μ l. L'intensité de la réponse sérique IgG anti-FHA observée chez ces souris a été comparée à celle obtenue après administration de la souche BPRA (PTX-, FHA+, DNT+) ou BPSMDN (PTX+, FHA+, DNT-). La cinétique de la réponse immunitaire sérique a été effectuée sur des groupes de 3 à 5 souris par temps (figure 8).

Une faible réponse anticorps anti-FHA a été détectée chez les souris BPSMDN, avec un titre maximum obtenu 44 jours après immunisation (figure 8). En revanche, une production élevée d'anticorps anti-FHA a été obtenue 20 jours après administration de la souche BPRADN. Cette production a ensuite diminué progressivement durant les 45 jours qui ont

suivi. Cette cinétique de réponse immunitaire était comparable à celle observée chez les souris BPRA, indiquant donc que le défaut de production de la toxine DNT dans une souche également déficiente dans la production de la toxine PTX n'influçait pas de manière significative l'immunogénicité de la souche de *B. pertussis*.

Exemple 7 : Construction de plasmides permettant la surexpression de la protéine AmpG native ou mutée, impliquée dans le recyclage de la toxine TCT, dans des souches de *B. pertussis*

10 Parmi les différentes toxines produites par *B. pertussis* et outre les toxines PTX et DNT, la cytotoxine TCT représente une autre cible potentielle permettant de rendre les souches vivantes de *Bordetella* moins virulentes, voire avirulentes, aux fins de leur utilisation comme vaccins. Ainsi a-t-on cherché à réduire la libération de la TCT.

15 Une stratégie était donc d'insérer un promoteur constitutif fort, en l'occurrence le promoteur du gène de la porine majeure (*Ppor*) de *B. pertussis*, en amont du gène *ampG* afin d'en augmenter l'expression. Le promoteur *Ppor* a été amplifié par PCR en utilisant comme matrice le plasmide pBBPG, et les oligonucléotides suivants : G : 5'-
20 TATACTCGAGCCCGCGCGGATTCCGGATT-3' (SEQ ID No. 7) et H : 5'-
TTTTTCATGAAAGAAATCTCCGTTGATTTG-3' (SEQ ID No. 8). Le plasmide pBBPG dérive du plasmide pBBR1MCS (Kovach, M.E., *et al.* 1994. *Biotechniques* 16 :800-802) et contient le promoteur *Ppor* de BPSM (Li, Z.M., *et al.* 1991. *Mol. Microbiol.* 5 :1649-1656). Ledit promoteur a été
25 inséré dans pBBPG au niveau des sites *XhoI* et *BspHI* après amplification par PCR en utilisant les oligonucléotides G et H supra, et l'ADN génomique de BPSM comme matrice. Le fragment PCR ainsi obtenu a été cloné dans le plasmide pCR2.1-Topo (supra) pour donner le plasmide pCR2.1-*Ppor*.

En parallèle, le gène *ampG* de *B. pertussis* (*ampG1*) a été amplifié
30 par PCR en utilisant les oligonucléotides I : 5'-
TATACCATGGCGCCGCTGCTGGTGCTGGGC-3' (SEQ ID No. 9) et J : 5'-

TATATCTAGACGCTGGCCGTAACCTTAGCA-3' (SEQ ID No. 10) et l'ADN génomique de BPSM comme matrice. Le gène *ampG1* a ainsi été muté de manière à remplacer le résidu valine situé à l'extrémité N-terminale de la protéine AmpG1 par une méthionine.

5 La protéine AmpG d'*E. coli* possède une extension N-terminale de 13 acides aminés que la protéine homologue de *B. pertussis* ne possède pas. Un variant du gène *ampG*, appelé *ampG2*, a été construit. Ce variant code la protéine AmpG de *B. pertussis* à laquelle ont été rajoutés les 13 acides aminés N-terminaux de la protéine AmpG de *E. coli*. Le gène
10 *ampG2* a donc été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides K : 5'-ATTACCATGGCCAGTCAATATTTACGTATTTTTCAACAGCCGCGTGCCGCTGCTGGTGGCTGGGCTTTGCCAGC-3' (SEQ ID No. 11) et J (supra). L'analyse de la séquence du fragment PCR ainsi obtenu a mis en évidence deux substitutions dans *ampG2*, remplaçant une méthionine par une
15 thréonine en position +62 et une sérine par une glycine en position +852.

Les fragments PCR *ampG1* et *ampG2* ont été clonés dans pCR2.1-Topo pour former respectivement les plasmides pCR2.1-G1 et pCR2.1-G2.

Le fragment *Ppor* a été obtenu par digestion du plasmide pCR2.1-Ppor à l'aide des enzymes *HindIII* et *BspH1*. Les fragments *ampG1* et
20 *ampG2* ont été respectivement obtenus par digestion de pCR2.1-G1 et pCR2.1-G2 par *NcoI* et *XbaI*. Les fragments *Ppor* et *ampG1*, ainsi que *Ppor* et *ampG2*, ont ensuite été ligaturés en utilisant le kit Fast Link (supra). Les mélanges de ligature ont été utilisés comme matrice pour une réaction de PCR utilisant les oligonucléotides G et J ci-dessus. Les fragments PCR de
25 1500 pb ainsi obtenus ont été clonés dans le plasmide pCR2.1-Topo pour former les plasmides pCR2.1-Ppor-G1 et PCR2.1-Ppor-G2. Les fragments *EcoRI* dérivant de ces plasmides ont été introduits dans le site *EcoRI* unique du plasmide pBBR1MCS (Kovach *et al.* 1994. Bio/Techniques. 16:800-802) pour donner respectivement les plasmides pBBR-Ppor-G1 et
30 pBBR-Ppor-G2.

