

ROYAUME DE BELGIQUE

BREVET D'INVENTION



NUMERO DE PUBLICATION : 1002022A7

NUMERO DE DEPOT : 8900456

Classif. Internat.: A61K

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 22 Mai

1990

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 25 Avril 1989 à 14h55
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : ANDA BIOLOGICALS
rue de la Course 37, 67000 STRASBOURG(FRANCE)

représenté(e)(s) par : VIGNERON Jean, CABINET VIGNERON, Av. Gén.de
Longueville 22 Bt 13 - 1150 BRUXELLES.

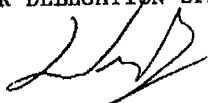
un brevet d' invention d' une durée de 6 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : ANTIGENE A60 DE MYCOBACTERIES ET SON UTILISATION COMME TUBERCULINE ET COMME VACCIN.

INVENTEUR(S) : Maes Roland R., ''Bildhauerhof'', Rosheim 34, 67190 Mutzig (FR)

Priorité(s) 29.04.88 US USA 187919

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 22 Mai 1990
PAR DELEGATION SPECIALE :


WUYTS L.
Directeur.

**"Antigène A60 de mycobactéries et son utilisation
comme tuberculine et comme vaccin".**

Champ d'application de l'invention

Cette invention a trait à un antigène dérivé de mycobactéries et se rapporte plus particulièrement à un antigène interspécifique de mycobactéries montrant après contre-électrophorèse un pattern de précipitation immunoélectrophorétique correspondant à l'antigène 60 de *M. bovis*, souche BCG et à l'utilisation de cet antigène A60 comme vaccin pour l'immunisation contre la tuberculose et maladies associées, ainsi que d'antigène de détection pour indiquer une immunité cellulaire par une réaction d'hypersensibilité retardée.

Aperçu historique

Il est connu que l'immunisation active contre la tuberculose humaine et bovine et la détection de réaction de sensibilité retardée qui sont à la base de tests cutanés pour la tuberculose peuvent être effectuées avec un matériel extrait de *M. bovis*, souche BCG (bacille Calmette Guérin).

Ce matériel extrait de BCG, également appelé vieille tuberculine (Old Tuberculin, OT) et dérivé protéique purifié (purified protein derivative PPD) sont des composés hétérogènes.

Des campagnes de vaccination utilisant ces matériels sont connues comme ayant totalement échoué dans la protection des populations vaccinées. L'immunisation contre la lèpre a parfois été effectuée dans le passé avec de la tuberculine. Certaines tuberculines, cependant, ont été sans activité pour cet objectif.

Il y a donc, en conséquence, un besoin pour un matériel antigénique plus pur et mieux caractérisé, possédant une efficacité plus grande et mieux assurée pour la prévention de la tuberculose et maladies associées ainsi que pour le test cutané pour ces maladies.

Il a été trouvé qu'un matériel antigénique de poids moléculaire élevé, rattaché par des aspects immunochimiques importants

à l'antigène A60 et M. bovis, souche BCG, peut être extrait de diverses espèces mycobactériennes sous une forme essentiellement immuno-chimiquement pure par la méthode revendiquée dans l'application de US 678,170, introduite le 5 décembre 1984.

5 Ce matériel antigénique a été prouvé possédant les propriétés nécessaires pour servir d'antigène de capture dans des tests diagnostiques et a donné lieu au développement d'un test diagnostique sérologique valable, également revendiqué dans cette application.

10 En se basant sur le test de détection élaboré et raffiné ainsi disponible, il a été maintenant établi que le matériel antigénique A60 en question possède des propriétés immunogéniques actives lorsqu'administré en tant que vaccin et qu'il peut également être utilisé de façon efficace comme antigène de mise en évidence
15 dans des tests de sensibilité retardée pour confirmer l'acquisition d'une immunité après vaccination ainsi que l'exposition antérieure du sujet à une infection tuberculeuse.

Résumé descriptif

L'antigène A60 de poids moléculaire élevé est un
20 puissant immunogène, capable de susciter, lorsqu'administré en quantité suffisamment importante sous forme de vaccin, la formation sous l'aspect d'une réponse immunitaire humorale de quantités importantes d'anticorps circulants ainsi que l'hypersensibilité retardée en tant que réponse immunitaire cellulaire ainsi que capable de servir d'antigène
25 de révélation lorsqu'administré en quantité beaucoup plus réduite pour indiquer ou révéler une hypersensibilité existante, initiée de façon naturelle ou artificielle.

Cet antigène possède le potentiel de remplacer les produits actuellement employés d'origine tuberculaire, en tant
30 qu'agent d'immunisation pour prévenir la tuberculose et maladies associées et en tant qu'agent de sensibilisation ou antigène de révélation utilisé dans les tests cutanés pour ces maladies.

Description des dessins

La figure 1 illustre le système de référence (Closs
35 et al. Scand. J. Immunol. 1980 12,249-263) pour les antigènes extra-

cellulaires de M. bovis BCG obtenus par immunoélectrophorèse bidimensionnelle et colorés par le bleu de Comassie, la 2e dimension étant réalisée à travers un gel contenant du sérum anti-BCG total.

5 La figure 2 montre des dessins immunoélectrophorétiques résultant d'une chromatographie d'exclusion d'un échantillon cytoplasmique de M. bovis BCG où A est le cytoplasme initial, B est le pic d'exclusion constitué essentiellement entièrement d'antigène A60 et C est le pic d'inclusion contenant la masse protéinique reliquate.

10 La figure 3 est un graphique des degrés de réaction cutanée mesurés par les diamètres observés, en millimètres, des surfaces gonflées résultant de l'injection d'un antigène de révélation en quantités variables, exprimé en microgrammes de l'antigène A60 chez des cobayes d'expérience présensibilisés par des bactéries tuées M. bovis, d'où la quantité minimum d'antigène capable d'élucider
15 une réaction détectable peut être déduite.

Isolation des antigènes A60

Un grand nombre de souches différentes de mycobactéries ont été utilisées pour l'extraction de l'antigène A60 et furent obtenues principalement de la collection nationale de cultures de
20 microorganismes, C.N.C.M., Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75734 Paris, France. Une autre source a été la station expérimentale d'aviculture B.P.9., 22440 Ploufsagan, France.

Les bactéries (excepté M. leprae) sont multipliées dans le milieu de Dubos avec 5 % de sérum décomplémenté de cheval.
25 Elles sont collectées à la fin de la phase de croissance par centrifugation et les parois bactériennes sont détruites par compression et décompression dans une cellule de French (Aminco Instruments, Silver Spring, Md, U.S.A.) à 8.000 p.s.i. (55,152 MPa) et 4°C.

