

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 14842

(54) Procédé d'obtention de polyosides capsulaires, polyosides capsulaires ainsi obtenus et leur application à la préparation de vaccins.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 19/00; A 61 K 39/02.

(22) Date de dépôt 30 juillet 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 5 du 4-2-1983.

(71) Déposant : Société dite : BERRI-BALZAC. — FR.

(72) Invention de : Demètre Yavordios et Mireille Cousin.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

1.

La présente invention concerne un procédé d'obtention de polyosides capsulaires, les polyosides obtenus par ce procédé et l'application de ces polyosides à la préparation de vaccins.

5 On sait que la lutte contre les maladies infectieuses peut être exercée à deux niveaux : soit par une action directe à l'égard du germe pathogène (antibiotiques, antiseptiques), soit par une action indirecte par le renforcement de défenses de l'organisme (vac-
10 cination, sérothérapie, immunomodulation).

L'utilisation des agents susceptibles d'agir directement se heurte souvent à certaines difficultés pouvant limiter son action (notamment toxicité de la molécule et résistance bactérienne).

15 Par contre, le renforcement des défenses de l'organisme par l'acquisition des anticorps spécifiques présente des avantages certains, notamment du point de vue de la durée de la protection et de la spécificité. Mais, la vaccination à l'aide de corps microbiens entiers
20 n'est pas toujours sans inconvénients : phénomènes d'hypersensibilisation, mauvaise tolérance ou pyrogénicité sont parmi les plus fréquents. Ils sont liés à la présence de multiples antigènes de la bactérie.

C'est donc tout naturellement vers l'isolement
25 de l'antigène responsable des anticorps protecteurs que les efforts des chercheurs se sont cristallisés.

Dans le cas des bactéries capsulées, les polyosides capsulaires se révèlent immunogènes chez l'homme, avec peu de réactions secondaires.

30 Une première application chez l'homme de ces polyosides capsulaires est l'apparition du vaccin antiméningococcique A et C et, tout récemment, du vaccin polyvalent

2.

contenant les polyosides purifiés de quatorze types sérologiques de pneumocoque.

Plusieurs autres bactéries capsulées sont impliquées dans divers processus pathologiques, par exemple :

- 5 - Hemophilus influenzae, type b,
- Klebsiella pneumoniae,
- Escherichia coli, ou
- Streptocoques, groupe B,

et des vaccins correspondants peuvent être préparés à
10 partir de leurs polyosides capsulaires.

Dans la demande de brevet européen 0 002 404, on a décrit un procédé d'obtention de polyosides capsulaires à partir de Streptococcus pneumoniae.

Selon ce procédé, on cultive le microorganisme
15 à l'aide de milieux de culture complexes. Puis, après inactivation au phénol, sans séparer les microorganismes du milieu de culture, on effectue une première addition d'alcool tel que l'éthanol, on sépare les impuretés précipitées, on effectue une deuxième addition d'alcool
20 afin de précipiter alors le polyoside. Le polyoside remis en suspension est ensuite débarrassé des substances contaminantes (protéines, acides nucléiques) par un traitement enzymatique ou par un traitement par un surfactif cationique (bromure de citrimonium), qui peuvent être complétés
25 par une diafiltration.

Ce procédé n'a pas, en fait, de caractère général, car les conditions spécifiques de chaque stade varient avec le polyoside à séparer. Ainsi, il est nécessaire de faire des pré-tests afin de déterminer les conditions des diverses précipitations. De plus, en raison de
30 l'utilisation de certains milieux, ce procédé est susceptible d'entraîner une dégradation des chaînes polyosidiques.

La présente invention vise à fournir un procédé
35 plus général, plus simple et moins dégradant permettant d'obtenir des polyosides de masse moléculaire très élevée.

3.