Les plasmides pCR2.1-Ppor-G1, pCR2.1-Ppor-G2, pBBR-Ppor-G1 et pBBR-Ppor-G2 ont été électroporés dans la souche BPSM et la présence des constructions plasmidiques a été vérifiée par PCR sur colonies (figure 9).

5

Exemple 8 : Insertion dans le chromosome de *B. pertussis* des constructions génétiques permettant la surexpression de la protéine AmpG native ou mutée, impliquée dans le recyclage de la toxine TCT

Les constructions contenant le gène *ampG* natif ou muté sous le contrôle du promoteur porine *Ppor* ont été insérées par double recombinaison homologue au niveau du locus chromosomique de *ampG*.

Pour permettre cette double recombinaison homologue, un fragment de 862 pb, nommé *met* et situé en amont du gène *ampG*, a été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides L : 5'-TATAAAGCTTCGATTTCTGCTGGTTTCGT-3' (SEQ ID No. 12) et M : 5'-TATAGGATCCCGATACAGCGCCAATGTACT-3' (SEQ ID No. 13) et l'ADN génomique de BPSM comme matrice. Le fragment *met* est lui-même situé en amont d'une séquence d'insertion IS481 qui a été par conséquent éliminée du fait la double recombinaison homologue. Le fragment PCR *met* a été cloné dans le plasmide pCRII-Topo (TEBU, supra) pour former le plasmide pCRII-Met. Ce plasmide a été digéré par *HindIII* et *BamHI*, et le fragment de 862 pb correspondant à *met* a été introduit dans les plasmides pCR2.1-G1 et pCR2.1-G2 pour donner respectivement les plasmides pCR2.1-MetG1 et pCR2.1-MetG2. Ces derniers plasmides ont été digérés par *HindIII* et *XbaI* afin d'extraire un fragment contenant *met* situé en amont de la construction *pPor-AmpG*. Les fragments de 2500 pb ainsi extraits ont alors été clonés dans le plasmide pJQ200mp18rpsL préalablement digéré par *HindIII* et *XbaI*, pour donner respectivement les plasmides pJQMetG1 et pJQMetG2. Ces plasmides ont été transformés dans la souche de *E. coli* SM10 afin de permettre l'insertion par double recombinaison homologue de la construction *Ppor-ampG1* et *Ppor-ampG2* dans le génome de *B.*

pertussis. Les souches issues du croisement avec BPRADN (PTX-, FHA+, DNT-) ou BPREDN (PTRE+, FHA+, DNT-) ont été respectivement appelées BPZA1 et BPZA2, et BPZE1 et BPZE2.

Des souris OF1 sont immunisées par voie intranasale afin de vérifier
5 que les souches BPZA1, BPZA2, BPZE1 et BPZE2 ont gardé leur capacité
à coloniser le tractus respiratoire des souris. Les réponses sériques et
muqueuses (dans les lavages broncho-alvéolaires) dirigées contre la FHA
et contre les antigènes totaux de *B. pertussis* sont analysées par ELISA
comme décrit dans l'Exemple 6 supra. Le pouvoir protecteur des souches
10 atténuées de *B. pertussis* sus-citées est évalué comme indiqué dans
l'Exemple 2 ci-dessus.

REVENDICATIONS

1. Souche de *Bordetella* déficiente dans la production de la toxine de
5 *B.pertussis* PTX par atténuation génétique via la mutation ou la délétion du
gène codant ladite toxine PTX et déficiente dans la libération de la toxine
cytotrachéale TCT par insertion d'un promoteur fort en amont du gène
codant la protéine AmpG.
- 10 2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est en
outre déficiente dans la production de la toxine dermonécrotique DNT par
atténuation génétique via la mutation ou la délétion du gène codant la
toxine DNT.
- 15 3. Souche selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le
gène codant la toxine PTX est muté au niveau de la région codant la sous-
unité S1 de ladite toxine.
4. Souche selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite
20 délétion est totale ou partielle.
5. Souche selon l'une quelconque des revendications 1 et 2 à 4,
caractérisée en ce que ladite mutation ou ladite délétion partielle entraîne la
synthèse d'une protéine atoxique.
25
6. Souche selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit
promoteur fort est choisi parmi les promoteurs forts de *Bordetella*, et est de
préférence le promoteur du gène de la porine majeure de *Bordetella*.

7. Souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle produit au moins une protéine hétérologue, de préférence hybride.
- 5 8. Souche selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite protéine hétérologue est cytoplasmique et/ou de surface et/ou sécrétée.
9. Souche selon la revendication 7, caractérisée en ce que le gène codant ladite protéine hétérologue est porté par un plasmide ou inséré dans
10 le chromosome.
10. Souche selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite protéine hétérologue est une protéine hybride comprenant au moins une partie d'une adhésine de *Bordetella* et au moins tout ou partie d'une
15 protéine antigénique hétérologue vis-à-vis de ladite adhésine et susceptible d'être exprimée par des microorganismes pathogènes lors d'infections muqueuses ou systémiques.
11. Souche selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite
20 adhésine est la FHA.
12. Souche selon la revendication 11, caractérisée en ce que la partie de la FHA comprend au moins la région N-terminale de la FHA mature contenant le site d'interaction avec l'héparine et suffisante à elle seule pour
25 entraîner la sécrétion de la protéine hybride formée.
13. Souche selon la revendication 10, caractérisée en ce que la partie de la protéine antigénique comprend au moins un épitope de celle-ci.

14. Souche selon la revendication 10, caractérisée en ce que la protéine antigénique est choisie dans le groupe comprenant la toxine tétanique et la toxine diphtérique.
- 5 15. Procédé d'obtention d'une souche selon la revendication 1, comprenant au moins les étapes suivantes :
- la mutation ou la délétion du gène codant la toxine de *B. pertussis* PTX ; et
 - l'insertion d'un promoteur fort en amont du gène codant la protéine
- 10 AmpG.
16. Procédé d'obtention d'une souche selon la revendication 2, comprenant au moins les étapes suivantes :
- la mutation ou la délétion des gènes codant la toxine de *B. pertussis* PTX et la toxine dermonécrotique DNT ; et
 - l'insertion d'un promoteur fort en amont du gène codant la protéine
- 15 AmpG.
17. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que le
- 20 gène codant la toxine PTX est muté au niveau de la région codant la sous-unité S1 de ladite toxine.
18. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que ladite délétion est totale ou partielle.
- 25 19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé en ce que ladite mutation ou ladite délétion partielle entraîne la synthèse d'une protéine atoxique.

20. Procédé selon la revendication 15 ou 16, caractérisé en ce que ledit promoteur fort est choisi parmi les promoteurs forts de *Bordetella*, et est de préférence le promoteur du gène de la porine majeure de *Bordetella*.
- 5 21. Procédé selon la revendication 15 ou 16, comprenant en outre une étape d'introduction dans la souche d'au moins un gène codant une protéine hétérologue, de préférence hybride.
- 10 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que ledit gène est porté par un plasmide ou inséré dans le chromosome.
- 15 23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que ledit gène code une protéine hybride comprenant au moins une partie d'une adhésine de *Bordetella* et au moins tout ou partie d'une protéine antigénique hétérologue vis-à-vis de ladite adhésine et susceptible d'être exprimée par des microorganismes pathogènes lors d'infections muqueuses ou systémiques.
- 20 24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'adhésine est la FHA.
- 25 25. Utilisation d'une souche déficiente de *Bordetella* selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la préparation de vaccins contre des infections muqueuses ou systémiques liées à *Bordetella*, notamment contre la coqueluche.
- 30 26. Utilisation d'une souche déficiente de *Bordetella* selon l'une quelconque des revendications 7 à 14, pour la production de tout ou partie d'au moins une protéine antigénique susceptible d'être exprimée par des microorganismes pathogènes lors d'infections muqueuses ou systémiques.

27. Composition immunogène comprenant, en tant que principe actif, au moins une souche déficiente de *Bordetella* selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans une formulation pharmaceutiquement acceptable.

5

28. Composition immunogène selon la revendication 27, caractérisée en ce que ladite souche est associée à des adjuvants.

29. Composition immunogène selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être administrée par voie intranasale chez l'homme et/ou chez l'animal.