L'antigène A60 de diverses mycobactéries est aisément
30 isolé et purifié en une seule étape chromatographique. Les homogénats de différentes mycobactéries sont centrifugés à 2.000 r.p.m. durant 10' à 4°C pour éliminer les débris cellulaires du surnageant contenant le cytoplasme. Lorsqu'un échantillon cytoplasmique de M. bovis BCG est soumis à une immunoélectrophorèse bidimensionnelle, les différents
35 constituants antigéniques sont fractionnés selon le dessin illustré dans la figure 1.

Plus précisément, le dessin de référence de la figure 1 est obtenu en soumettant un échantillon de 24 microlitres du matériel cytoplasmique de départ dilué par 10 μ l de tampon barbital, à une électrophorèse en deux dimensions, avec la 2^e direction de l'électrophorèse passant à travers un gel d'agarose contenant un sérum anti-BCG total obtenu chez Dako (Danemark) et le colorant ensuite au bleu de Comassie.

La figure 2 montre le résultat d'une chromatographie d'exclusion obtenue en passant un échantillon cytoplasmique de M. bovis BCG consistant en 16,5 mg de protéines dans 1 ml sur une colonne de Sepharose 6B (marque commerciale de billes sphériques d'agarose en gel, avec des limites d'exclusion d'environ 4.10 daltons pour les protéines et 1.10 daltons pour les polyssacharides, fabriqués par Pharmacia AB).

L'échantillon de départ est indiqué par A et a un dessin protéinique d'immunoélectrophorèse similaire à celui de la figure 1. Le pic d'exclusion est indiqué par B et consiste essentiellement en antigène A60 comme montré par sa localisation immunoélectrophorétique et le pic d'inclusion est en C, qui inclut tout le restant de la matière protéinique, c'est-à-dire tout les autres antigènes présents dans l'échantillon.

Si désiré, le pic B, au cas où une contamination est encore observée après analyse immunoélectrophorétique, peut être rechromatographié sur la même colonne, qui fournira alors un antigène A60 sous une forme immunochimiquement pure.

L'antigène A60 purifié par bichromatographie sur une colonne de Sépharose 6B a été analysé. Il est composé de 57 % de protéines et 43 % de polyssacharides. Son unité de référence a été établie de la façon suivante : 1 unité d'antigène 60 est la quantité d'antigène électrophorétiquement purifié et coloré au bleu de Comassie dont l'absorbance en solution à 530 nm est : 1 cm

$$A = 0.1 \\ 530$$

Cette unité spectrophotométrique correspond à 1,5 μ g de composant protéinique et 1,23 μ g de composant polyssacha-

ridique. Il correspond donc à 2,45 ug d'antigène A60 cytoplasmique.

L'antigène A60 de *M. bovis* est le composant du cytoplasme bactérien migrant le plus lentement dans un champ électrophorétique dans les conditions expérimentales suivantes (1 % agarose dans tampon tris -barbital 0,02 M. à pH 8,6, 8 volts par cm durant 1 heure à 15°C dans la première dimension et 3 volts par cm durant 18 heures à 15°C dans la 2e dimension, détection des constituants protéiniques par le bleu de Comassie). La majorité du travail a été effectuée avec la souche atténuée de Calmette-Guerin de *M. bovis*.

Après avoir déterminé les conditions optimales pour l'isolation de l'antigène A60, des matériels similaires reconnaissables par leur dessin immunoélectrophorétique correspondant à l'antigène A60 de *M. bovis* souche BCG, ont été isolés par la même technique simple de chromatographie d'exclusion à partir d'un photochromogène (groupe 1, *M. kansasii*) un scotochromogène (groupe 2, *M. scrofulaceum*) un nonchromogène (groupe 3 *M. xenopi*) et un "croissance rapide" (groupe 4, *M. chelonae*).

A ces représentants des différents groupes mycobactériens qui induisent un certain type de tuberculose (*M. xenopi* et *M. scrofulaceum* sont normalement apathogènes) a été ajouté *M. leprae*, multiplié dans l'armadillo et acheté sous forme de lépromine.

Environ 15 mg de protéines libérées du cytoplasme de chacune de ces bactéries dans 1 ml de tampon (CaCl₂ 0,04 M; Mg-acétate 0,015 M; Tris-HCl 0,02 M; pH 7,4) ont été traités pendant 10' à 37°C avec 10 unités de RNase, puis immédiatement chromatographiés 2 fois sur une colonne de Sépharose 6 B et les antigènes A60 des 6 mycobactéries ont été ainsi immunochimiquement purifiés. Des échantillons appliqués sur la colonne étaient 1 ml, le lit de Sepharose était 10 ml et le volume mort était 3,5 ml.

Les antigènes A60 extraits de ces 6 mycobactéries ont été caractérisés par leur comportement immunoélectrophorétique comme précisé supra. Toutes les espèces mycobactériennes contiennent cet antigène en grandes quantités. L'antigène A60 de *M. leprae* a été reconnu être le principal constituant de la lépromine, également dénommée A7 dans les systèmes de référence antérieurs.

La production d'anticorps polyclonaux murins contre les antigènes A60 obtenus a été effectuée selon des procédés connus. Ces procédés comprennent le recouvrement du liquide intrapéritonéal de la cavité intrapéritonéale d'animaux inoculés avec l'antigène. 5 Brièvement, des souris Balb c ont été sensibilisées par du Pristane (0,5 ml I.P.). Quinze jours plus tard, 1 ml d'une suspension à 10 % d'une solution aqueuse de l'antigène (10 mg/ml) dans de l'adjuvant incomplet de Freund ont été inoculés intrapéritonéalement. Après 10 quinze jours, 2 réinoculations intrapéritonéales par semaine ont eu lieu. Les souris ont produit ainsi un ascite, qui a sécrété de larges quantités d'anticorps. Les souris ont été ponctionnées et vidées tous les trois jours et elles sont mortes de déshydratation après le 5e ou 6e drainage.

Des anticorps monoclonaux ont été obtenus dans 15 des souris Balb-c selon des procédures connues. Cinquante et un clones ont été isolés sécrétant un anticorps spécifique contre l'A60 dérivé de M. bovis, souche BCG et trois à six clones de chacun des cinq autres antigènes isolés.

Les anticorps polyclonaux sont une population hétéro- 20 gène d'anticorps dirigés contre tous les épitopes accessibles d'un antigène. Un anticorps monoclonal est une population homogène d'anticorps dirigés contre un seul épitope d'antigène.

Cet épitope peut ou ne peut pas être commun à d'autres antigènes homologues. Dans le cas présent, un anticorps 25 monoclonal peut être spécifique pour une souche, une sous-espèce, une espèce mycobactérienne ou encore un genre bactérien.

La mise à disposition d'anticorps polyclonaux et d'anticorps monoclonaux ainsi qu'une large réserve d'antigènes 60 (sauf M. leprae) de grande pureté, isolés comme déjà décrit ont permis 30 le développement de divers tests diagnostiques. Leur utilité va être démontrée dans deux exemples.

