



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1007316A3

NUMERO DE DEPOT : 09300778

Classif. Internat. : A61K

Date de délivrance le : 16 Mai 1995

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 26 Juillet 1993 à 15H20 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : RHONE MERIEUX Société Anonyme
rue Bourgelat 17, F-69002 LYON(FRANCE)

représenté(e)(s) par : VAN MALDEREN Michel, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine
Fabiola 6/1 - B 1080 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE POUR AMELIORER LA CROISSANCE ET LA QUALITE DES CARCASSES DES ANIMAUX DOMESTIQUES PRODUCTEURS DE VIANDES, ENSEMBLE DE VACCINATION ET VACCINS.

INVENTEUR(S) : Dufour Raymond, rue Garibaldi 97, F-69006 Lyon (FR); Roulet Claude, rue Francis de Pressensé 30 bis, F-69200 Venissieux (FR)

PRIORITE(S) 20.08.92 FR FRA 9210159

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) demandeurs(s).

Bruxelles, le 16 Mai 1995
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L.
Directeur.

Procédé pour améliorer la croissance et la qualité des carcasses des animaux domestiques producteurs de viande, ensemble de vaccination et vaccins.

5 La présente invention est relative à un procédé pour améliorer la croissance et la qualité des carcasses des porcins et ruminants domestiques destinés à la production de viande, par lequel on augmente sensiblement l'anabolisme protéique, particulièrement celui du tissu musculaire, et l'on diminue la lipogénèse, par l'augmentation des actions
10 anabolisantes de l'hormone de croissance endogène. Elle concerne également un ensemble de vaccination et des vaccins.

L'administration continue et prolongée de l'hormone de croissance homologue, extraite des hypophyses
15 ou produite par l'expression d'un ADN recombinant dans un hôte approprié, aux ruminants et porcins en croissance destinés à la production de viande, entraîne une

augmentation de la croissance pondérale, une amélioration de la composition de la carcasse par l'augmentation de la masse protéique par rapport à celle des graisses et une amélioration de l'efficacité alimentaire.

5 L'intérêt zootechnique de cette hormone, dans ses applications à l'augmentation de la production de viande ou de lait, est dû à ses propriétés de coordination des métabolismes tissulaires, musculaires, mammaires, adipeux, qui agissent en support des processus physiologiques ou de
10 croissance dominants, qui définissent l'homéorhèse et qui mettent en oeuvre la répartition directe des nutriments (Bauman D.E. et al., Federation Proc., 1982, 41, 2538-2544). Des études complémentaires ont mis en évidence que la
15 croissance dépend de facteurs variés tels que la composition en protéines de la ration, la quantité d'hormone administrée et peut-être des conditions particulières de l'environnement.

Chez le porc, les travaux de Machlin (J. Anim. Sci., 1972, 35, 794-800), Chung C.S. et al (J. Anim. Sci.,
20 1985, 60, 118-130), Etherto T.D. et al. (J. Anim. Sci., 1987, 64, 433-443), Evock C.M. et al (J. Anim. Sci., 1988, 66, 1928-1941), Campbell R.G. et al (J. Anim. Sci. 1989, 67, 177-186), Smith V.G. et Kasson (J. Anim. Sci., 1990, 68, 4109-4116) et Grant A.L. et al. (J. Endocrinol., 1991, 130, 331-338 ;
25 1991, 69, 571-577) ont montré que l'hormone de croissance porcine administrée pendant plusieurs semaines ne développait nettement ses effets anaboliques sur la croissance musculaire et sur l'efficacité alimentaire que sur les animaux recevant une alimentation riche en
30 protéines.

Chez les ruminants, les mêmes conclusions ont été apportées par les travaux de Pell J.M. et al. (British Journal of Nutrition 1990, 63, 431-445) et Mac Rae J.C. (J. Endocrinol., 1991, 130, 53-61) sur les moutons, et ceux de
5 Eisemann et al. (J. Nutrition 1986, 116, 2504-2515 et J. Nutrition 1989, 67, 105-115) et de Breir B.H. et al. (J. Endocrinol., 1988, 116, 169-177) pour les génisses et
bouvillons. Les derniers ont montré en particulier que le gain de poids était corrélé avec le développement des
10 récepteurs hépatiques de grande affinité pour la GH, lesquels dépendaient également de la richesse en protéines de la ration.

