

Brevet N° **83732**
 du 4 novembre 1981
 Titre délivré : **18 FÉV 1982**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

Le Docteur Pál SUTKA, 60/c. Mészáros u. BUDAPEST 1016 Hongrie, et (1)
 le Docteur Klára SUTKA, 60/c. Mészáros u. BUDAPEST 1016 Hongrie,
 représentés par Monsieur A. Zewen, ing.-conseil en propriété industrielle, (2)
 agissant en qualité de mandataire

dépose(nt) ce quatre novembre 1980 quatre-vingt-un (3)
 à 15⁰⁰ heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
 PROCÉDE DE PRODUCTION DE PREPARATIONS IMMUNOBIOLOGIQUES APPLICABLES POUR (4)
 LE DIAGNOSTIC, LA PREVENTION ET/OU LE TRAITEMENT D'INFECTIONS PAR LE
 CANDIDA GUILLIERMONDII ET PREPARATIONS IMMUNOBIOLOGIQUES EN RESULTANT"

2. la délégation de pouvoir, datée de Budapest le 23 octobre 1981

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;

4. / planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,

le 4 novembre 1981

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :

1) Docteur Pál SUTKA, 60/c. Mészáros u. BUDAPEST 1016 Hongrie (5)

2) Docteur Klára SUTKA, 60/c. Mészáros u. BUDAPEST 1016 Hongrie

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de

(6) / déposée(s) en (7) /

le / (8)

au nom de / (9)

élit(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

4, place Winston Churchill, Luxembourg (10)

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
 annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à / mois. (11)

Le mandataire

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
 Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

4 novembre 1981

à 15⁰⁰ heures



Pr. le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes,
 p. d.

C 018/CAS 151

LU 1760

M E M O I R E D E S C R I P T I F

déposé à l'appui d'une demande de

B R E V E T D ' I N V E N T I O N

aux noms de

Docteur Pál SUTKA et

Docteur Klára SUTKA

pour:

"PROCEDE DE PRODUCTION DE PREPARATIONS

IMMUNOBIOLOGIQUES APPLICABLES POUR LE

DIAGNOSTIC, LA PREVENTION ET/OU LE TRAI-

TEMENT D'INFECTIONS PAR LE CANDIDA

GUILLIERMONDII ET PREPARATIONS IMMUNOBIOLO-

GIQUES EN RESULTANT".



La présente invention est relative à un procédé de production de nouvelles préparations immunobiologiques applicables dans le diagnostic, la prévention et/ou le traitement d'infections dues au *Candida Guilliermondii* chez les mammifères. Les nouvelles préparations produites conformément à la présente invention peuvent être utilisées avec profit en thérapeutiques humaine et vétérinaire; pour le diagnostic d'infections par le *Candida Guilliermondii*, l'immunisation de sujets exposés à de telles infections, ainsi que pour le traitement de la maladie.

Une candidiase enzootique provoquée par *Candida Guilliermondii* a été décelée d'abord chez des ruminants en 1959 (B.HAUPTMAN et Coll. : Med.Vet.17, 22 [1961]). Des études ultérieures ont montré que chez le bétail, le *Candida Guilliermondii* s'attaque principalement aux voies urogénitales et est la cause de plusieurs troubles, tels que l'avortement des vaches, les troubles inflammatoires des organes urogénitaux (utérus, glandes séminales, épидидyme, mamelles, reins, etc...) et de divers autres troubles du système de reproduction. L'apparition d'infections par le *Candida Guilliermondii*, les aspects cliniques, pathologiques et histopathologiques de l'infection, les résultats des études microbiologiques effectuées sur ces champignons et la classification taxonomique des souches fongiques isolées à partir des organismes des bestiaux infectés, sont décrits en détail dans les références suivantes : P.SUTKA et Coll. : Magyar Allatorvosok Lapja 33, 151 ; 155 ; 837 [1978]; M.DECUN et Coll. : Revta Zootech.Vet. Med.23, 39 [1973].

D'après les données fournies par la littérature disponible, les infections par le *Candida Guilliermondii* apparaissent surtout chez les ruminants ; cependant, le champignon est également pathogène pour l'homme. Des champignons de type *Candida Guilliermondii* ont également été détectés dans l'organisme humain dans les images cliniques les plus diverses, telles que des infections des voies urogénitales

(S.A. HARDING et Coll. : Clin.Mic.2, 222 [1975]), des infections oculaires (SEGAL et Coll. : Mycopath.Mycol.Appl.54, 32 [1974]), l'endocardite (J.R.UTLEY et Coll. : Circulation 48, 42 [1973]), ainsi que des candidiases générales (P.J.KOZINN et Coll. : Sab. 7, 98 [1969]).