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention de polyosides capsulaires immunogènes à partir de bactéries capsulaires les contenant, caracté-
risé en ce que l'on effectue une culture des bactéries
5 en milieu synthétique ou semi-synthétique, à la fin de la phase de croissance de cette culture on sépare les corps microbiens d'une phase surnageante, on soumet cette phase surnageante à une filtration sur une membrane
10 retenant les molécules d'une masse moléculaire égale ou supérieure à 100.000 daltons, obtenant ainsi un rétentat riche en polyosides capsulaires, et l'on élimine les protéines, les acides nucléiques et les lipides de ce rétentat obte-
nant ainsi un polyoside capsulaire purifié.

Ainsi, selon une caractéristique essentielle de
15 la présente invention, on effectue la culture des bactéries en milieu synthétique ou semi-synthétique. Par milieu synthétique, on désigne des solutions aqueuses de composés chimiques connus, de faible masse moléculaire qui sont présents en proportions déterminées.

20 Par milieu semi-synthétique, on désigne un milieu analogue au précédent, mais qui contient, en outre, une faible proportion (généralement moins de 0,5 % en poids) de produits d'origine naturelle, tels que des hydrolysats de protéine.

25 En outre, selon la présente invention, l'extraction des polyosides est effectuée sur le surnageant de la culture débarrassée des corps microbiens et non pas sur l'ensemble du milieu de culture.

La filtration sur une membrane dont la porosité
30 est capable de retenir les molécules d'une masse moléculaire égale ou supérieure à 100.000 daltons permet d'obtenir rapidement un rétentat renfermant principalement les polyosides, ainsi que, en faibles proportions, des protéines, des acides nucléiques et des lipides.

35 L'élimination des contaminants est avantageusement effectuée de la façon suivante : ou soumet le rétentat à une hydrolyse enzymatique, notamment à l'aide d'un

4.

mélange de Pronase, RNase et DNase, on ajoute un mélange butanol-chloroforme (de préférence un mélange 1:1 en volume), on sépare la phase aqueuse, on soumet la phase aqueuse à une dialyse et on effectue une filtration sur
 5 une membrane retenant les molécules ayant une masse moléculaire égale ou supérieure à 100.000 daltons.

Le polyoside purifié peut être séparé, de manière connue, du rétentat par précipitation à l'aide d'un alcool tel que l'éthanol.

10 Les exemples suivants illustrent la présente demande :

EXEMPLE 1

Polyoside pneumococcique du type 3.

On part d'une souche lyophilisée de Streptococcus
 15 pneumoniae de type 3.

a) Préparation de lots d'ensemencement.

On introduit la souche lyophilisée dans du bouillon T.

On effectue la culture pendant 16 heures à
 20 37°C.

On mélange 5 ml de la culture obtenue avec 15 ml de lait écrémé stérilisé. On distribue dans des ampoules à raison de 0,5 ml/ampoule et on lyophilise. Les lyophilisats sont conservés à +4°C.

25 b) Préculture.

On introduit un lot d'ensemencement (lyophilisat en ampoule) dans un ballon contenant 200 ml du milieu semi-synthétique indiqué ci-après et on effectue la culture à 37°C pendant 6 heures.

30 Milieu de culture :

Peptone pancréatique de caséine (IBF)	1500 mg
l-cystine	150 mg
dl-tryptophane	20 mg
l-tyrosine	200 mg
35 Phosphate bipotassique	4960 mg
d-glucose anhydre	12500 mg
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	500 mg

5.

	Sulfate ferreux, $7H_2O$	5 mg
	Sulfate de zinc, $7H_2O$	0,8 mg
	Sulfate de manganèse, $7H_2O$	0,3 mg
	Acide chlorhydrique RP fumant	17,8 mg
5	d-biotine	15 mg
	Acide nicotinique	1 mg
	Pyridoxine HCl	1 mg
	Riboflavine	1 mg
	Thiamine	1 mg
10	Pentothénate de calcium	5 mg
	Adénine HCl	10 mg
	Uracile	10 mg
	Chlorure de choline	10 mg
	Asparagine	100 mg
15	Eau distillée q.s.p.	1000 ml

c) Culture.