Pour pallier les difficultés ou les contraintes liées à l'administration exogène de l'hormone de croissance,
15 les méthodes immunologiques tentent de remplacer cet apport exogène, soit en cherchant à augmenter l'activité de la GH endogène, par l'action d'anticorps dirigés contre certaines
séquences peptidiques de la GH, soit en cherchant à augmenter la sécrétion de la GH endogène par l'action
20 d'anticorps dirigés contre certaines séquences peptidiques de GRF (Growth Hormone Releasing Factor) ou par l'immunoneutralisation de la somatostatine (SRIF : Somatotropin Release Inhibiting Factor).

L'augmentation de l'activité de la GH d'origine
25 externe sur la croissance de rats hypophysectomisés ou de souris dépourvues de GH a été obtenue par son administration sous la forme de complexes avec certains anticorps monoclonaux vis-à-vis de certains épitopes de GH par Holder
A.T. et al (J. Endocrinol., 1986, 107, R9-R12), Aston R. et
30 al. (J. Endocrinol., 1986, 110, 381-388), Aston R. et al.

(Mol. Immunol. 1987, 24, 143-150), Wallis R. et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 149, 187-193), Aston R. et al. (Mol. Immunol., 1989, 25, 435-446), la demande de brevet EP-A-O 458 072 (American Cyanamid Company),
5 concernant l'anticorps monoclonal PS 7.6 associé à la pST, et par Bates P.C. et al. (J. Endocrinol., 1992, 132, 369-371). Cette augmentation de l'activité de GH est également observée avec certains sérums préparés à l'aide de séquences particulières de la GH ovine par Bomford R. et
10 Aston R. (J. Endocrinol., 1990, 125, 31-38) ou de la GH porcine par Wang B.S. et al. (J. Endocrinol., 1990, 127, 482-485).

Les propriétés que possèdent les anticorps développés contre certaines séquences peptidiques de
15 l'hormone de croissance peuvent être mises en oeuvre directement vis-à-vis de l'hormone endogène des animaux en croissance à l'aide de l'immunisation active dirigée contre ces séquences. Ces possibilités sont mentionnées dans les demandes de brevet EP-A-O 137 234 (Wellcome), EP-A-O 303 488
20 (Coopers Animal Health Limited), EP-A-O 284 406 (Coopers Animal Health Limited), EP-A-O 429 788 (American Cyanamid Company) et WO 89/00166 (Peptide Technology LTD).

Une application particulière est décrite par Pell J.M. et Aston R. (J. Endocrinol., 1991, 131, R1-R4) à l'aide
25 de la séquence 134-154 de la pST utilisée sous forme d'un conjugué immunogène chez l'agneau. L'augmentation de la croissance pondérale et du poids de la carcasse et l'amélioration de la composition de la carcasse en protéines, sans que celle-ci entraîne de diminution
30 significative de la quantité de graisse, sont corrélées avec

l'immunisation contre ce peptide. Les activités métaboliques dues à l'immunomodulation de la GH endogène dans cette étude seraient différentes de celles qui sont apportées par l'administration de GH et n'entraîneraient pas de différences significatives des concentrations plasmatiques de la GH, de l'IGF.I (insuline-like growth factor I) et de l'insuline.