Exemple 1

120 ug d'antigène A60 dans 120 ul de tampon salin à pH 7,2 (P.B.S.) sont incubés avec 3 ul de I 125 (300 uci) et 10 ul 35 de chloramine T (6,5 ug/ml dans un tampon salin phosphate pH 7,2)

durant 3' à 20°C. La réaction est stoppée par addition de 10 ul de sodium métabisulphite (8,45 mg/ml dans tampon salin phosphate pH 7,2). Le volume final a été amené à 200 ul par du P.B.S. et chromatographié sur 2 ml de Sepharose 6 B. Le pic d'exclusion contenant de l'antigène A60 marqué à l'iode 125 a été stocké dans 0,2 % albumine et 0,02 % NaN₃.

Un test radioimmunologique a été ensuite développé pour la détermination de concentrations minimales d'anticorps. De la protéine A de *Staphylococcus aureus* a été achetée chez Pharmacia (Upsala, Suède). Cette protéine a la propriété de se combiner spécifiquement à des IgG humaines ou murines même si de l'antigène leur est attaché.

La protéine A fut absorbée sur les parois de tubes en polystyrène. L'antigène A 60 à l'iode 125 (environ 3000 C.P.M/ul) a été ajouté à des concentrations inconnues d'anticorps et le complexe en résultant a été ensuite contacté avec le facteur protéine A.

Après un temps d'incubation adéquat pour l'attachement des anticorps à la protéine A, la quantité de radioactivité attachée aux parois des tubes a été mesurée.

Ce test radioimmunologique classique appliqué aux différents anticorps polyclonaux et aux 6 antigènes A60 isolés et marqués, a établi que tous les anticorps polyclonaux obtenus par injection de ces antigènes utilisés comme vaccin, ont interréagi largement (7 % à 100 %) avec tous les antigènes A60 introduits dans ce test RIA.

Il a été trouvé à partir d'autres tests que les antigènes radioactifs sont entrés en compétition de façon variable avec le PPD qui est une préparation purifiée de tuberculine (c. à d. un extrait de BCG) et de façon surprenante également avec la lépromine (un extrait de *M. leprae*) ainsi qu'avec des corynébactéries-dérivées-de-lèpre (L.D.C.) pour complexer avec les 6 anticorps polyclonaux testés.

Ceci démontre que les antigènes A60 extraits de diverses espèces mycobactériennes, inclus ceux qui ne provoquent pas la tuberculose, contiennent pour le moins un épitope commun à toutes les espèces constituant le supergroupe C.M.N. et à l'encontre

duquel des anticorps ont été créés.

Une exploration de la spécificité des différents anticorps monoclonaux obtenus a également été effectuée par la même technique RIA. La majorité d'entr'eux ont été trouvés se superposant. Cependant, un clone sécrétant un anticorps absolument spécifique pour l'antigène 60 de *M. kansasii* ainsi qu'un pour l'antigène 60 de *M. scrofulaceum* ont pu être isolés de même que 4 clones (à partir de 51) pour l'antigène A60 pour *M. bovis*.

Par ailleurs, le clone 31 a été trouvé sécrétant des anticorps qui réagissaient avec tous les A60 utilisés. Il avait un très large spectre d'activité immunologique. Aucun clone sécrétant des anticorps pour les autres espèces mycobactériennes n'a pu être obtenu, sans aucun doute en raison du peu de clones initialement isolés.

Exemple II

L'antigène A60 de *M. bovis* a été adsorbé sur les puits d'une plaque de polystyrène (96 puits par plaque) à pH 9,6 dans un tampon 0,01 M carbonate. Après adsorption, les puits ont été remplis avec une solution 0,1 % en albumine dans un tampon salin-phosphate (PBS) à 4°C durant 18 heures, puis les puits furent lavés avec 0,05 % de Tween 20 dans du PBS et les puits furent finalement vidés et séchés et gardés à 4°C. Il a été observé que l'antigène A60 absorbe aux parois des puits et que, gardés secs, ceux-ci pouvaient être stockés à 4°C sans perdre durant au moins 4 mois leurs propriétés immunologiques.

Des anticorps de chèvre anti-IgG humains furent purifiés par chromatographie d'affinité et marqués à la peroxydase selon des procédés connus. Ce réactif a la double fonction d'adsorber sur les IgG humains par sa moitié anticorps et de permettre une réaction colorée enzymatique par sa moitié peroxydase.

Un essai immunoenzymatique a été ainsi préparé où les anticorps humains anti-A60 contenus dans l'échantillon à tester, par exemple le sérum de malade, sont spécifiquement adsorbés sur les parois sensibilisées du micropuits en se complexant avec l'antigène 60 qui y est déjà fixé. Après lavage avec du PBS-Tween, la présence

d'anticorps humains spécifiques fixés sur l'antigène 60 dans les puits est révélée par les anticorps anti-IgG humains marqués à la peroxydase.

Ces anticorps vont se fixer sur n'importe quel IgG humain présent et, après lavage, la présence de ces anticorps est analysée par une réaction colorée basée sur l'activité enzymologique de la moitié peroxydase.

En un test parallèle, le même antigène A60 (500 ug/ml) a été adsorbé à une suspension à 20 % de latex (0,8 µ de diamètre) dans un tampon 0,1 M glycine à pH 8,8. Après lavage des particules de latex, une vérification de l'agglutination en présence d'une dilution d'antisérum A60 dans du PBS a été effectuée en ajoutant 50 µl d'une solution d'anticorps polyclonal sur une lame. Après 5' de rotation lente, la limite de dilution de l'anticorps a été établie à 1/1.200. La compétition entre le latex sensibilisé et de l'antigène 60 libre avec cette dilution d'anticorps a montré que 2,6 ug/ml d'antigène A60 libre était nécessaire pour inhiber l'agglutination du latex induite par l'anticorps dilué.

Ces deux tests qualitatifs ont été appliqués à l'analyse de la présence d'anticorps anti-A60 dans les sérums de patients connus pour être tuberculo-positifs selon le test cutané classique. Pour éviter les réactions non-spécifiques des sérums avec les latex sensibilisés à l'A60, ces sérums ont été dilués 6 fois par du PBS avant leur analyse.

Une corrélation de 98 % a été trouvée entre le test ELISA et le test cutané. Des sérums négatifs en test cutané ont été trouvés négatifs en ELISA avec cependant 3 % de faux positifs. Le test latex rapide est normalement moins sensible. Il ne détermina que 94 % de positifs. Cependant, tous les tests cutanés sont sortis négatifs dans ce test sur lame.

Ces résultats montrent que les anticorps contre les antigènes A60 dérivés de mycobactéries sont présents en larges quantités dans le sérum de malades qui ont été trouvés positifs dans un test cutané à la tuberculine et que les tests diagnostiques - latex et EIA - basés sur la reconnaissance de ces anticorps dans le sérum par un antigène A60 de cette invention sont des outils diagnostiques précieux.