En thérapeutique humaine, des candidiases systémiques, principalement celles qui sont provoquées par *Candida albicans*, sont principalement diagnostiquées par des méthodes applicables pour la détection en laboratoire d'antigènes humoraux, telles qu'agglutination, agglutination sur latex, fluorescence indirecte, immunodiffusion, contre-immuno-électrophorèse (C.L.TASCHDJIAN et Coll. : Amer.J.Clin.Pathol. 57,195 [1972]). Ces méthodes de diagnostic nécessitent un personnel bien entraîné, ayant une habileté supérieure à la moyenne. Jusqu'à maintenant, on ne connaissait aucun antigène spécifique de *Candida Guilliermondii*, qui aurait permis un diagnostic de l'infection au moment même, au cours d'un test vétérinaire de dépistage de routine, ou même au chevet du malade. La présente invention est relative à la préparation d'antigènes utilisables dans ce but.

En tenant compte du fait que les ruminants, principalement le bétail qui a une importance majeure dans l'industrie alimentaire, souffrent de troubles sérieux des organes reproducteurs, des voies urogénitales et de la lactation par suite d'infection par le *Candida Guilliermondii*, ce qui implique de grandes pertes économiques et de sérieux problèmes pour la santé publique, on constate un net besoin de disposer de préparations vétérinaires permettant le diagnostic, la prophylaxie et le traitement de ces infections. En ce qui concerne la nature pathogène du champignon vis-à-vis de l'homme, diverses formes de présentations appropriées de ces préparations peuvent aussi être appliquées en thérapeutique humaine. La présente invention est relative à un procédé de production de telles préparations.

La majorité des antigènes de *Candida* est produite à partir de cellules obtenues après une culture de 48 à 72 heures de la souche *Candida*. Jusqu'à maintenant, on prêtait

peu attention aux modifications apparaissant dans les substances produites par les cellules de *Candida* au cours d'une culture prolongée. L'organisme infecté renferme cependant également des produits issus de cellules de *Candida* plus âgées. Les
5 Demandeurs ont constaté que de nouvelles substances se forment dans des cellules de *Candida* à la suite d'une culture prolongée, qui peuvent être utilisées comme agents de diagnostic instantanés, pour provoquer une réaction précoce d'hypersensibilité et dans la technique de diagnostic par précipitation dans
10 un tube et, de plus, pour le traitement immunobiologique de l'organisme infecté. En utilisant ces substances, il est possible de diagnostiquer rapidement les infections dues au *Candida Guilliermondii*, même au chevet du malade ou à la ferme, par une réaction d'hypersensibilité précoce ou par précipi-
15 tation en tube du sérum.

Des préparations immunobiologiques utiles pour le diagnostic, la prophylaxie et/ou le traitement d'infections dues au *Candida Guilliermondii*, sont préparées de la façon suivante, conformément à la présente invention :

20 a) On cultive une souche de *Candida Guilliermondii* dans des conditions aérobies à 24-42°C, sur un milieu de culture contenant des sources assimilables de carbone et d'azote ; on maintient la ou les populations résultantes dans des conditions identiques pendant une période prolongée, puis on sépare les
25 cellules fongiques du milieu de culture, on les lave, on les disloque mécaniquement, on les extrait et on traite l'extrait par un solvant organique polaire, puis on convertit le précipité obtenu en une préparation immunobiologique soit telle quelle, soit après l'avoir soumise à une purification supplé-
30 mentaire, ou

b) On cultive une souche de *Candida Guilliermondii* pendant 48 à 72 heures dans des conditions aérobies à 24-42°C, sur un milieu de culture contenant des sources de carbone et d'azote assimilables ; on laisse éventuellement la culture
35 résultante se propager encore de façon à produire deux ou trois nouvelles populations, puis l'on sépare les cellules

fongiques du milieu de culture, on les lave, on les brise mécaniquement, on les extrait et on ajoute, si on le désire, un solvant organique polaire à l'extrait, puis l'on convertit le précipité résultant en une préparation immunobiologique, 5 éventuellement après une purification supplémentaire, ou bien

c) On cultive une souche de *Candida Guilliermondii* pendant 48 à 72 heures dans des conditions aérobies à 24-42°C, sur un milieu de culture contenant des sources assimilables de carbone 10 et d'azote, puis on tue la culture, on sépare les cellules tuées et on les met sous forme de préparation immunobiologique, telles quelles ou après une purification.

La culture des souches de *Candida Guilliermondii* est réalisée de préférence entre 32 et 38°C.

15 Pour laver les cellules séparées, on utilise de préférence une solution physiologique saline.

Les cellules séparées peuvent être brisées à l'aide d'appareillages couramment utilisés dans ce but, par exemple un appareil de type presse en X, ou bien la rupture 20 des cellules peut être réalisée par irradiation ultrasonique. La masse résultante est extraite de préférence par une solution physiologique saline.