10

1/9

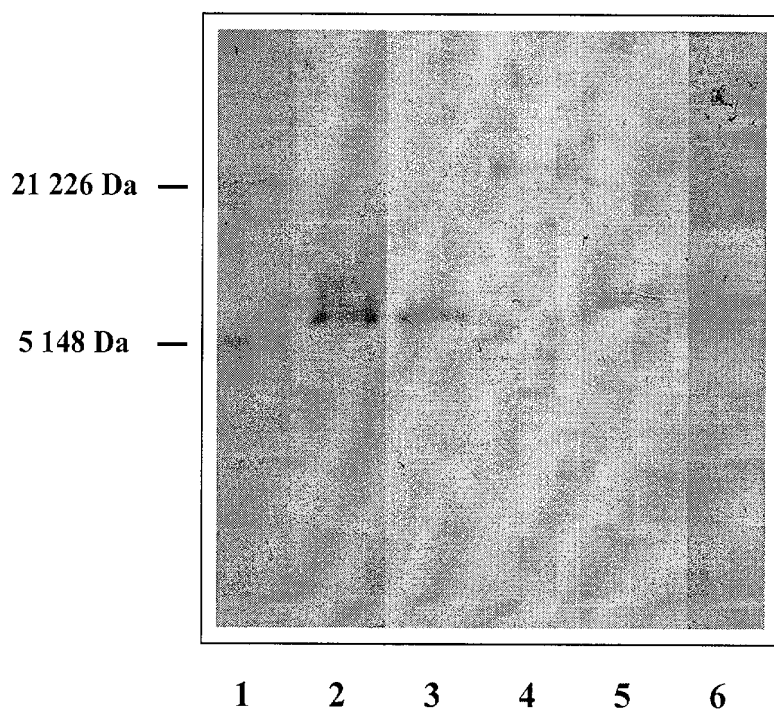


Fig. 1

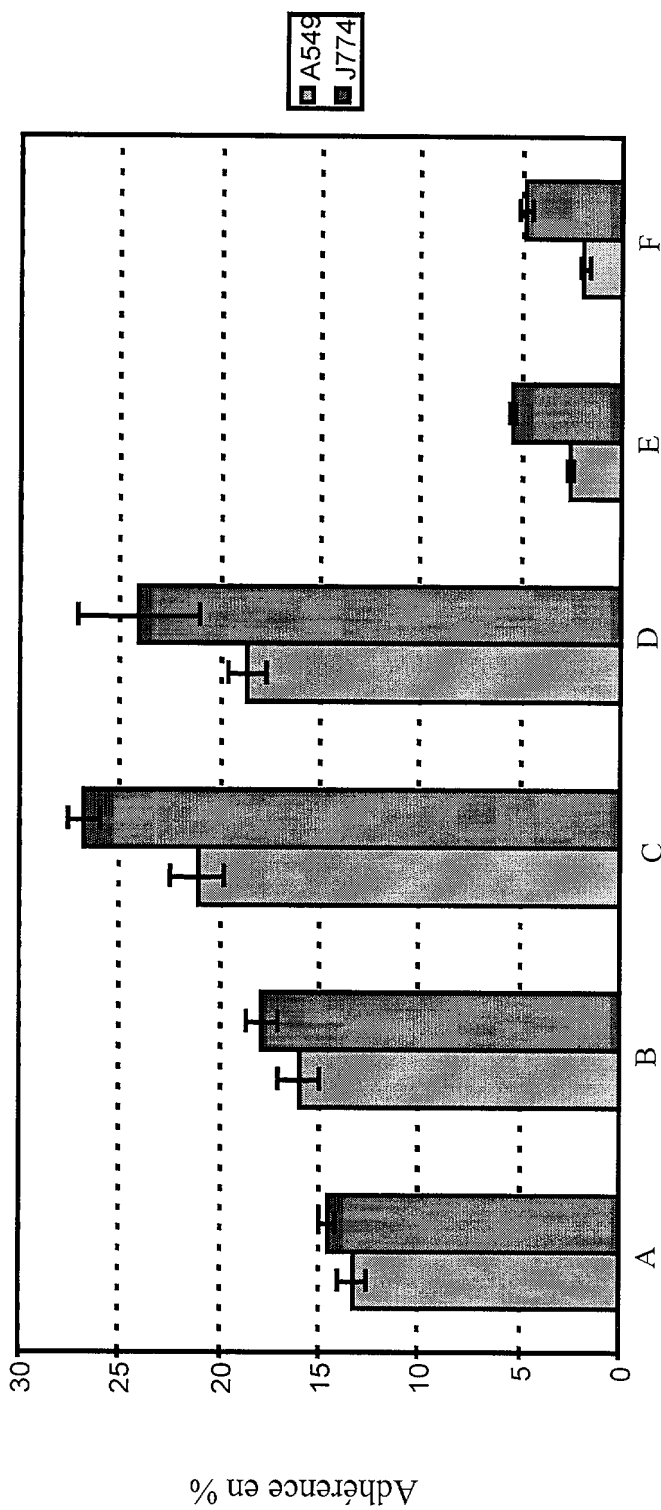
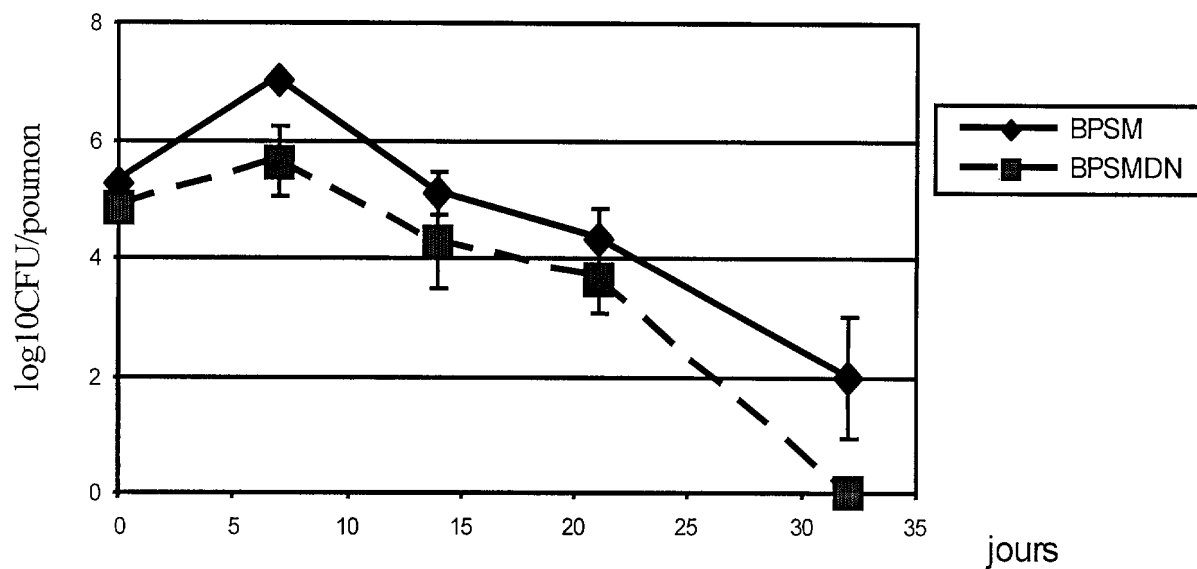