Réaction immunologique humorale contre l'antigène A60

La mise à disposition d'un système de détection fiable pour les anticorps anti-A60 a rendu possible l'étude de la production au cours du temps d'anticorps contre l'antigène 60 après inoculation.

Des souris ont été utilisées pour cette étude.

Les anticorps de souris contre l'antigène 60 sont détectés dans un enzymoessai où les parois des puits d'une plaque de microtitration sont couvertes avec l'antigène A60 isolé de M. bovis, souche BCG, par la méthode décrite. Après incubation du sérum de souris à une dilution 1/100, les puits contenant les anticorps spécifiques adsorbés sur l'antigène 60 sont incubés avec des antiglobulines de souris marquées à la peroxydase (Dako, Danemark).

Après incubation, les puits sont lavés et la présence de peroxydase est mise en évidence par un développement coloré d'un substrat de réaction enzymatique pour la peroxydase, consistant en ortho-phénylène-diamine et H2O2 dans un tampon citrate-phosphate à pH 5,3.

Il a été trouvé que l'inoculation sous-cutanée d'une suspension aqueuse d'antigène A60 à une dose de 30 ug de protéines par souris a donné une réponse humorale détectable après 60 jours d'incubation. Lorsque l'antigène est administré sous la forme d'une émulsion d'eau dans l'huile (adjuvant incomplet de Freund, FIA), la dose immunisante a pu être réduite à 1,5 ug de protéines A60 par animal.

Ainsi, l'antigène A60 n'est pas seulement utile pour la détection d'anticorps produits par une infection naturelle ainsi qu'il est décrit dans la demande N 678.470 mais est capable de déclencher expérimentalement une puissante réponse humorale lorsqu'administré soit sous forme aqueuse soit sous forme d'émulsion d'eau dans l'huile (FIA).

Réaction immune cellulaire due à l'antigène 60

La possibilité pour l'antigène 60 isolé de la souche BCG d'induire une hypersensibilité retardée fut exploitée par la mesure du gonflement de la patte de souris sensibilisées.

Des souris NMRI femelles âgées de 6 semaines furent sensibilisées par une inoculation sous-cutanée de 75 μ l d'une émulsion d'eau dans l'huile (FIA) contenant 1,5 μ g/animal de soit l'antigène A60 à une dose 1,5 μ g/animal ou de tuberculine Lot 80C12, utilisé non-dilué comme reçu du fabricant.

Les réactions indicatrices de sensibilité retardée furent obtenues par les injections comme antigène de challenge, de soit 30 μ g d'antigène A60 solubilisé dans un tampon salin-phosphate (PBS) ou de tuberculine pure Lot 80C12 utilisée non-dilué, dans les coussins de pattes arrières d'animaux sensibilisés. Après 24 heures, l'épaisseur du coussin plantaire a été mesurée. Le tableau 1 résume le résultat obtenu. Huit souris ont été utilisées par groupe expérimental.

Tableau 1 Réaction d'hypersensibilité retardée

Inoculation	Challenge	Epaisseur moyenne du coussin plantaire en mm
A 60	A 60	1,62
Tub 80 C 12	Tub 80 C 12	1,40
Tampon	A 60	0,11
A 60	Tampon	0,04
F.I.A. seul	A 60	0,01
Tub 80 C 12	A 60	1,34
A 60	Tub 80 C 12	1,49

A l'évidence, l'antigène 60 provoque une réaction d'hypersensibilité similaire à celle observée lorsque la tuberculine est employée. La découverte que l'antigène 60 est un puissant immunogène provoquant des réponses immunologiques humorales et cellulaires, ont induit la recherche de la valeur de cet antigène comme remplaçant des "tuberculines" conventionnelles dans les tests cutanés pour la tuberculose et son emploi comme standard de contrôle de qualité pour comparer diverses préparations commerciales de tuberculine.

Antigène A60 utilisé comme tuberculine

L'adaptation de l'antigène A60 isolé du BCG comme antigène de challenge similaire aux "tuberculines" conventionnelles de divers types a été d'abord vérifiée au moyen d'un test d'évaluation tuberculinique classique.

Des cobayes (400 gr à 600 gr) ont été sensibilisés avec 0,1 ug de M. bovis inactivé, administré par voie intramusculaire. Quatre semaines plus tard, diverses doses d'antigène A60 ont été inoculées par voie intradermale dans les flancs rasés des animaux. Une réaction d'hypersensibilité était indiquée par une surface gonflée ou induration qui était mesurée en diamètre, après 24 heures.

Les résultats de cette expérience sont donnés dans le graphique 3. La dose minimale à laquelle une hypersensibilité est détectée a été trouvée être 15 ng d'antigène A60. Cette expérience démontre qu'un challenge d'animaux sensibilisés par M. bovis peut être effectué par A60 au lieu de tuberculine.

Analyse ELISA de la non-homogénéité de tuberculines commerciales

La qualité en terme de degré d'homogénéité de 5 préparations commerciales ou lots de tuberculine a été analysée dans un essai immunoenzymatique.

Les tuberculines ont été diluées 1/10 et 1/100 dans un tampon carbonate (0,01 M pH 9,6) et adsorbées en présence de glutaraldéhyde (concentration 0,03 M) sur les parois de puits de micro-titration pour servir d'antigène de capture pour le développement d'un test enzymoimmunologique. Des anticorps de souris contre l'antigène 60 furent utilisés à diverses dilutions et la présence de ces anticorps sous forme complexée sur la plaque fut révélée par un anticorps IgG de souris marqué à la peroxydase (Dako, Danemark) et un développement coloré subséquent avec de l'ortho-phénylène-diamine et du H2O2 dans un tampon citrique-phosphate à pH 5,3. Les résultats sont donnés dans le tableau 2.

- 13 -

Tableau 2

Densité optique à 492 nm d'un dosage enzymo-immunologique effectué avec 5 préparations commerciales de tuberculine utilisées comme antigène de capture.

5		Dilutions d'antisérum souris anti-A60		
	<u>Tuberculine</u>	<u>1:1,000</u>	<u>1:5,000</u>	<u>1:10,000</u>
10	Lot 86 A 20			
	Pure	1.05	0.30	0.19
	1:10	1.03	0.31	0.20
	1:100	0.65	0.23	0.15
15	Lot 84 H 30			
	Pure	0.41	0.18	0.13
	1:10	1.31	0.47	0.28
	1:100	1.28	0.47	0.28
20	Lot 83 I 26			
	Pure	0.35	0.19	0.14
	1:10	1.05	0.51	0.36
	1:100	1.39	0.42	0.29
25	Lot 85 K 28			
	Pure	0.98	0.40	0.27
	1:10	1.04	0.46	0.39
	1:100	1.03	0.51	0.42
30	Lot 80 C 12			
	Pure	0.84	0.23	0.17
	1:10	1.01	0.29	0.19
	1:100	0.86	0.28	0.19

35

Un examen des résultats obtenus conduit aux conclusions suivantes :

1. Les tuberculines utilisées pures comme matériel sensibilisant inhibent la réaction enzymo-immunologique dans 3 cas puisque les valeurs en D.O. obtenues sont sensiblement inférieures à celles obtenues lorsque les tuberculines sont utilisées à une dilution 1/10 ou même 1/100.