L'extrait obtenu selon la variante a) ou b) du procédé est traité de préférence par un alcool en C₁ à C₄, 25 en particulier par l'éthanol.

Le précipité obtenu selon la variante a) ou b) du procédé peut être purifié, si on le désire, par des méthodes bien connues dans le domaine de la purification des protéines, telles que la chromatographie, l'ultra-filtration, 30 la dialyse, l'électrophorèse, des méthodes impliquant des adjuvants de filtration et/ou des détergents, etc...

Les préparations immunobiologiques produites conformément aux méthodes a), b) et c) de la présente invention sont dénommées ci-après préparations Cg1, Cg2 et Cg3 35 respectivement.

La préparation Cg1 est un extrait de cellules

contenant des protéines, isolé à partir de cellules de *Candida Guilliermondii* soumises à une culture prolongée. Les constituants les plus importants de cet extrait cellulaire sont les toxines de *Candida Guilliermondii*. La préparation Cg1
 5 peut servir principalement au diagnostic d'infections dues au *Candida Guilliermondii*, en provoquant une réaction d'hypersensibilité précoce à la suite d'une introduction intradermique ; elle peut aussi servir à détecter les anticorps circulants par la méthode de précipitation en tube capillaire
 10 ou en tube Durham. De plus, lorsqu'elle est introduite dans l'organisme vivant, la préparation Cg1 induit la production d'anticorps capables de mettre fin à une infection déjà établie, due au *Candida Guilliermondii*.

La préparation Cg2, séparée à partir de cellules
 15 de *Candida Guilliermondii* soumises à une culture de courte durée, renferme beaucoup plus de protéines que la préparation Cg1, tandis que sa teneur en toxines est faible. Cette préparation peut être appliquée principalement pour l'immunisation d'organismes vivants exposés au risque d'infection. La pré-
 20 paration Cg2 peut aussi servir d'agent de diagnostic pour provoquer une réaction d'hypersensibilité tardive à la suite d'une introduction intradermique ; de plus, elle peut être appliquée à titre d'antigène, pour le diagnostic de l'infection dans les méthodes d'agglutination sur latex, d'immunodiffusion
 25 et de contre-immunoélectrophorèse.

La préparation Cg3 consiste en cellules entières tuées de *Candida Guilliermondii* et peut être appliquée principalement pour le diagnostic de l'étape précoce des infections dues au *Candida Guilliermondii* dans des tests de laboratoire
 30 (tels que les tests d'agglutination, de fluorescence indirecte, etc...) et, de plus, pour produire des antigène colorés applicables dans les tests ABR (d'avortement épizootique) : (F. HUTYRA et Coll. : "Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere", VEB Gustav FISCHER Editeur, Iéna, 1959).

35 Des souches de *Candida Guilliermondii* séparées d'organismes infectés peuvent être appliquées avec grand profit

comme microorganismes pour la production des trois types précités de préparations immunobiologiques. Cependant, des souches standards internationales connues de *Candida Guilliermondii*, telles qu'une souche déposée au Centraalbureau voor

5 Schimmelcultures (Delft, Hollande) sous le n°CBS-566, de même que les souches de *Candida Guilliermondii* déposées dans la collection américaine (American Type Culture Collection), peuvent aussi être utilisées dans le procédé conforme à la présente invention.

10 Il est préférable de mettre en oeuvre une préculture, obtenue par culture d'une souche de *Candida Guilliermondii* pendant 48 à 72 heures, dans des conditions aérobies à 24-42°C, sur un milieu de culture contenant des sources assimilables de carbone et d'azote, comme substance de départ,
 15 pour produire les préparations immunobiologiques. Les substances suivantes peuvent constituer des sources de carbone à la fois dans les étapes de préculture et de culture ultérieure : glucose, saccharose, maltose, cellobiose, melibiose, mélécytose, inuline, arbutine, galactose, sorbose, tréhalose,
 20 ribose, xylose, L-arabinose, D-arabinose, glycérol, ribitol, D-mannitol, D-dulcitol, L-méthyl-D-glycoside, salicine, acide tartrique ou citrique et leurs dérivés. Le milieu de culture utilisé dans les étapes de préculture et de culture ultérieure peuvent renfermer, comme source d'azote assimilable, par exem-
 25 ple, des sérums, des compositions de protéose-peptone (certifiées par Difco, Difco Laboratories, Détroit, Michigan, Etats-Unis d'Amérique), et d'autres protéoses, des substances contenant de la peptone et/ou des amino-acides, etc...