Des séquences peptidiques de l'hormone de croissance entraînant la formation d'anticorps potentialisant l'activité anabolique de la GH sont décrites dans les demandes de brevet précitées : la demande EP-A-O 137 234 décrit le fragment de 7 kDa de la partie C-terminale de l'hormone de croissance humaine, la demande EP-A-O 284 406 concerne le fragment 35-53 de l'hormone de croissance de différentes espèces, la demande WO 89/00166 concerne l'immunisation passive et active vis-à-vis de fragments peptidiques de la séquence 112-159 de la GH de différentes espèces, en particulier ovine, bovine et porcine, la demande EP-A-O 429 788 concerne l'immunisation passive et active des fragments 98-110, 110-118 et 155-163 de l'hormone de croissance porcine et les peptides antigéniques équivalents. Ces fragments sont comparés aux peptides 35-52, 36-44, 46-53 et 35-43 qui sont dérivés de ceux décrits dans la demande EP-A-O 284 406.

La demande EP-A-O 284 406 concerne le fragment 35-53 de l'hormone de croissance porcine (pGH), ovine ou bovine (oGH/bGH), les peptides bGH 26-43, bGH 35-43, bGH 37-48, bGH 39-46, bGH 43-54, bGH 43-61 et leurs analogues humains, aviaires, porcins et de poissons. Leur conjugaison à différents peptides, à des épitopes de la cellule T et à

la somatostatine est envisagée de manière théorique. Ces conjugués sont proposés pour une immunisation active destinée en particulier à l'augmentation de la somatogénèse et de la lactogénèse. La demande WO 89/00166, pour les mêmes
5 espèces, concerne la séquence 112-159 de la GH, plus particulièrement les séquences 130-150 de la GH bovine, 134-154 et 120-140 de la GH porcine.

L'augmentation de la sécrétion endogène de GH par l'augmentation de l'activité de GRF par certains anticorps
10 anti-GRF a fait l'objet de la demande de brevet WO 90/15073 (Coopers Animal Health Limited) qui propose l'emploi des anticorps dirigés contre des séquences peptidiques situées dans la région 28-44 du GRF et en particulier les séquences peptidiques 31-44 et 35-44 pour l'amélioration de la
15 croissance de la lactation ou de la composition de la carcasse, que ces anticorps soient d'origine passive ou active. Cette même demande propose de façon théorique la conjugaison de ces séquences avec tout ou partie de la somatostatine ou de l'hormone de croissance.

20 L'immunoneutralisation active de la somatostatine visant à l'augmentation de la croissance et de l'indice de consommation et à l'amélioration des caractéristiques de la carcasse a été décrite dans ses applications aux espèces domestiques.

25 Chez les bovins, l'immunisation active de bouvillons est rapportée par Trout W.E. et Schanbacher B.D. (J. Endocrinol., 1990, 125, 123-129) et Lawrence M.E. et al. (J. Anim. Sci., 1987, 215, Suppl. 1 résumé 135) chez la génisse laitière par Petitclerc G. et al. (J. Anim. Sci.,
30 1988, 66, Suppl. 1 389) et chez le veau par Vicini J.L. et

al. (Dom. Anim. Endocrinol. 1988, 5, 35). Les effets de l'immunisation antisomatostatine ne sont pas concordants : l'augmentation de la sécrétion basale de GH n'est observée que par Petitclerc et al. (1988 cité) et l'augmentation de la croissance sur les génisses laitières n'est observée que par Lawrence et al. sur les bouvillons (1987 cité). Trout W.E. et Schanbacher (1990 cité) n'observent aucun effet sur la GH, sur l'augmentation pondérale et sur la composition de la carcasse.

Chez les moutons, les travaux sur l'immunisation antisomatostatine ont conduit également à des résultats discordants. L'augmentation de la sécrétion de GH, mesurée par la sécrétion basale et pulsée est observée sur des agneaux recevant une immunisation active à partir de l'âge de 5 mois (Varnes M.A. et al., Endocrinology 1980, 106, 1027-1032) ; par contre le gain de poids de ces animaux est inférieur à celui des témoins.

Ces résultats ne sont pas confirmés sur des agneaux soumis à l'immunisation active antisomatostatine au même âge (4-5 mois) et placés dans des conditions d'alimentation riche ou non (Bass J.J. et al., J. Endocrinol., 1987, 112, 27-31). Dans ces conditions, aucune augmentation de GH n'est observée et une légère augmentation du taux de croissance est mesurée à la limite de la signification chez les animaux recevant la ration la plus riche.