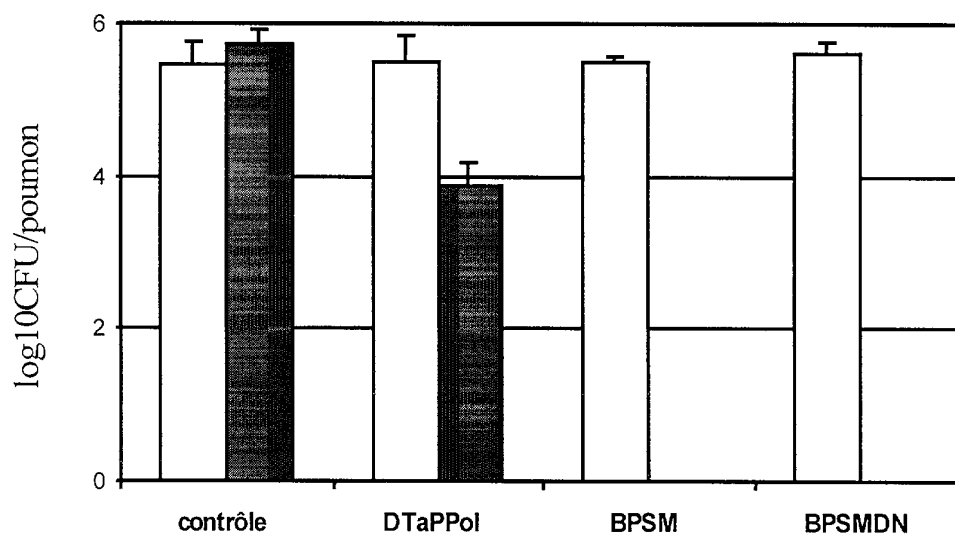
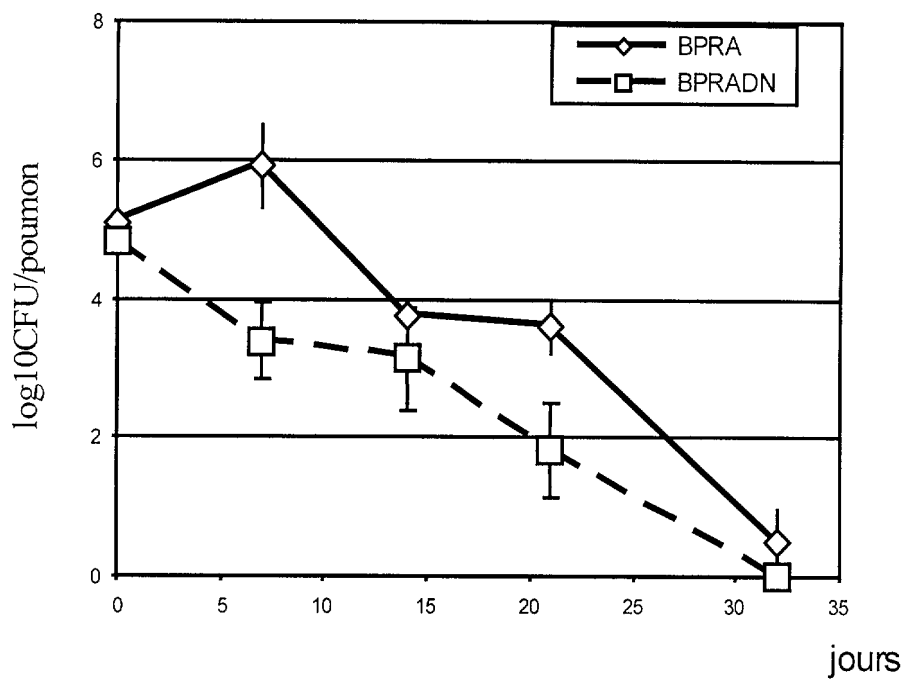
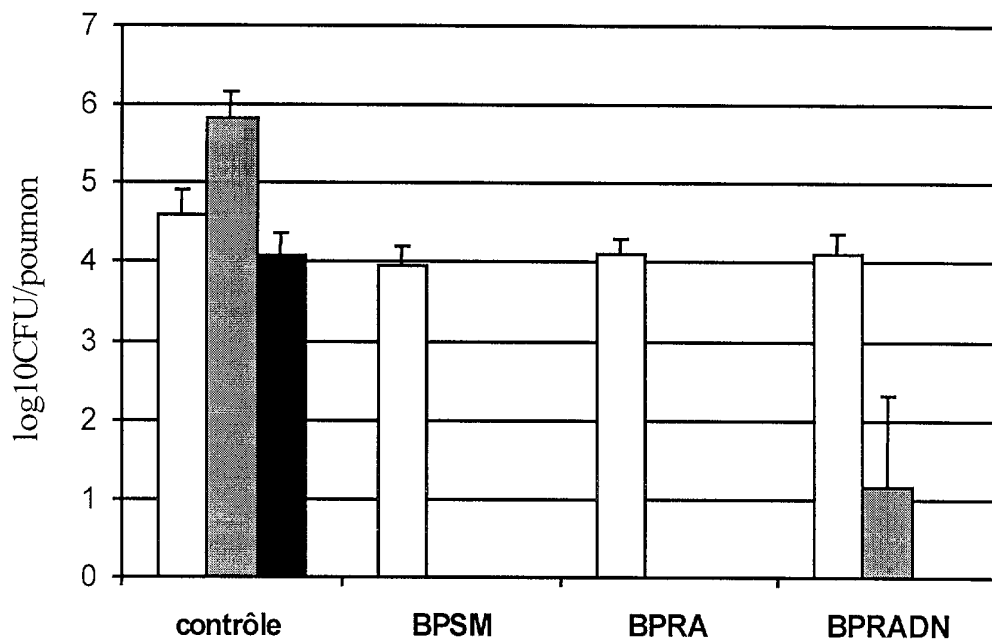