La culture proprement dite est effectuée dans un fermenteur contenant 18 l du milieu de culture défini sous b. On ensemence à raison de 1 % avec la préculture.

20 La culture est effectuée à 37°C, à pH 7,4, sous agitation pendant généralement environ 16 h, jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance.

d) Séparation du surnageant.

A la fin de la phase exponentielle, on sépare 25 immédiatement le surnageant par centrifugation en continu à 5000 t/mn. Le surnageant est soumis à une filtration stérilisante sur membrane Millipore 0,22 μ et utilisé immédiatement ou bien il est conservé à -25°C.

e) Extraction.

30 Un volume de surnageant égal à environ 20 litres est concentré à un volume de 2 litres par filtration sur membrane Millipore 10⁵, permettant de retenir les molécules d'une masse moléculaire égale ou supérieure à 100.000 daltons.

35 Le rétentat ainsi obtenu est diafiltré sur membrane Diaflo 10⁵ après addition de 5 litres d'eau

6.

distillée stérile et apyrogène pour compléter la séparation selon la masse moléculaire.

Plusieurs diafiltrations successives permettent de concentrer à environ 350 ml qui sont lyophilisés dans
5 des ballons de 1 litre.

Toutes ces opérations sont effectuées à une température au plus égale à 8°C.

f) Purification.

Le produit intermédiaire lyophilisé est dissous
10 dans 900 ml de tampon phosphate 0,01 M - pH 7.

On ajoute ensuite 20 mg de RNase type 1, 20 mg de DNase pancréatique et 180 µl (20 unités/ml) de Rnase T1. On effectue une incubation de 4 h à 37°C. On ajoute alors 170 mg de Pronase type 8, 900 µl de phénol pur et
15 2 gouttes de toluène.

On incube le mélange pendant une nuit à 37°C. On arrête la réaction et on ajoute un volume égal (900 ml) d'un mélange butanol-chloroforme 1:1. On agite pendant 1 h. On décante les deux phases par centrifugation
20 à 10.000 t/mn pendant 30 mn.

La phase aqueuse qui contient le polyside est dialysée contre 20 litres d'eau distillée stérile et apyrogène pendant environ 60 h.

On diafiltre le dialysat sur membrane Amicon
25 10⁵. Le volume du rétentat est de 1140 ml. On ajoute 160 ml d'acétate de sodium 40 % (concentration finale 5 %) et 3,9 litres d'éthanol absolu (3 volumes).

On recueille le précipité par centrifugation à 12.000 t/mn pendant 30 mn. On dissout ce précipité dans
30 de l'eau distillée apyrogène. On répartit la solution en flacons sous un volume de 4 ml. On lyophilise sous vide. On obtient 9 g de produit. C'est le polysaccharide purifié qui contient:

7.

- sucres 64 %
- protéines 0,8 %
- acide nucléique < 0,8 %

Toutes les opérations (en dehors des incubations) sont effectuées entre 0 et + 4°C.

EXEMPLE 2

Polyoside pneumococcique du type 23.

On part d'une souche lyophilisée de Streptococcus pneumoniae du type 23.

- 10 On effectue la culture et la séparation du surnageant dans les conditions définies à l'exemple 1 (stades a à d)

L'extraction et la purification du polyoside sont effectuées de la façon suivante :

- 15 e) Extraction

Un volume de surnageant égal à 15 litres est concentré à un volume de 1,5 litre dans les conditions définies à l'exemple 1-e.

- 20 Trois diafiltrations successives permettent de concentrer, puis de lyophiliser. On obtient 1,8 g de produit ayant la composition suivante :

- sucres 60 %
- protéines 19 %
- acide nucléique 3,6 %

- 25 f) Purification

On reprend le produit intermédiaire lyophilisé avec 200 ml de tampon phosphate 0,01 M - pH 7. On ajoute 1 mg de RNase, 1 mg de DNase et 20 unités de RNase T1/ml. On incube pendant 3 h à 37°C. On ajoute de la Pronase type 8 (180 µg/ml), 1 µl/ml de phénol et une goutte de toluène. On incube pendant une nuit à 37°C.