L'effet inhibiteur est le mieux observé lorsque les anticorps de souris anti-A60 sont employés concentrés (dilution 1/1000) mais l'effet est encore observable à des dilutions supérieures. Il est vraisemblable que le matériel immunologique actif employé dans la sensibilisation de la phase solide est masqué par des contaminants en compétition dans 3 lots sur les 5 testés.

2. Le degré de contamination varie pour différents lots tuberculiniques puisque l'effet inhibiteur n'existe pas pour le lot 86A20, est faible pour le lot 80C12, est plus accentué pour le lot 85K28, est très prononcé pour le lot 84H30 et est maximal pour le lot 83I26. La concentration, par rapport aux anticorps contre l'antigène A60 de ces différents lots de tuberculine, est inégale. Ceci est observé lorsqu'une concentration faible de matériel sensibilisant ou antigène de capture est utilisée (par ex. aux dilutions 1/100 de l'antigène) ainsi que lorsque des dilutions fortes d'anticorps sont utilisées (c. à d. aux dilutions d'anticorps de souris anti-A60 de 1/5000 et 1/10.000). Le lot 85K28 est le plus concentré et le lot 86A20 est le plus faible.

Dosage de l'antigène A60

La même évaluation expérimentale a été appliquée à l'antigène A60 isolé du BCG. Dans ce cas, l'accès à du matériel pur a permis la quantification de la quantité d'antigène sensibilisant utilisé. Des solutions variant de 10 ug à 5 ng de protéines A60/ml ont été utilisées. Le tableau 3 rapporte les résultats obtenus :

Tableau 3

Concentration d'antigène A 60	Dilution d'antisérum de souris anti-A 60		
	<u>1:1,000</u>	<u>1:5,000</u>	<u>1:10,00</u>
10 ug	2	1.49	0.85
5 ug	2	1.48	0.86
0.5 ug	2	1.38	0.81
0.05 ug	1.47	0.68	0.32
0.005 ug	0.42	0.29	0.18

1. Contrairement à la plupart des lots de tuberculine analysés, des doses élevées d'antigène A60 sensibilisant ne montrent pas d'effet d'inhibiteur ou de compétition sur le test enzymo-immunologique.
2. Des doses saturantes d'antigène sensibilisant A60 semblent être atteintes lorsque 0,5 ug ou plus sont utilisés puisque la sensibilité du système n'est pas améliorée avec des concentrations supérieures, lorsque des dilutions élevées (1/5000 et 1/10000) d'anticorps de souris anti-A60 sont appliquées.
3. L'intensité des réponses observées est bien plus grande que celles observées pour les tuberculines analysées.

La détermination de la puissance d'une préparation tuberculinique observée par rapport à l'antigène 60 est donc possible.

Une approche consiste en un essai de compétition où un antigène A60 marqué par un enzyme ou un ion radio-actif est mis en compétition avec l'antigène contenu dans la préparation tuberculinique, pour une quantité limitée d'anticorps anti-antigène 60 attaché à une phase solide, telle les parois d'une plaque de microtitration. L'anticorps peut être un anticorps monoclonal.

Cependant, l'information et les réactifs disponibles ont incités au développement d'un test non-compétitif indirect basé sur un anticorps anti-souris marqué par un enzyme (sleon USP 4,298,687).

Des dilutions nécessaires d'antigène A60 s'étendant de 0 à 500 ng ont été effectuées et incubées (0,1 ml) durant 3 heures à 37°C en présence de 0,1 ml d'antisérum de souris anti-A60 dilué à 1/5000 (dilution finale).

5 Les solutions (0,2 ml) ont été ensuite incubées durant 18 heures (durant la nuit) à température ambiante dans les puits d'une plaque de microtitration sensibilisée par 500 ng d'antigène 60. Les puits ont été lavés, un excès d'anticorps anti-souris marqué à la peroxydase (Dako, Danemark) a été ajouté et l'incubation continuée
10 durant 3 heures à température ambiante. Après lavage, la présence de peroxydase a été révélée par un développement coloré avec de l'orthophénylène-diamine et H2O2 dans un tampon citrique-phosphate.

Dans ce système de détection, un développement maximal coloré est atteint lorsque l'antigène A60 est absent du fluide
15 réactionnel et un développement coloré minimal est obtenu lorsque l'antigène A60 est en concentration suffisante pour attacher la totalité des anticorps anti-antigène 60 avec une intensité colorée variant entre ces limites pour des quantités d'antigène 60 intermédiaires entre ces extrêmes.

20 Donc une courbe de référence basée sur des niveaux de développements colorés variables peut être construite pour des concentrations en antigène 60 contenu dans des échantillons inconnus et un anticorps monoclonal peut également être utilisé dans ce but.

Les 5 lots de tuberculine commerciale ont été ana-
25 lysés à une dilution 1/100 selon ce schéma. Leur contenu en matériel similaire à l'A60 a reflété avec une bonne exactitude les résultats obtenus dans le tableau 2. Le lot le plus riche était le lot 85K28 (7 ug d'équivalent antigène similaire à A60 par ml) et le lot le moins concentré en matériel similaire à l'A60 était le lot 86A20 (0,6 ug
30 de matériel équivalent à l'antigène 60 par ml).

Interspécificité de l'antigène A60

L'existence d'un système de détection sensible pour la sérologie des infections mycobactériennes a permis l'exploration de son application à diverses infections mycobactériennes.

De façon inattendue, il a été trouvé que l'antigène 60 est un puissant antigène interspécifique qui réagit avec les sérums de malades souffrant d'une variété d'infections mycobactériennes de telle sorte que le sérum d'un sujet identifié définitivement comme
5 atteint de tuberculose sera également déterminé positif si un antigène A60 isolé d'une espèce mycobactérienne autre que *M. bovis* est utilisé comme antigène de capture.

Par exemple, les antigènes A60 isolés par le procédé décrit, à partir de *M. paratuberculosis*, *M. avium* ou *M. smegmatis*
10 peuvent être utilisés à la place de l'antigène A60 isolé de *M. bovis* pour la sérologie de la tuberculose chez des sujets soit humains soit animaux.