Les préparations Cg1 et Cg2 sont de préférence
 30 produites de la façon suivante : à la fin de la période de culture, on vérifie le bouillon pour déterminer la présence de bactéries et l'on sépare ensuite les cellules fongiques du bouillon de fermentation dépourvu de bactéries, de préférence par centrifugation. Les cellules séparées sont lavées
 35 à l'eau ou avec une solution saline aqueuse, de préférence une solution physiologique saline, puis soumises à une rupture mécanique.

On peut procéder, par exemple, de la façon suivante : on sèche le précipité de cellules, on le broie dans un broyeur stérile; on prélève périodiquement un échantillon de substance broyée et on suit le degré de rupture par examen au microscope. Les 5 cellules brisées sont ensuite extraites par une solution physiologique saline. Selon une autre méthode, les cellules de *Candida Guilliermondii* séparées sont mélangées avec de l'eau ou une solution saline aqueuse, de préférence une solution physiologique saline et la suspension résultante 10 est soumise à une irradiation ultrasonique. On prélève un échantillon de la suspension à intervalles réguliers et on suit le degré de rupture, par examen au microscope. Dans ce cas, la rupture mécanique a lieu en même temps que l'extraction des cellules brisées. Ensuite, les solides (c'est-à- 15 dire la substance cellulaire brisée) sont séparés par centrifugation, le liquide surnageant est filtré et un solvant organique polaire, de préférence de l'éthanol, est ajouté au filtrat. Si on le désire, le précipité résultant peut être purifié selon l'une quelconque des méthodes connues 20 utilisées pour purifier les protéines (par exemple, chromatographie, ultra-filtration, dialyse, électrophorèse, etc...). Si la préparation immunobiologique doit être utilisée pour le diagnostic, il n'est pas absolument nécessaire de purifier le précipité. Ainsi qu'il est indiqué plus haut, l'extrait 25 de cellules brisées obtenu selon la méthode b) peut également être utilisé directement pour des diagnostics. Ainsi, le terme de "préparation immunobiologique", lorsqu'il est utilisé à propos de la préparation Cg2, englobe également de tels extraits. Autrement, le précipité résultant est transformé 30 en préparations immunobiologiques selon des méthodes bien connues dans l'Art, à l'aide de diluants classiques (par exemple, une solution physiologique saline, etc...) et selon des techniques classiques (par exemple, dissolution, congélation, lyophilisation, etc...).

35 La préparation Cg3 est produite conformément à la présente invention, de préférence de la façon suivante :

à la fin de l'étape de fermentation, les cellules de *Candida Guilliermondii* sont tuées par un agent cytotoxique, tel que le formaldéhyde. On peut procéder, par exemple, de la façon suivante : on ajoute une solution aqueuse de formaldéhyde à la culture en une quantité suffisante pour ajuster la teneur en formaldéhyde du bouillon à 0,5 %, puis le bouillon est incubé pendant 6 heures à 37°C. Les cellules tuées peuvent être purifiées par lavage, de préférence par une solution physiologique saline. Les cellules tuées sont ensuite converties en préparations immunobiologiques utilisables pour des diagnostics en laboratoire selon des méthodes connues en elles-mêmes (par exemple mise en suspension dans un milieu aqueux, congélation, etc...).

Des préparations Cg1, Cg2 et Cg3 présentées par exemple, sous forme de poudres réparties en ampoules, peuvent être utilisées dans le diagnostic d'infections dues au *Candida Guilliermondii* chez des organismes vivants, de la façon suivante :

Des préparations Cg1 et Cg2 peuvent être utilisées à la fois dans des conditions in vivo et in vitro, tandis que la préparation Cg3 ne peut servir que dans des examens in vitro.

Lorsque l'on cherche à déterminer une infection par *Candida Guilliermondii* dans des conditions in vivo chez des organismes vivants, on administre la préparation Cg1 ou Cg2 au sujet soumis au test sous forme d'injection intradermique. Lorsque la préparation Cg1 est utilisée, la présence ou l'absence d'infection est déterminée en fonction de la réaction d'hypersensibilité précoce provoquée par la préparation, évaluée 1 à 12 heures après l'injection. Il apparaît sur le site de l'injection, chez les sujets infectés, une intumescence bien séparée dont la taille augmente, et qui n'est plus observable 24 heures après le test. Lorsque la préparation Cg2 est utilisée, la présence ou l'absence d'une infection par le *Candida Guilliermondii* est déterminée en fonction d'une réaction d'hypersensibilité tardive de type

tuberculine, qui peut être évaluée 36 à 48 heures après le test.

Les préparations Cg1, Cg2 et Cg3 peuvent être utilisées pour des tests de diagnostic réalisés dans des conditions in vitro, de la façon suivante :

La base de la détection est toujours une réaction immunologique formant un précipité, dans laquelle du sérum négatif, du sérum riche en précipitine et du sérum riche en agglutinine constituent les réactifs. La préparation de sérums riches en agglutinine ou en précipitine est également incluse dans le cadre de l'invention.