On effectue trois extractions successives avec

8.

un mélange à volume égal (200 ml) de butanol-chloroforme 1:1. Le mélange est agité mécaniquement.

La phase aqueuse finale est dialysée pendant environ 60 heures contre 4 l d'eau distillée stérile et apyrogène.

Le dialysat est diafiltré sur membrane Amicon 10⁵. On concentre à 50 ml. On ajoute 3 volumes d'éthanol absolu et de l'acétate de sodium (concentration finale 5 %). On laisse pendant une nuit à -20°C.

On recueille le précipité par centrifugation. Ce précipité est dissous dans de l'eau distillée stérile et apyrogène puis lyophilisé.

On obtient 1050 g d'un produit qui contient :

	- sucres	75 %
15	- protéines	1,7 %
	- acide nucléique	0,7 %

Toutes les opérations (sauf indication contraire) sont effectuées entre 0° et +6°C.

EXEMPLE 3

Polyoside pneumococcique du type 19.

On part d'une souche lyophilisée de Streptococcus pneumoniae du type 19.

On effectue la culture et la séparation du surnageant dans les conditions définies à l'exemple 1

(stades a à d).

L'extraction et la purification du polyoside sont effectuées de la façon suivante :

e) Extraction

En opérant comme à l'exemple 1-e, on concentre un volume de surnageant de 75 litres par trois diafiltration à 2 litres. On obtient 2,3 g ayant la composition suivante:

	- sucres	30 %
	- protéines	15 %
	- acide nucléique	3,4 %

f) Purification

Le produit intermédiaire lyophilisé est dissous avec 150 ml de tampon phosphate 0,01 M - pH 7. On ajoute 3 mg de Dnase, 3 mg de RNase et 30 µl de RNase T1. On incube pendant 4 h à 37°C. On ajoute ensuite 62 mg

9.

de Pronase, 150 µl de phénol et une goutte de toluène.
On laisse agir pendant une nuit à 37°C.

On déprotéinise par le mélange chloroforme-butanol 1:1, à volume égal (3 extractions successives).

5 La phase aqueuse est dialysée pendant 60 heures contre 4 litres d'eau distillée stérile et apyrogène. On effectue une diafiltration du dialysat sur membrane Amicon XM 100.

10 On précipite le rétentat par 3 volumes d'éthanol contenant de l'acétate de sodium à 5 %.

Après une nuit au congélateur, le précipité est dissous dans l'eau stérile et apyrogène et lyophilisé. On obtient 730 mg de produit qui contient :

15	- sucres	73 %
	- protéines	0,2 %
	- acide nucléique	0,5 %

Là encore, toutes les opérations (en dehors des incubations) sont effectuées entre 0 et +4°C.

EXEMPLE 4

20 Polyoside pneumococcique du type 1.

On part d'une souche lyophilisée de Streptococcus pneumoniae du type 1. On effectue la culture et la séparation du surnageant dans les conditions définies à l'exemple 1.

25 L'extraction et la purification du polyoside sont effectuées de la façon suivante :

e) Extraction

100 litres de surnageant de culture sont diafiltrés sur cassettes Pellicon (Millipore, membrane 10⁵).

30 Le volume du rétentat final est de 3 litres. On lyophilise en ballons. On obtient 6,1 g de produit contenant :

- acide galacturonique	46,5 %
- protéines	7,7 %

f) Purification

35 On dissout le produit obtenu dans 800 ml d'EDS (eau distillée stérile) apyrogène. On ajoute :

- 16 mg de RNase
- 16 mg de DNase

10.

- 160 μ l de RNase T₁.