Fig. 2

3/9

**Fig. 3a****Fig. 3b**

4/9

**Fig. 4A****Fig. 4B**

5/9

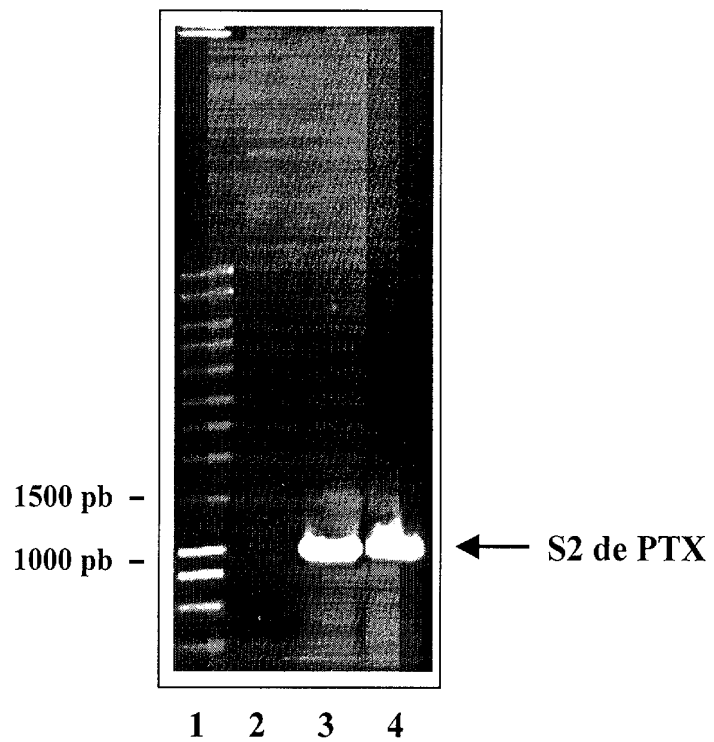
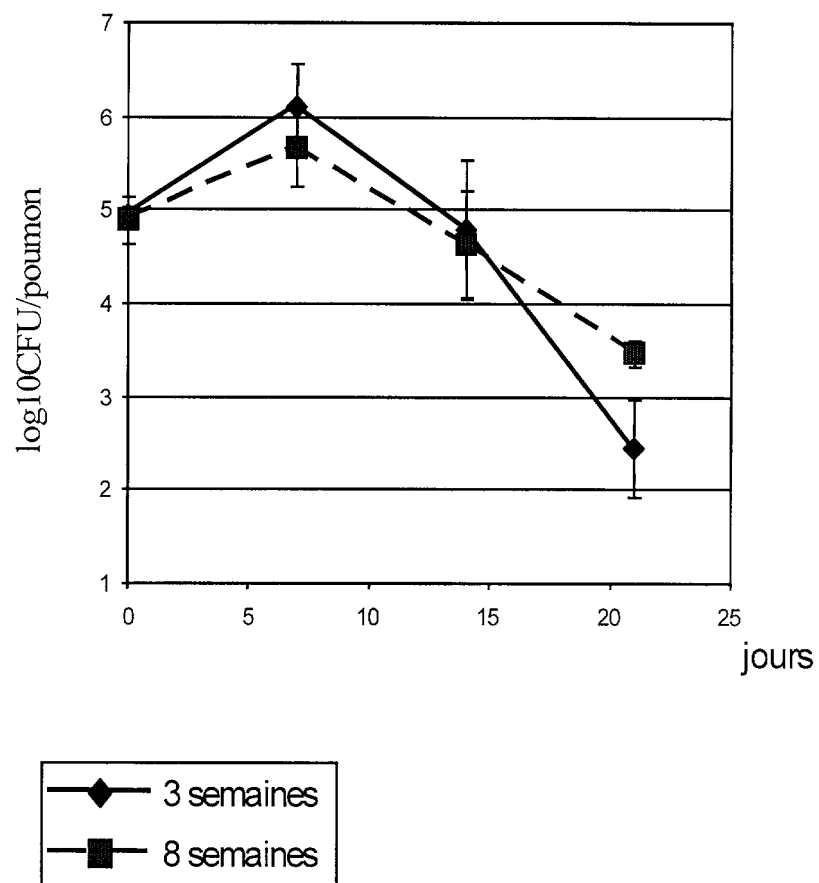