Le "sérum négatif" est le sérum obtenu à partir de bestiaux ou d'animaux de laboratoire qui ont une réaction négative lorsqu'ils sont testés avec une préparation Cg1, Cg2 ou Cg3.

Pour préparer un sérum riche en agglutinine, on immunise des lapins avec une préparation Cg2 ou Cg3 selon une procédure standard, puis on saigne les animaux et on sépare le sérum du sang d'une manière connue en elle-même.

Pour préparer un sérum riche en précipitine, on immunise des lapins avec une préparation Cg1 selon un processus standard, puis on saigne les animaux et on sépare le sérum du sang selon une méthode connue en elle-même. Du sérum riche en précipitine peut également être obtenu à partir du sang de bestiaux infectés dans des conditions naturelles. Le sérum de ces animaux est examiné avec de l'allergène Cg1, par exemple, selon la méthode du tube capillaire ou du tube Durham, puis les animaux présentant un sérum riche en précipitine sont saignés et le sérum est séparé du sang selon une méthode connue en elle-même.

Les examens de laboratoire suivants peuvent être réalisés avec des préparations Cg1, Cg2 et Cg3, en utilisant les réactifs indiqués ci-dessous :

1) Test de précipitation en tube capillaire ou en tube Durham, réalisé avec la préparation Cg1 :

A l'aide d'une pipette, on introduit du sérum négatif

dans un tube Durham de telle sorte qu'il n'y ait pas de souffle d'air sur la surface du sérum. Le tube est rempli à moitié de son volume environ. Du sérum riche en précipitine est introduit de la même manière dans un autre tube Durham et le sérum à tester est versé dans deux tubes Durham. La préparation Cg1 est utilisée dans ce test sous forme de solution formée avec une solution physiologique saline. La solution de la préparation immunobiologique est déposée en une couche avec précaution, sur trois des échantillons de sérum (sérum négatif, sérum riche en précipitine et l'un des échantillons de sérum à examiner), tandis que l'échantillon de sérum restant à tester est traité par une solution physiologique saline. Les tubes sont maintenus à la température ambiante pendant une heure, puis à +5°C pendant 24 heures. Les limites des deux phases sont examinées à l'oeil nu après 10 à 15 minutes, 1 heure et 25 heures de repos et les observations sont notées. Si le sérum testé renferme des anticorps pour l'antigène de *Candida Guilliermondii* (préparation Cg1), il apparaît un anneau de précipitation à la limite des deux phases.

2) La préparation Cg2 peut être utilisée comme antigène dans des tests d'immunodiffusion, d'agglutination sur latex et de contre-immunoélectrophorèse. Ces tests sont effectués selon des méthodes bien connues dans l'Art (voir par exemple : PALMER et Coll. : "Serodiagnosis of mycotic diseases", Charles C. Thomas, Illinois, U.S.A., 1977).

3) La préparation Cg3 peut être utilisée comme antigène dans des méthodes d'agglutination et de fluorescence indirecte (cf. par exemple : D.F. PALMER et Coll. : "Serodiagnosis of mycotic diseases", Charles C. Thomas, Illinois, U.S.A., 1977), ainsi que pour la préparation d'antigènes colorés utilisables dans des tests ABR (cf. par exemple F. HUTYRA et Coll. : *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*, VEB Gustav Fischer Editeur, Iéna, 1959).

La préparation Cg2 peut également être utilisée pour l'immunisation préventive d'êtres humains et d'animaux exposés à un risque d'infection par le *Candida Guilliermondii*.

Dans ce cas, la préparation Cg2 est présentée sous forme de vaccin. Ces vaccins peuvent contenir, outre l'agent actif et le diluant, également un support (tel qu'un gel d'hydroxyde d'aluminium) qui assure une libération progressive lente de l'agent actif. Le vaccin peut être introduit dans l'organisme à traiter sous forme d'injection intradermique, intramusculaire, ou sous-cutanée. Conformément à une méthode préférée d'immunisation, les sujets sont vaccinés une autre fois, deux semaines après la première fois, de telle sorte qu'une quantité plus importante d'antigène est administrée à l'organisme avec cette seconde vaccination qu'avec la première. La dose requise pour l'immunisation dépend de nombreux facteurs, tels que l'âge et les conditions générales de santé du malade, l'âge et la race de l'animal, des traitements précédents d'immunisation, du degré du risque, etc...