On incube pendant 4 heures à 37°C. On ajoute alors 300 μ l de phénol, 2 gouttes de toluène et 150 mg de Pronase type 8. On incube pendant une nuit à 37°C. On extrait
5 encore les protéines à l'aide d'un mélange à volume égal de chloroforme-butanol (1:1). On dialyse la phase aqueuse pendant 60 heures. On diafiltre sur membrane Amicon XM 100. Le volume de térentat final est de 150 ml. On précipite la
10 solution par 3 volumes d'éthanol froid contenant de l'acétate de sodium 5 %.

Le culot est repris par 250 ml d'EDS apyrogène. On lyophilise en flacons sous vide. On obtient 3,7 g de polyoside purifié contenant :

- acide galacturonique 55,5 % (ce qui correspond
15 à 85 % de sucres)
- protéines 1 %

Le coefficient de diffusion dans le gel K_D du polyoside est de 0,05. La masse moléculaire est donc d'au moins 2×10^7 .

20 EXEMPLE 5

Polyoside de *K.pneumoniae* du type 2

On part d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* du type 2.

On effectue la culture et la séparation du surnageant dans les conditions définies à l'exemple 1 (stade
25 a à d), mais en utilisant comme milieu de culture le milieu de culture synthétique suivant :

	Citrate trisodique	0,85 g
	Sulfate d'ammonium	0,17 g
30	Sulfate de magnésium	0,17 g
	Acide glutamique	0,17 g
	d-glucose	16,70 g
	Phosphate bipotassique	10 g
	Phosphate monopotassique	6,66 g
35	Eau distillée q.s.p.	1000 ml
	pH final : 6,8.	

L'extraction et la purification du polyoside sont effectuées de la façon suivante :

11.

e) Extraction

On utilise 90 litres de surnageant de culture. On diafiltre sur cassette Pellicon (2 cassettes, membrane 10^5). On effectue 3 lavages par 10 litres d'eau après 5 avoir concentré à 1,5 litre. Le rétentat final est de 2,6 litres. On lyophilise en ballons, on obtient 6,1 g de produit qui contient :

- sucres 50 %
- protéines 15 %

10 f) Purification

Le produit obtenu est dissous dans 350 ml d'eau. On ajoute :

- 7 ml de tampon phosphate 0,5 M, pH 7,0
 - 7 mg de RNase
 - 15 - 7 mg de DNase
 - 70 μ l de Rnase T₁
- (filtration préalable des enzymes sur 0,22 μ).

On incube 4 heures à 37°C. On ajoute ensuite 70 mg de protéase type 8, 350 μ l de phénol et 1 goutte 20 de toluène. On incube pendant la nuit à 37°C. On arrête la réaction et on achève la déprotéinisation par 3 extractions au butanol-chloroforme (1:1). On dialyse la phase aqueuse pendant 60 heures contre de l'EDS apyrogène. On diafiltre sur membrane Amicon XM 100. Le volume de ré- 25 tentat final est de 150 ml. On précipite la solution par 3 volumes d'éthanol absolu froid contenant de l'acétate de sodium 5 %. Le précipité, recueilli par centrifugation est dissous dans 250 ml d'eau, puis lyophilisé en flacons sous vide. On obtient un polyside pur, contenant :

- 30 - sucres 76 % (Hexoses/acide uronique = 3:1)
- protéines 3,8 %

Le K_D du polyside obtenu est 0,1. La masse moléculaire est donc supérieure à 10^7 .

35 EXEMPLE 6

Polyoside de H.influenza du type b

On part d'une souche lyophilisée d'Hemophilus influenzae du type b.

12.

On effectue la culture et la séparation du surnageant dans les conditions définies à l'exemple 1 (stade a à d) mais en utilisant comme milieu de culture le milieu de culture semi-synthétique suivant :

5	Proteose peptone	5 g
	chlorure de sodium	3,5 g
	d-glucose	4 g
	Phosphate monopotassique	1,3 g
	Phosphate bipotassique	3,5 g
10	NAD (nicotine adenosine dinucléotide)	0,001 g
	Extrait globulaire	50 ml
	Eau distillée q.s.p.	1000 ml
	L'extraction et la purification du polyside	

15 sont effectuées de la façon suivante :

e) Extraction

On utilise 30 litres de surnageant de culture.