Fig. 5

6/9

**Fig. 6**

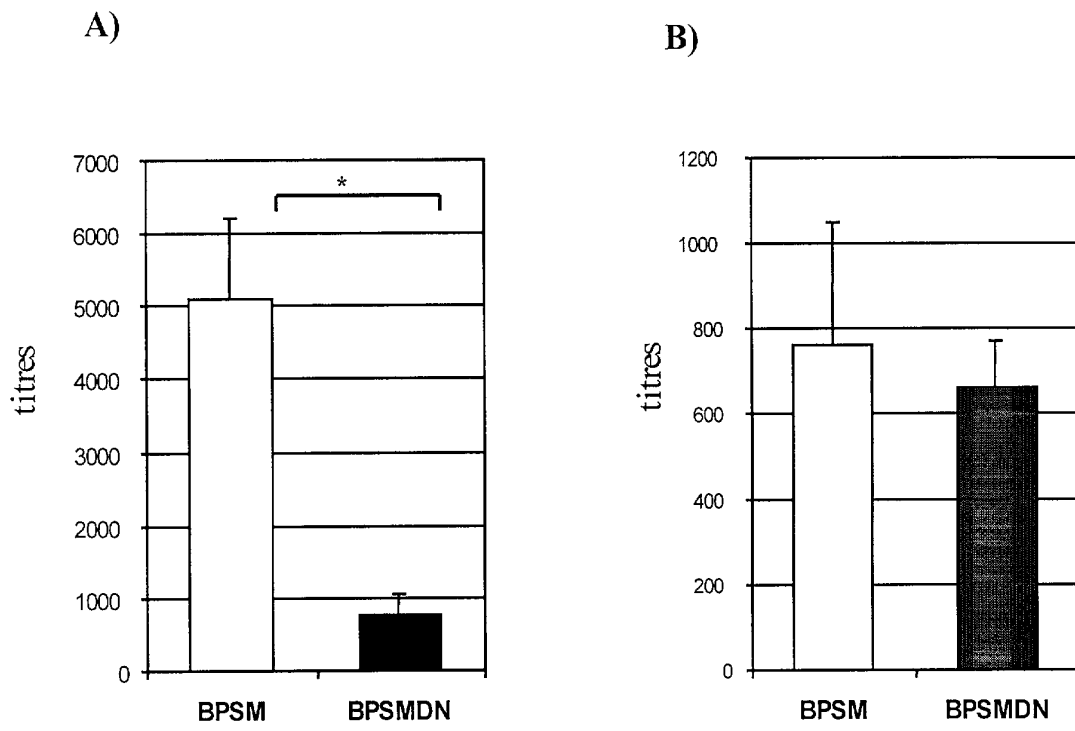
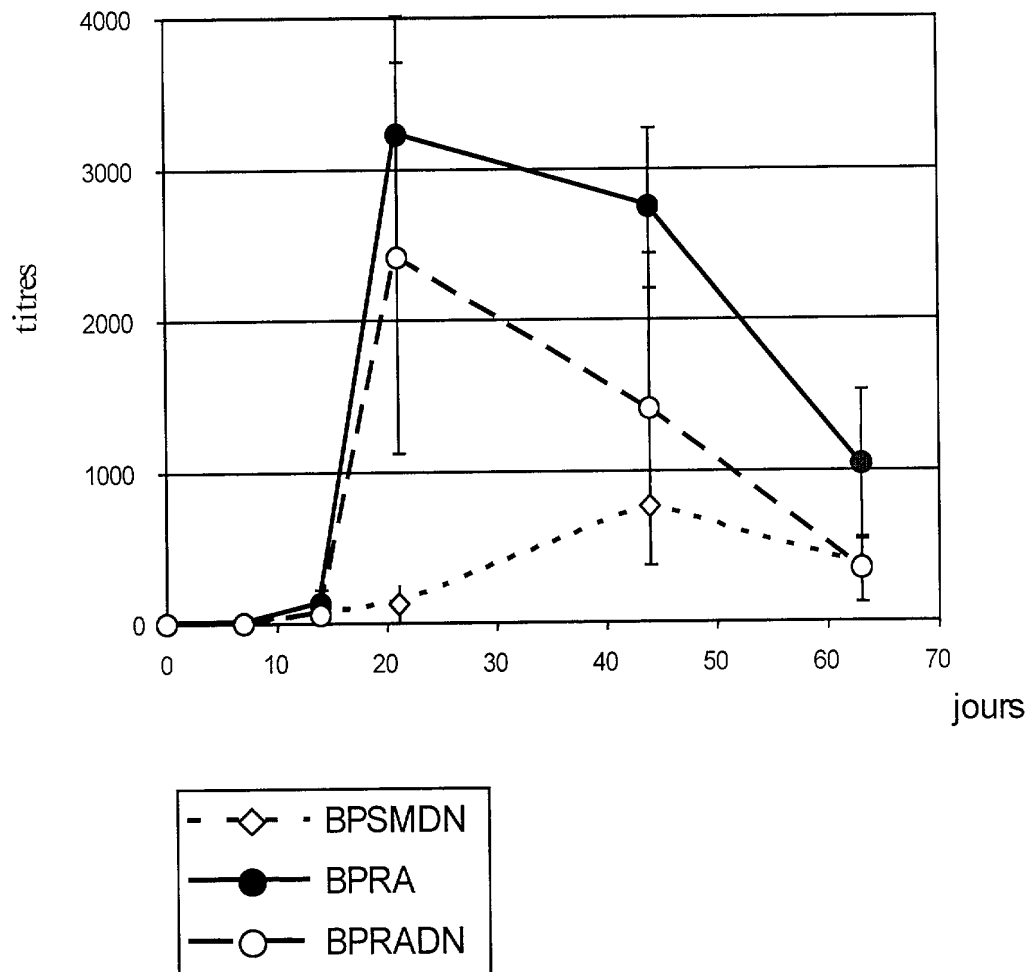