La préparation Cg1 peut aussi être utilisée dans le traitement d'êtres humains et d'animaux souffrant d'infection par le *Candida Guilliermondii*. Dans de tels cas, le sujet à traiter est d'abord désensibilisé avec la préparation et la préparation Cg1 est administrée alors sous forme d'injection intradermique, intramusculaire ou sous-cutanée. Des préparations utilisées dans ce but peuvent aussi renfermer un support tel qu'un gel d'hydroxyde d'aluminium, qui assure une libération progressive lente de l'agent actif. Le traitement est répété toutes les deux semaines de telle sorte que la quantité d'antigène administrée à l'organisme soit augmentée de façon continue d'un traitement à l'autre. La dose nécessaire au traitement dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge du patient, l'importance et la gravité de la maladie, la race de l'animal, la méthode et la fréquence des traitements, etc...

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comorise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des

exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples de mise en oeuvre sont donnés uniquement à titre
5 d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1

Production de la préparation immunobiologique Cgl

250 ml d'un milieu de culture liquide standard
10 à base de dextrose/peptone/levure (voir D.F.PALMER et Coll.: "Serodiagnosis of mycotic diseases", p.49 [Charles C.Thomas, Illinois, U.S.A.1977]), sont introduits dans un flacon de 500 ml. Le milieu de culture est inoculé avec une culture permanente de *Candida Guilliermondii*, puis incubé pendant
15 48 heures à 37°C, tandis qu'il est secoué à raison de 130 tpm. La culture résultante sert d'inoculum dans l'étape suivante.

10 litres du milieu de culture ci-dessus sont versés dans un fermenteur de laboratoire de 20 litres et le milieu est inoculé avec la culture ci-dessus. La culture est
20 effectuée à 37°C, tandis que le système est aéré et agité. Après 72 heures de culture, la propagation du champignon diminue peu à peu et s'arrête enfin. On poursuit la culture pendant 15 jours supplémentaires dans les mêmes conditions (culture prolongée). Ensuite, on prélève un échantillon de la
25 culture pour réaliser une coloration de Gram. Si l'échantillon se teinte, indiquant la présence de contaminations bactériennes, la culture ne peut pas être utilisée pour la production de préparation immunobiologique. La culture, dépourvue de contaminations bactériennes, est traitée de la façon suivante :
30 le contenu du fermenteur est introduit dans une centrifugeuse et les cellules sont séparées du liquide par centrifugation pendant 10 minutes, à 1000 tpm. La substance cellulaire résultante est lavée à trois reprises avec une solution physiologique saline, centrifugée à nouveau pendant 10 minutes
35 à 1000 tpm, puis mise en suspension dans une solution physiologique saline, les cellules en suspension sont brisées dans un appareil du type à presse X, sous une pression

d'environ 10 000 kg/cm² . Les solides sont séparés par centrifugation (30 minutes, 3000 tpm), le liquide surnageant est filtré à travers un élément-filtre Seitz et 4 parties par volume d'éthanol sont ajoutées au filtrat. Le précipité
 5 séparé est filtré, dissous dans une solution physiologique saline et la solution est lyophilisée à -20°C. En fonction des conditions de fermentation et de rupture, on recueille environ 500 mg d'une substance pulvérulente. Ce produit est introduit dans des ampoules et utilisé comme allergène dans des tests
 10 intradermiques reposant sur des réactions d'hypersensibilité précoce.

EXEMPLE 2

Production de la préparation immunobiologique Cg2.

250 ml d'un milieu de culture liquide standard
 15 comprenant du dextrose/peptone/levure, sont introduits dans un flacon de 500 ml. Le milieu de culture est inoculé avec une culture permanente de *Candida Guilliermondii*, puis incubé pendant 48 heures à 37°C, tandis qu'il est secoué à raison de 130 tpm. La culture résultante sert d'inoculum dans l'étape
 20 suivante.

10 litres du milieu de culture ci-dessus sont introduits dans un fermenteur de laboratoire de 20 litres et le milieu est inoculé avec la culture préparée ci-dessus. La culture est effectuée à 37°C pendant 72 heures sous aéra-
 25 tion et agitation. Ensuite, on ajoute une solution aqueuse de formaldéhyde à 30-40% dans la culture, en une quantité convenable pour obtenir une concentration finale de formaldéhyde de 0,5 % et l'incubation est poursuivie à 37°C pendant 6 heures. Un échantillon est prélevé de la culture et la viabi-
 30 lité du champignon est vérifiée par inoculation de celui-ci sur une boîte Sabouraud de dextrose-agar et incubation de celle-ci à 37°C pendant 48 heures. Un autre échantillon est prélevé de la culture pour la coloration Gram. Si l'échantillon se teinte, indiquant la présence de contaminations bac-
 35 tériennes, la culture ne peut pas être utilisée pour la production de préparations immunobiologiques. La culture,