Ces deux essais ont montré le peu d'efficacité de l'immunisation active antisomatostatine des agneaux âgés sur la croissance et le rôle non négligeable de l'alimentation sur le taux de croissance.

Tous les travaux qui sont ensuite rapportés ont été effectués sur des agneaux plus jeunes, âgés de 3 à 4 semaines, soumis à l'immunisation active contre la somatostatine. Ils montrent une augmentation du taux de croissance sans modification de la composition de la carcasse et de la sécrétion basale ou pulsée de GH. C'est ainsi que Spencer G.S.G. et al. (Anim. Prod. 1981, 32, 376) observent une augmentation de la croissance de 76 % ; les essais suivants ont confirmé une augmentation du taux de croissance des agneaux immunisés de l'ordre de 15 à 20 % (Spencer G.S.G. et al., Livest. Prod. Sci, 1983, 10, 25-37 et 469-477 ; Chaplin R.K. et al., Can. J. Anim. Sci., 1984, 64, Suppl. 1, 312-313). Cependant, cet effet d'accroissement serait moins important chez les races à développement rapide et ne serait observé chez celles-ci que sur les femelles (Spencer G.S.G. et al., Livest. Prod. Sci. 1985, 13, 43-52). Cette réserve sur la moindre efficacité de l'immunisation sur les races à développement rapide est infirmée dans un essai plus récent (Laarveld B. et al., Can. J. Anim. Sci., 1986, 66, 77-83).

Chez le porc, les premiers essais d'immunisation active antisomatostatine ont été effectués par Spencer G.S.G., 1984 (cité par Spencer G.S.G., Reprod. Nutr. Develop., 1987, 27 (23), 581-589). De leur côté, Dubreuil P. et al. (Endocrinology 1989, 125, 1378-1384) ont soumis des porcs à une immunisation active antisomatostatine pour étudier la sécrétion de GH avant et après administration externe de GRF sur les animaux alimentés ou soumis au jeûne. Ils ne décrivent pas dans ce rapport les effets sur la croissance et la composition de la carcasse. Ils mettent en

évidence, chez les immunisés, l'élévation de la sécrétion basale de GH et l'augmentation de l'amplitude de la réponse de GH aux injections rapprochées de GRF. Cette étude montre que l'immunisation active antisomatostatine lève une inhibition constante qui serait due à la somatostatine sur le niveau de la sécrétion basale et augmente l'amplitude des pics de sécrétion spontanée ou provoquée par le GRF endogène ou exogène. Elle conduit également à montrer que l'intervalle séparant deux sécrétions pulsées est dû à un état réfractaire qui serait en partie sous le contrôle de SRIF. L'immunisation active antisomatostatine supprimant la part de cet état due à la somatostatine révélerait un autre état réfractaire aux stimulations pulsées plus rapprochées qui serait dû à une désensibilisation des cellules sécrétrices de la GH à l'action du GRF. Une observation identique fut effectuée sur le rat soumis à une immunisation passive anti-SRIF (Van Arsenigevic D. et al. Endocrinology, 1987, 121, 1487).

L'application de l'immunisation passive anti-somatostatine fait l'objet du brevet US-A-4 599 229 (International Minerals and Chemical).

Les mécanismes d'action de l'hormone de croissance ou somatotropine sont encore mal définis et peuvent faire intervenir soit une action directe de la GH sur le métabolisme des protéines des tissus, soit une action dépendant de l'insuline-like growth factor 1 (IGF.1). Cette dernière ferait intervenir des activités endocrines et/ou autocrine-paracrine de l'IGF.1 pour rendre compte de la présence de récepteurs à la GH particulièrement sur le foie et le muscle.