Les sérums de 5 patients atteints d'une infection due à *M. Avium* ont été obtenus du Cleveland Metropolitan General
15 Hospital (U.S.A.). Tous les 5 ont donné des résultats positifs dans un test sérodiagnostique avec l'antigène A60 de *M. bovis*, mais également avec l'antigène A60 de *M. avium* et *M. paratuberculosis*. Des sérums originaires de malades infectés par *M. xenopi* étaient immunologiquement réactifs avec l'antigène A60 isolé de *M. bovis*, tout comme
20 l'étaient des sérums de malades infectés par *M. kansasii* analysés avec un antigène A60 isolé de *M. bovis*.

Des sérums de bovins provenant d'animaux infectés par *M. bovis* et d'autres par *M. paratuberculosis* étaient immunologiquement réactifs de la même façon dans des tests où l'antigène
25 de capture était l'antigène 60 de *M. bovis* souche BCG, ou de *M. paratuberculosis* ou de *M. avium*.

Ces résultats montrent que l'antigène A 60 est un composant antigénique majeur des mycobactéries en général, étant présent dans toutes les espèces analysées. De là, un test sérologique
30 basé sur l'utilisation de l'antigène 60 extrait de, par ex. *M. bovis*, est capable de détecter des infections causées par une variété d'espèces mycobactériennes. Il est clair que l'antigène 60, administré en tant que vaccin, suscite chez le sujet des anticorps qui réagissent immunologiquement avec diverses espèces mycobactériennes, inclus la lèpre.

En conséquence, l'antigène A60 de cette invention
35 est prévu être effectif pour conférer un degré d'immunité utile non

seulement contre la tuberculose mais contre une variété d'autres infections causées par les mycobactéries, inclus la lèpre. Une telle immunité persistera une période de temps utile mais n'est pas supposée être permanente de nature, de telle sorte qu'une réinoculation sera indiquée, à des intervalles de temps raisonnables. Comme établi par les résultats expérimentaux exposés ci-dessus, de faibles quantités ont été trouvées efficaces pour susciter de fortes réactions immunologiques de nature tant cellulaire qu'humorale chez des animaux d'expérience tels les souris et les cobayes. La quantité d'antigène requise pour administration dépendra bien entendu de l'espèce et une recherche pourra être nécessaire de façon à établir les niveaux adéquats pour d'autres espèces, inclus l'espèce humaine.

L'homme de l'art sait que les doses appropriées pour d'autres espèces peuvent être raisonnablement déduites par extrapolation des quantités identifiées comme valables pour des animaux d'expérience, tout comme par analogie avec les préparations vaccinales connues et disponibles commercialement dérivées de mycobactéries, en particulier *M. bovis*.

Des doses appropriées pour les préparations disponibles ont été établies et les procédures d'essai comparatives décrites ci-dessus offrent un moyen simple de déterminer la puissance relative de l'antigène 60 de cette invention, comparée à elles. La route d'inoculation de l'antigène de cette invention dans un but d'immunisation correspond à celles employées pour l'administration des vaccins tuberculeux connus, en particulier par injection sous-cutanée ou intradermale.

Il faut remarquer, en ce qui concerne l'utilité de l'antigène 60 comme antigène de challenge pour obtenir une manifestation visible d'une hypersensibilité établie chez le sujet sous expérience, que la Pharmacopée exige que de telles préparations produisent une réaction d'hypersensibilité retardée, c'est-à-dire un gonflement ou une induration, à une dose test qui, multipliée par cent, ne procure aucune sensibilité acquise contre l'antigène test. Ceci signifie qu'un antigène n'est acceptable que s'il montre un facteur de sauvegarde excédant de cent fois sa dose révélatrice, c'est-à-dire cette quantité qui indique une réponse cellulaire traduisant une sensi-

bilité établie chez le sujet testé et la quantité qui sera suffisante pour provoquer une réponse humorale se traduisant par la production d'un niveau d'anticorps circulants qui normalement correspondent à une immunisation.

5 Des expériences ont montré que l'antigène 60 satisfait totalement à cette exigence, en particulier parce que sa dose révélatrice minimale est très petite, comme démontré ci-dessus.

De ce qui a été dit, il doit être bien entendu que la manifestation ou indication d'hypersensibilité donnée par l'anti-
10 gène 60 ici décrit n'est pas confinée à la tuberculose mais s'étend également aux autres infections provoquées par les mycobactéries, inclue la lèpre. Ce manque de spécificité peut sous certaines circonstances être perçu comme un avantage, p. ex. lorsque utilisée pour des tests de dépistage dans des contrées peu développées où une dis-
15 crimination générale contre toute infection mycobactérienne dans la population testée peut constituer une information médicale importante par elle-même.

Si un degré de spécificité poussée est demandé, pour l'identification d'une infection mycobactérienne spécifique, ceci
20 peut généralement être obtenu par une définition appropriée du point de discrimination entre conclusion positive ou négative, comme il est déjà pratiqué couramment avec des tuberculines commerciales c.à.d. que le degré de la manifestation de la sensibilité varie avec différentes infections du groupe en question de telle sorte que, dans
25 la pratique, la tuberculose peut être distinguée des autres infections mycobactériennes, spécialement celles attribuées à *M. avium*, par une surface de gonflement ou une induration nettement plus étendue et prononcée là où le test est pratiqué de telle sorte qu'un diagnostic positif pour la tuberculose peut facilement être basé sur un diamètre
30 plus grand de la surface réactionnelle, dû à la réaction de sensibilité.

En général, la présence d'une réaction d'hypersensibilité ou de gonflement se produit endéans un temps court et habituellement 24 à 48 heures entre le moment de l'administration de la dose test d'antigène et l'examen de la zone test pour les réactions
35 usuelles d'inflammation.

Il sera apprécié que l'antigène 60 de cette invention est caractérisé par d'importants avantages, comparé aux antigènes connus dérivés des mycobactéries et spécialement ceux associés à la tuberculose. Les analyses comparatives dont les résultats ont été exposés supra montrent que les préparations commerciales de tuberculine varient étonnamment dans leur activité immunologique, ce qui indique un degré d'inhomogénéité qui n'est pas attendu pour des préparations commerciales.

Au contraire, le matériel antigénique de cette invention a été trouvé montrer une activité immunologique uniforme, un nombre de lots différents de cet antigène ayant maintenant été préparé et trouvé possédant les mêmes caractéristiques. De plus, une unité de référence standard pour l'antigène 60 peut être quantifiée par un procédé spectrophotométrique objectivement reproductible qui ne dépend pas de considérations subjectives comme vrai pour les tests de standardisation des tuberculines commerciales, qui dépendent de l'appréciation personnelle de l'étendue d'une réaction de sensibilité cutanée.

Alors que des fractions de poids moléculaire bien défini, dérivées de bacilles tuberculeux, ont été proposées et sont de façon présumée de composition uniforme, ces fractions sont habituellement obtenues en petites quantités par des techniques de purification élaborées.