dépourvue de contaminations bactériennes est traitée de la façon suivante : le contenu du fermenteur est versé dans une centrifugeuse et les solides sont séparés du bouillon par centrifugation pendant 10 minutes, à 1000 tpm. Les solides
 5 sont séparés, lavés trois fois avec une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,85 % et les cellules sont à nouveau centrifugées pendant 10 minutes à 1000 tpm. Les solides sont alors mis en suspension dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,85 % et les cellules sont brisées dans un
 10 appareillage du type presse en X sous une pression d'environ 10 000 kg/cm². L'homogénéisat de cellules résultant est centrifugé pendant 30 minutes, à 3000 tpm ; le liquide surnageant est séparé, filtré à travers un filtre Seitz et 4 parties en volume d'éthanol sont ajoutées au filtrat. Le précipité
 15 séparé est filtré, dissous dans une solution physiologique saline et la solution est lyophilisée à -20°C. En fonction des conditions de fermentation et de rupture des cellules, on recueille environ 1500 mg de substance pulvérulente. Ce produit est réparti dans des ampoules et utilisé comme allergène
 20 dans des tests intradermiques reposant sur des réactions d'hypersensibilité tardive, ainsi que comme antigène dans des tests d'agglutination sur latex, d'immunodiffusion et de contre-immunoélectrophorèse.

EXEMPLE 3

25 Production de la préparation immunobiologique Cg3

Une gélose nutritive inclinée de dextrose-agar Sabouraud est inoculée avec une culture permanente de *Candida Guilliermondii*, puis incubée pendant 48 heures à 37°C. Le champignon qui s'est développé sur la culture
 30 inclinée, est mis en suspension dans un bouillon de dextrose/peptone/levure et la suspension résultante sert d'inoculum dans l'étape suivante.

250 ml d'un milieu de culture liquide à base de dextrose/peptone/levure sont introduits dans une fiole
 35 conique de 500 ml et l'inoculum ci-dessus est ajouté au milieu. Le mélange résultant est incubé à 37°C pendant 48 heures,

tandis qu'il est secoué à raison de 130 tpm. Une solution aqueuse de formaldéhyde à 30-40% est ensuite ajoutée à la culture en une quantité convenable pour obtenir une concentration finale en formaldéhyde de 0,5 %. La fiole est à nouveau
5 montée sur le secoueur et secouée à raison de 130 tpm pendant 6 heures, à 37°C. Un échantillon est prélevé de la culture résultante et la viabilité du champignon est vérifiée en inoculant celui-ci sur des boîtes Sabouraud de dextrose-agar qui sont incubées à 37°C pendant 48 heures. Un autre échan-
10 tillon est prélevé de la culture pour la coloration Gram. Si l'échantillon est teinté, ce qui correspond à la présence de contaminations bactériennes, la culture ne peut pas être utilisée pour la production de préparations immunobiologiques. La culture, dépourvue de contaminations bactériennes, est
15 traitée de la façon suivante : la culture est centrifugée pendant 10 minutes à la vitesse de 1000 tpm ; la phase solide, constituée par des cellules entières, est séparée, lavée à trois reprises avec une solution physiologique saline stérile, puis à nouveau centrifugée à 1000 tpm pendant 10 minutes. On re-
20 cueille une masse de cellules humides, pesant environ 2,5 g.

Une partie en volume de la masse de cellules humides résultante est mise en suspension dans 3 parties en volume d'une solution physiologique saline ; une solution de Merthiolate du commerce (éthylmercuricthiosalicylate de sodium)
25 est ajoutée à la suspension en une quantité convenable pour atteindre une concentration finale de 1:1000 et la suspension de cellules est stockée à + 4°C. Cette préparation immuno-
biologique peut être utilisée dans des diagnostics en laboratoire, pour les tests d'agglutination en tube et de fluo-
30 rescence indirecte et de plus, pour la production d'antigènes colorés utilisables dans les tests ABR.

Les préparations immunobiologiques produites conformément à la présente invention permettent de diagnosti-
quer les infections dues au *Candida Guilliermondii* et rendent
35 possibles un dépistage préventif régulier et une immunisation des bestiaux exposés à ces maladies. Cela implique d'importants