On effectue une diafiltration sur membrane Millipore 100.000 (2 cassettes). La première concentration conduit à un volume de 1 litre. On lave par 3 fois 10 litres d'EDS. On concentre à 1,3 litre. On lyophilise en ballons. On obtient 3,9 g d'un produit qui contient :

- sucres 53 %
- protéines 13 %

25 Le produit obtenu est dissous dans 200 ml.

On ajoute (après filtration sur 0,22 μ):

4,5 ml de tampon phosphate 0,5 M, pH 7,0

4 mg RNase

4 mg DNase

30 40 μ l RNase T₁

On effectue une incubation pendant 4 heures à 37°C. Ensuite on ajoute 65 mg de protéase type 8, 200 μ l de phénol et 2 gouttes de toluène. On incube pendant une nuit à 37°C. On arrête la réaction par 3 extractions au butanol-chloroforme (1:1). On recueille la phase aqueuse par centrifugation à 12.000 t/mn à +4°C pendant 30 minutes. On dialyse pendant 60 heures contre de l'EDS apyrogène (changements de milieu de dialyse fréquents).

13.

On concentre sur membrane Amicon XM 100. (2 lavages x 100 ml). Le volume du diafiltrat est de 100 ml. On précipite le diafiltrat par 3 volumes d'éthanol absolu froid contenant de l'acétate de sodium à 5 %. Le précipité, recueilli par centrifugation est repris dans 100 ml d'EDS apyrogène. La solution est lyophilisée en flacons sous vide.

On obtient 1,3 g de polyoside pur contenant :

	- * sucres (PRP)	63 %
10	- protéines	2 %

* Le rapport des constituants du polyoside est le suivant:
Ribose: Ribitol : Phosphore = 0,9 ; 1 ; 0,98 (rapport théorique : 1 : 1 : 1).

Le K_D avoisine 0,1, ce qui correspond à une masse
15 moléculaire d'environ 10^7 .

Les polyosides capsulaires immunogènes purifiés obtenus selon la présente invention peuvent être utilisés pour la préparation de vaccins destinés à être administrés à titre préventif (ou curatif) à l'homme et aux
20 animaux. Les vaccins peuvent être préparés par incorporation des polyosides capsulaires purifiés obtenus selon la présente invention dans un véhicule liquide physiologiquement acceptable, tel qu'une solution physiologique ou de l'eau pour injection.

25 On peut incorporer à cet effet un ou, de préférence, plusieurs polyosides capsulaires purifiés obtenus selon la présente invention et à partir de différents types sérologiques. En outre, des vaccins polyvalents peuvent être préparés par incorporation de deux ou plusieurs polyosides capsulaires purifiés obtenus à partir
30 de différents germes.

On donnera ci-après des résultats des essais mettant en évidence l'activité immunogène des polyosides obtenus selon la présente invention.

14.

a) Titrage des anticorps sériques chez la souris

α - Des souris mâles Swiss de 20 g ont été groupées par lots de 10 animaux :

1 lot témoin n'a reçu aucun traitement.

5 1 lot a été traité par voie I.P. à raison de plusieurs doses de polyoside de l'exemple 1 par animal.

Le titrage des anticorps hémagglutinants a été effectué selon les techniques décrites dans la littérature, utilisant le globule rouge de mouton sensibilisé par le polyoside à l'aide du chlorure de chrome.

10 Les résultats figurant dans le Tableau I mettent en évidence une augmentation du titre sérique des anticorps hémagglutinants chez les animaux traités aux faibles doses par rapport aux animaux témoins et une paralysie immunitaire classique pour les fortes doses.

15 β - Des essais analogues ont été effectués chez la souris avec le polyoside de l'exemple 5 (polyoside de Klebsiella pneumoniae, type 2).