Au contraire, l'antigène 60 est obtenu pur en larges quantités à partir du matériel d'origine par un procédé relativement simple. De plus, le système électrophorétique de référence développé par Closs pour la classification des divers antigènes contenus dans des produits dérivés de bacilles tuberculeux ou organismes similaires procurent une façon aisée d'analyser la pureté et l'homogénéité des produits de cette invention. Ces produits ont la propriété désirable d'être thermostables, n'étant pas affectés par un échauffement atteignant 100°C durant 30'.

Les tuberculines commerciales, au contraire, contiennent des contaminants, parmi lesquels des enzymes hydrolytiques qui peuvent rendre ces préparations pyrogéniques.

REVENDICATIONS

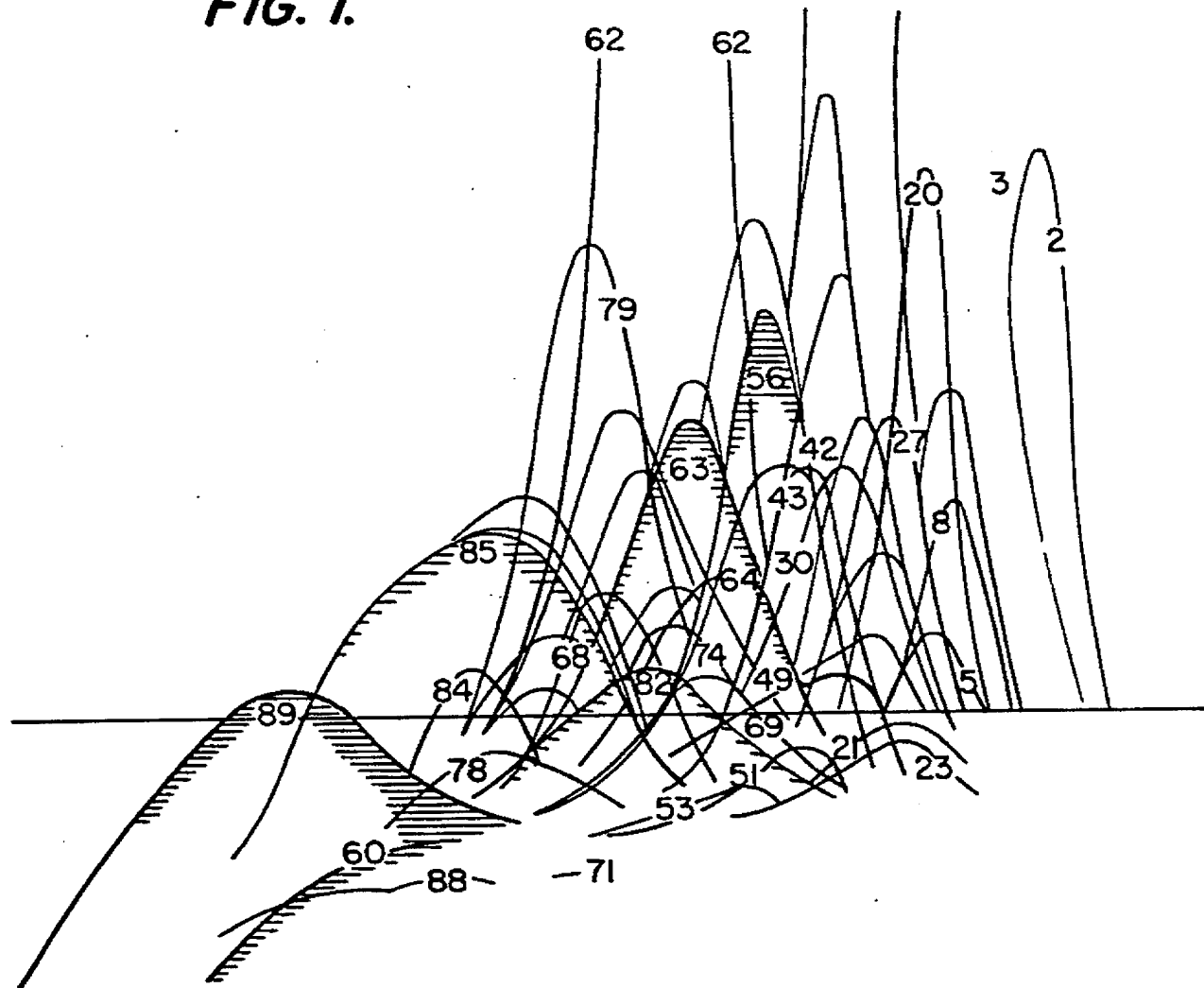
1. Un antigène interspécifique de mycobactéries, consistant essentiellement en un mélange sous forme substantiellement immunochimiquement pure d'une protéine ayant un poids moléculaire d'au moins 4×10^6 daltons et polysaccharides ayant un poids moléculaire d'au moins 1×10^6 daltons et ayant été soumis à l'immunoélectrophorèse croisée, présentent un pattern de précipitation correspondant à l'antigène A60 de mycobacterium bovis souche BCG.
2. Une méthode d'immunisation contre les infections mycobactériennes qui comprend l'administration à un sujet d'une quantité immunisante de l'antigène revendiqué en 1.
3. La méthode de la revendication 2 où l'antigène mentionné est administré par injection.
4. Une méthode de détection d'exposition préalable d'un sujet à des infections mycobactériennes qui comprend l'étape d'inoculation au dit sujet, par voie sous-cutanée ou intradermale, avec une dose effective de l'antigène de la revendication 1 et, après écoulement d'un laps de temps suffisant pour le développement par le dit sujet d'une réaction d'hypersensibilité, examiner et observer l'endroit de la dite injection pour la présence d'une induration significative, comme indication positive de l'exposition préalable susdite.

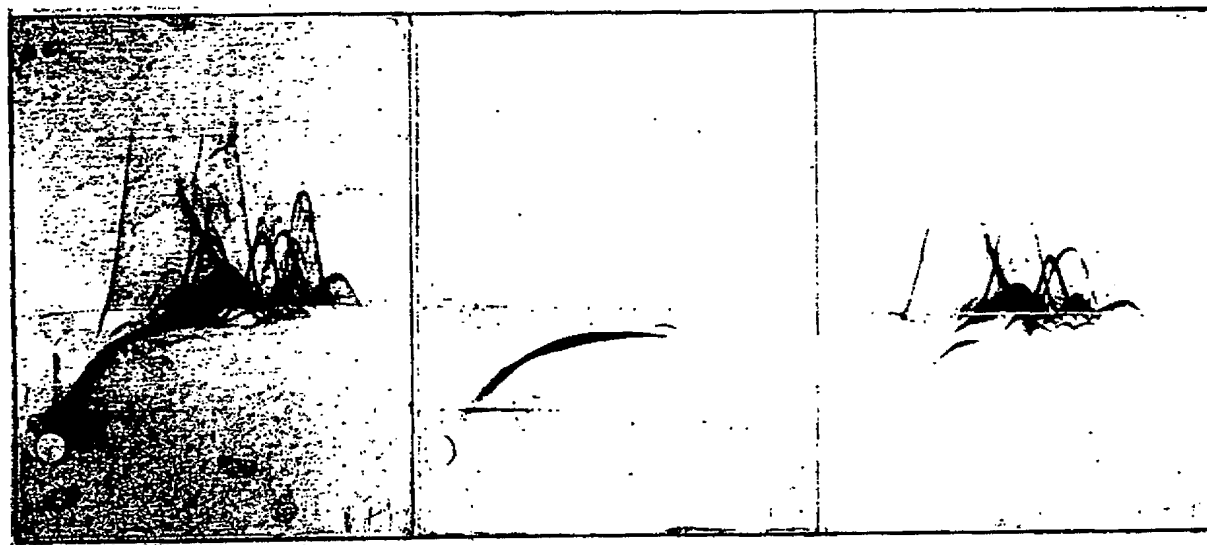
25

30

35

FIG. 1.