Fig. 7

8/9

**Fig. 8**

9/9

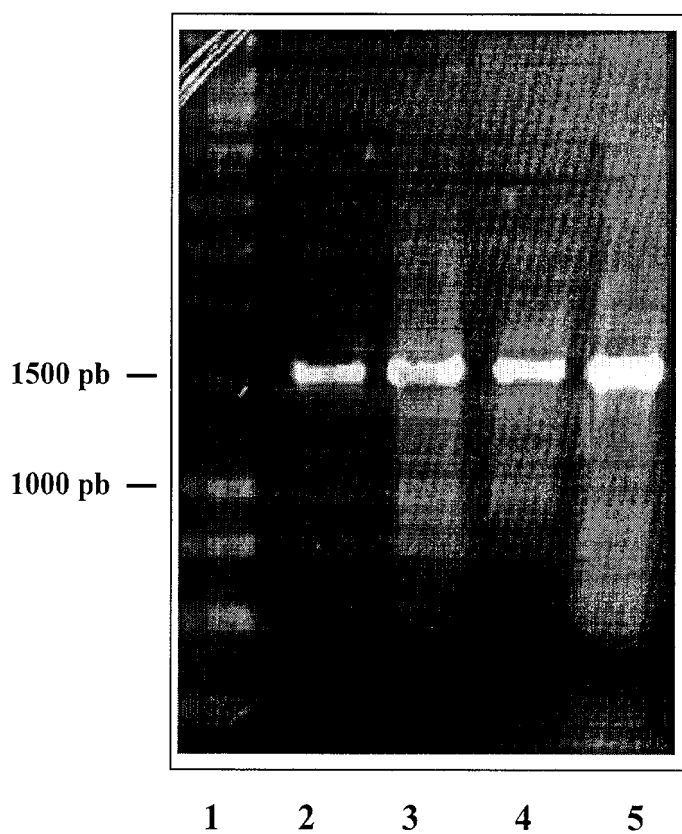


Fig. 9



2840319

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 622679
FR 0206666

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,Y	WO 98 16553 A (INST NAT SANTE RECH MED ;LOCHT CAMILLE (FR); RIVEAU GILLES (FR); C) 23 avril 1998 (1998-04-23) * abrégé * * page 6, ligne 31 - page 7, ligne 29 * * page 9, ligne 11-20; exemple 2 * ---	1-5, 7-14, 17-19, 21-29	C12N1/21 A61K39/10 A61P31/04
Y	STITH REBECCA ET AL: "The link between tracheal cytotoxin production and peptidoglycan recycling in Bordetella pertussis." ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR, vol. 96, 1996, page 184 XP008013937 96th General Meeting of the American Society for Microbiology;New Orleans, Louisiana, USA; May 19-23, 1996, 1996 ISSN: 1060-2011 Abstract B-169 ---	1-5, 7-14, 17-19, 21-29	
Y	WALKER KIMBERLY E ET AL: "Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus Bordetella." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 62, no. 9, 1994, pages 3817-3828, XP001109702 ISSN: 0019-9567 * abrégé * * page 3819, colonne de droite, alinéa 2 * * page 3822, colonne de droite, alinéa 3 - page 3823, colonne de gauche, alinéa 1 * * page 3823, colonne de droite, alinéa 2 - page 3825, colonne de gauche, alinéa 1 * --- -/--	2	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 mars 2003		Mateo Rosell, A.M.	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

3

EPO FORM 1503 12.99 (PofC14)



2840319

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 622679
FR 0206666

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	LI Z M ET AL: "CLONING AND SEQUENCING OF THE STRUCTURAL GENE FOR THE PORIN PROTEIN OF BORDETELLA-PERTUSSIS" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 5, no. 7, 1991, pages 1649-1656, XP008014069 ISSN: 0950-382X * abrégé; figure 2 * -----	6,20	
A,D	WO 95 28468 A (JEFFREY JANICE ;PARK JOHN SCOTT (GB); BASTON GAIL MARGARET (GB); P) 26 octobre 1995 (1995-10-26) * abrégé * * page 28, alinéa 4 - page 30, alinéa 1 * -----	7,10-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
19 mars 2003		Mateo Rosell, A.M.	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

3

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0206666 FA 622679**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 19-03-2003
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9816553 A	23-04-1998	FR 2754543 A1	17-04-1998
		AU 725137 B2	05-10-2000
		AU 4627897 A	11-05-1998
		EP 0941241 A1	15-09-1999
		WO 9816553 A1	23-04-1998
		JP 2001507568 T	12-06-2001
WO 9528468 A	26-10-1995	CA 2187302 A1	26-10-1995
		CN 1150816 A , B	28-05-1997
		EP 0755435 A1	29-01-1997
		JP 9512048 T	02-12-1997
		WO 9528468 A1	26-10-1995