Les résultats sont donnés dans le
20 Tableau II.

SOURIS - TITRES SERIQUES ANTICORPS HEMAGGLUTININANTS						
Animaux témoins		Animaux traités 77µg/souris		Animaux traités 0,77µg/souris		Animaux traités 0,077µg/souris
(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1) (2)
1	128	7	0	64	6	>4096 13
2	128	7	0	8	3	2048 12
3	128	7	0	512	9	128 7
4	16	4	0	32	5	128 7
5	4	2	0	512	9	256 8
6	8	3	0	256	8	128 7
7	64	6	0	256	8	256 8
8	64	6	0	1024	10	64 6
9	0	0	0	128	6	256 8
10	64	6	0	2048	11	>4096 13
4,8 ± 1,84		0		7,5 ± 1,85		8,9 ± 2,02
p				< 0,05		< 0,01
(1)	Anticorps hémagglutinants inverse de la dilution					
(2)	Anticorps hémagglutinants log ₂ de l'inverse de la dilution					

	Animaux témoins		Animaux traités 1630µg/kg		Animaux traités 163µg/kg		Animaux traités 16,3µg/kg		Animaux traités 1,63µg/kg	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
1	0		0		0		8	3	0	-
2	0		0		0		16	4	16	4
3	0		0		0		32	5	16	4
4	0		0		0		16	4	32	5
5	0		0		0		8	3	64	6
6	0		0		8	3	16	4	32	5
7	0		0		0		16	4	16	4
8	0		0		2	1	16	4	32	5
9	0		0		0		32	5	64	6
10	0		0		0		64	6	16	4
								4,2 [±] 0,69		4,3 [±] 1,28
p								< 0,001		< 0,001

(1) Anticorps hémagglutinants - Inverse de la dilution
(2) Anticorps hémagglutinants - Log₂ de l'inverse de la dilution

17.

b) Titrage des anticorps sériques chez le rat.

La même étude a été réalisée chez le rat Sprague Dawley de 400-450 g mâle.

Les lots de 10 animaux ont reçu une injection
5 I.P. de 2 et 20 μ g de polyoside de *Streptococcus pneumoniae*, type 3, par animal.

Le titrage des anticorps hémagglutinants a été effectué les 4, 6 et 14ème jours après l'administration.

Les résultats sont donnés dans le Tableau III.

10 En accord avec la littérature, le titre s'élève progressivement pour atteindre son taux maximal le 6ème jour.

T A B L E A U I I I

RATS - TITRES SERIQUES - ANTICORPS HEMAGGLUTININANTS. LOG ₂ DE L'INVERSE DE LA DILUTION										
	Animaux témoins			Animaux traités 2µg/rat			Animaux traités 20µg/rat			
	J ₄	J ₆	J ₁₄	J ₄	J ₆	J ₁₄	J ₄	J ₆	J ₁₄	
1	0	0	0	7	7	5	0	5	0	
2	0	0	0	7	8	7	0	6	0	
3	0	0	0	6	6	3	6	8	2	
4	0	0	0	5	7	6	8	9	0	
5	0	0	0	7	6	4	9	10	3	
6	0	0	0	5	5	2	0	6	0	
7	0	0	0	4	6	5	3	10	3	
8	0	0	0	6	6	3	0	5	0	
9	0	0	0	5	8	7	0	6	0	
P				5,7 ± 0,89 <0,001	6,55 ± 0,82 <0,001	4,66 ± 1,46 <0,001		7,22 ± 1,66 <0,001	NS	

19.

c) Protection spécifique

α - Des lots de 10 souris mâles, d'origine Swiss, ont été immunisés avec le polyoside de *Streptococcus pneumoniae* de type 1, obtenu selon l'exemple 4, par voie sous-cutanée (deux injections à une semaine d'intervalle); doses injectées : 0,47 - 4,7 - 47 et 470 µg/kg.

Le 10ème jour après la 2ème immunisation, les animaux ont été infectés avec le pneumocoque virulent du type 1, par voie sous-cutanée (1250 germes/animal).