A

B

C

FIG.2

DIAMETRE DE LA REACTION CUTANEE (mm)

Tableau 3 - Dimension de l'induration
Injection intradermale de différentes doses d'antigène 60 à des cobayes
sensibilisés par M. bovis

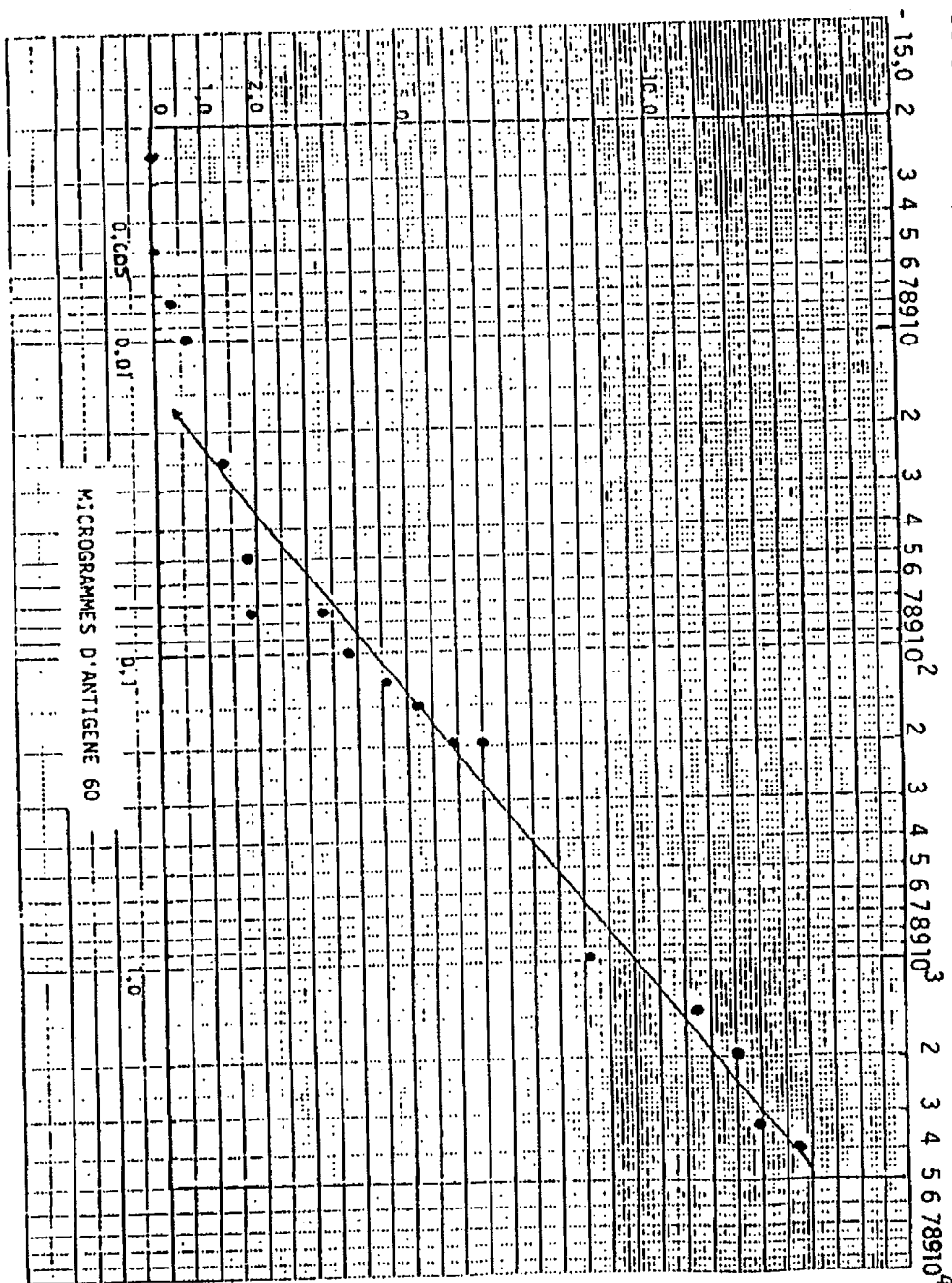


FIG.3

OFFICE DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

089 0456

DESIGNATION DE L'INVENTEUR (si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Référence du demandeur ou du mandataire
(15 caractères au maximum)

BR 1594

N° de la demande ou, si ce dernier n'est pas encore connu, titre de l'invention

"Antigène A60 de mycobactéries et son utilisation
comme tuberculine et comme vaccin"

En ce qui concerne la demande de brevet susmentionnée le(s) soussigné(s) *1 :

ANDA BIOLOGICALS,
société anonyme
37, rue de la Course;
67000 STRASBOURG
France

désigne(nt) en tant qu'inventeur(s) *2 :

MAES Roland F.
"Bildhauerhof"
34, Rosheim
67190 MUTZIG
France

☐ (les autres inventeurs sont mentionnés sur une feuille supplémentaire)

la(les) personne(s) désignée(s)

☒ désire(nt)

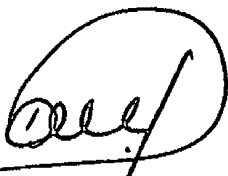
☐ ne désire(nt) pas

être mentionnée(s) dans le brevet

Lieu Bruxelles,

Date le 25 avril 1989

Signature(s) du (des) demandeur(s) ou du (des) mandataire(s)


Jean VIGNERON

Prière de dactylographier le(s) nom(s) du (des) signataire(s) au-dessous de la signature

*(1) Les personnes physiques doivent être désignées par leurs noms et prénoms. Les personnes morales et les sociétés assimilées aux personnes morales en vertu de la législation qui les régit doivent figurer sous leur désignation officielle.
*(2) Nom(s), prénom(s) et adresse(s) complète(s) de l'(des)inventeur(s).