avantages, en particulier dans l'élevage du bétail, puisque les pertes dues aux infections par le *Candida Guilliermondii* peuvent être considérablement réduites. En tenant compte du fait que les hommes risquent d'être infectés par le *Candida*
5 *Guilliermondii*, les dépistages diagnostiques sont très importants pour la santé publique. De plus, certaines des préparations immunobiologiques préparées conformément à la présente invention peuvent être efficacement utilisées dans le traitement d'infections par le *Candida Guilliermondii*, qui
10 ne pouvaient pas être traitées auparavant par des méthodes immunobiologiques.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent
15 d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production de préparations immuno-
biologiques pour le diagnostic, la prophylaxie et /ou le
traitement d'infections par le Candida Guilliermondii, carac-
5 térisé en ce qu'une souche de Candida Guilliermondii est
cultivée dans des conditions aérobies à 24-42°C sur un milieu
de culture contenant des sources de carbone et d'azote assi-
milables, la ou les populations résultantes sont maintenues dans
des conditions identiques pendant une période prolongée, puis
10 les cellules de champignons sont séparées de la culture, lavées,
brisées mécaniquement, extraites, et l'extrait est lavé par
un solvant organique polaire, puis le précipité résultant
est converti en une préparation immunobiologique utilisable
soit telle quelle, soit après une purification supplémentaire.
- 15 2. Procédé de production de préparations immuno-
biologiques pour le diagnostic, la prophylaxie et/ou le trai-
tement d'infections dues au Candida Guilliermondii, caracté-
risé en ce qu'une souche de Candida Guilliermondii est cultivée
pendant 48 à 72 heures dans des conditions aérobies à 24-42°C
20 sur un milieu de culture contenant des sources de carbone et
d'azote assimilables ; la culture résultante est éventuellement
propagée encore pour fournir deux ou trois nouvelles populations,
puis les cellules de champignons sont séparées de la culture,
lavées, brisées mécaniquement, extraites ,et un solvant
25 organique polaire est alors éventuellement ajouté à l'extrait,
puis le précipité résultant est converti en une préparation
immunobiologique utilisable soit telle quelle, soit après une
purification supplémentaire.
3. Procédé de production de préparations immuno-
30 biologiques pour le diagnostic, la prophylaxie et/ou le trai-
tement d'infections par le Candida Guilliermondii, caractérisé
en ce qu'une souche de Candida Guilliermondii est cultivée
pendant 48 à 72 heures dans des conditions aérobies à 24-42°C,
sur un milieu de culture contenant des sources de carbone et
35 d'azote assimilables, puis la culture est tuée et les cellules
tuées sont séparées et converties en une préparation immuno-

biologique utilisable soit telle quelle, soit après purification.

4. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la souche de *Candida* 5 *Guilliermondii* est cultivée entre 32 et 38°C.

5. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'un alcool en C₁ à C₄ est utilisé comme solvant organique polaire.

6. Procédé selon la Revendication 5, caracté- 10 risé en ce que l'éthanol est utilisé comme solvant organique polaire.

7. Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la préparation immunobiologique est présentée sous une forme utilisable en thé- 15 rapeutique humaine ou vétérinaire.

8. Procédé selon les Revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la préparation immunobiologique est présentée sous forme d'allergène, d'antigène soluble ou de vaccin.

9. Procédé selon la Revendication 3, caracté- 20 risé en ce que la préparation immunobiologique est présentée sous forme d'antigène corpusculaire.

10. Procédé de préparation d'un sérum riche en précipitine, utilisable comme réactif dans le diagnostic en 25 laboratoire des infections dues au *Candida* *Guilliermondii*, caractérisé en ce que des lapins sont immunisés par une préparation immunobiologique obtenue par le procédé selon la Revendication 1, puis les lapins sont saignés et le sérum est séparé du sang.

11. Procédé de préparation d'un sérum riche en agglutinine, utilisable comme réactif dans le diagnostic en laboratoire d'infections dues au *Candida* *Guilliermondii*, caractérisé en ce que des lapins sont immunisés avec une 30 préparation immunobiologique préparée par le procédé selon les Revendications 2 ou 3, les animaux sont saignés et le 35 sérum est séparé du sang.

12. Préparations immunobiologiques applicables pour le diagnostic, la prévention et/ou le traitement d'infections par *Candida Guilliermondii*, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues en mettant en oeuvre le procédé selon l'une
5 quelconque des Revendications 1 à 11.



BREVET D'INVENTION

Docteur Pál SUTKA et Docteur Klára SUTKA

Invention : Docteur Pál SUTKA et Docteur Klára SUTKA

PROCEDE DE PRODUCTION DE PREPARATIONS IMMUNOBIOLOGIQUES
APPLICABLES POUR LE DIAGNOSTIC, LA PREVENTION ET/OU LE TRAI-
TEMENT D'INFECTIONS PAR LE CANDIDA GUILLIERMONDII ET PREPARA-
TIONS IMMUNOBIOLOGIQUES EN RESULTANT.

ABREGE DESCRIPTIF

Production de préparations immunobiologiques.

Une souche de Candida Guilliermondii est cultivée sur un milieu convenable, les populations obtenues sont maintenues dans les mêmes conditions pendant une période prolongée, puis les cellules de champignons sont séparées, lavées, brisées et extraites, et le précipité résultant est mis sous forme de préparations immunobiologiques.

Préparations servant aux diagnostic , à la prophylaxie et/ou au traitement d'infections dues au Candida Guilliermondii.