La mortalité après dix jours d'observation a été la suivante :

	- animaux non traités	100 %
	- animaux traités 0,47µg/kg	30 %
	- animaux traités 4,7µg/kg	10 %
15	- animaux traités 47µg/kg	30 %
	- animaux traités 470µg/kg	40 %

β - Des lots de 10 souris mâles, d'origine Swiss, ont été immunisés avec le polyoside de KP₂ par voie sous-cutanée (2 injections à une semaine d'intervalle- doses injectées: 53 - 533 - 5332µg/kg.

Le 8ème jour après le dernier traitement, les animaux ont été injectés avec la souche de *Klebsiella pneumoniae* type 2 à raison de 650 germes par animal. La mortalité après 10 jours d'observation a été la suivante :

25	- animaux non traités	100 %
	- animaux traités 53µg/kg	0 %
	- animaux traité 533µg/kg	0 %
	- animaux traités 5333µg/kg	0 %

Les polyosides obtenus selon la présente invention peuvent être utilisés notamment pour la préparation des vaccins suivants :

a) vaccins destinés au traitement préventif et curatif des affections respiratoires aiguës et chroniques contenant un des polyosides purifiés correspondant à chacun des germes suivants :

Streptococcus pneumoniae

Hemophilus influenzae, type b

Klebsiella pneumoniae

Escherichia coli

A titre d'exemple

- 1) mélange de polysides de *S.pneumoniae*,
 types 1, 6, 14, 23 50 µg
 polyside de *K.pneumoniae*, type 2 20 µg
 polyside d'*H.influenzae*, type b 20 µg
 volume final 0,5 ml d'eau physiologique.
- 2) mélange de polysides de *S.pneumoniae*,
 types 1,6,14,23 25 µg
 polyside de *K.pneumoniae*, type 2 10 µg
 polyside d'*H.influenza*, type b 10 µg

b) Vaccin antipneumococcique contenant les polysides purifiés des types suivants de *Streptococcus pneumoniae*:

1, 3, 4, 6A, 7F, 8, 9N, 12F, 14, 18L, 19F, 23, 2, 11A, 15F.

A titre d'exemples :

mélange à 50µg, dans un volume de 0,5 ml d'eau physiologique,

mélange à 25µg dans un volume de 0,5 ml d'eau physiologique.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention de polyosides capsulaires immunogènes à partir de bactéries capsulées les contenant, caractérisé en ce que l'on effectue une culture des bactéries en milieu synthétique ou semi-synthétique, à la fin de la phase de croissance de cette culture on sépare les corps microbiens d'une phase surnageante, on soumet cette phase surnageante à une filtration sur une membrane retenant les molécules d'une masse moléculaire égale ou supérieure à 100.000 daltons, obtenant ainsi un rétentat riche en polyosides capsulaires et l'on élimine les protéines, les acides nucléiques et les lipides de ce rétentat, obtenant ainsi un polyoside capsulaire purifié.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour éliminer les protéines, les acides nucléiques et les lipides du rétentat, on soumet le rétentat à une hydrolyse enzymatique, on ajoute un mélange butanol-chloroforme, on sépare la phase aqueuse, on soumet la phase aqueuse à une dialyse et on effectue une filtration sur une membrane retenant les molécules ayant une masse moléculaire supérieure à 100.000 daltons.

3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'on effectue la culture en milieu semi-synthétique contenant moins de 0,5 % en poids de produits d'origine naturelle.

4. Polyosides capsulaires obtenus par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

5. Polyosides capsulaires selon la revendication 4, caractérisés en ce qu'il sont obtenus à partir de Streptococcus pneumoniae, Hemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae ou Escherichia coli.

6. Polyosides capsulaires selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'ils sont obtenus à partir de Streptococcus pneumoniae.

7. Vaccin contenant au moins un polyoside capsulaire selon l'une quelconque des revendications 4 à 6.