L'activité endocrine de l'IGF.1 a fait l'objet de nombreuses démonstrations. L'administration d'IGF.1 à des rats hypophysectomisés stimule leur croissance (Schoenle E. et al., Nature 1982, 296, 252-253). La GH entraînerait l'augmentation de la sécrétion d'IGF.1 hépatique qui agirait sur l'anabolisme des protéines du tissu musculaire. Ce mode d'action est la conclusion de l'étude de Grant A.L. et al. (J. Endocrinol., 1991, 130, 331-338) qui observent, après administration de GH à des porcs pendant 1 mois, une augmentation de la concentration plasmatique d'IGF.1 associée à une augmentation d'ARNm d'IGF.1 du tissu hépatique et à une diminution d'ARNm d'IGF.1 du tissu musculaire. Plus indirectement, Chung S. et al. (Endocrinology 1986, 119, 780-786) ont montré chez le porc recevant un apport de GH pendant 35 jours, une corrélation positive entre l'augmentation de la liaison des récepteurs hépatiques à la GH, la concentration sérique d'IGF.1 et l'augmentation de poids. Pell J.M. et al. (British Journal of Nutrition 1990, 63, 431-445) envisagent également une action endocrine d'IGF.1. Ils observent également chez l'agneau recevant un apport de GH une corrélation positive entre l'augmentation de la capacité des sites de liaison de forte affinité de la GH du tissu hépatique, la concentration plasmatique de l'IGF.1 et de l'insuline et les gains en croissance observés, mais n'écartent pas une action périphérique de la GH sur le tissu musculaire. Mac Rae J.C. et al. (J. Endocrinol., 1991, 130, 53-61) décrivent également l'augmentation simultanée d'IGF.1, d'insuline et de glucose pendant l'administration continue de GH : ils observent que les niveaux de base et les augmentations

d'IGF.1 sont plus élevés avec une alimentation riche en protéines. Bien que la corrélation entre l'anabolisme des protéines et l'augmentation d'IGF.1 n'est significative que chez les animaux recevant davantage de protéines et disparaît chez les animaux recevant l'alimentation pauvre en protéines, les auteurs n'éliminent pas l'hypothèse de l'activité endocrine d'IGF.1 et envisagent une désensibilisation ou une "down-regulation" de ses récepteurs en cas d'apport protéique insuffisant.

10 Bien que les observations précédentes montrent dans la plupart des cas le rôle endocrine de l'IGF.1, la propriété d'IGF.1 à reproduire l'activité de la GH a été mise en doute par les études de croissance pondérale et longitudinale montrant que la GH est environ 20 fois plus
15 active que l'IGF.1 sur une base molaire (cité par Behringer R. et al., Endocrinology, 1990, 127, 1033-1040). La séparation des actions de la GH et de l'IGF.1 est difficile à réaliser et ne peut être envisagée que sur des petits animaux de laboratoire [souris transgéniques (Tg)
20 n'exprimant que l'IGF.1 et dépourvus de GH et souris Tg surexprimant la GH de Behringer R. et al. (Endocrinology 1990, 127, 1033-1040) ou souris dépourvues de GH recevant IGF.1 et/ou GH, de Pell J.M. et Bates P.E. (Endocrinology 1992, 130, 1942-1950)]. Le premier modèle a montré que
25 l'expression d'IGF.1 en l'absence de GH stimule les croissances pondérale et longitudinale normalement et que, de plus, GH et IGF.1 apparaissent agir respectivement sur la croissance du foie et du cerveau. Le second modèle de souris dépourvues de GH (Pell J.M.) a permis d'étudier les rôles
30 respectifs de GH et d'IGF.1 sur le métabolisme des protéines

des tissus hépatique, musculaire et cardiaque. IGF.1 et GH ont dans ce modèle des effets spécifiques sur le métabolisme protéique des tissus. La GH présente une plus grande activité anabolique qu'IGF.1 sur le métabolisme protéique des tissus musculaire et cardiaque et agirait seule et directement sur celui du tissu hépatique. Ces résultats, associés à l'observation de la synthèse tissulaire d'IGF, montrent que l'activité anabolique de la GH ne peut être limitée à la seule activité endocrine d'IGF.1.

10 L'immunomodulation de la GH par immunisation active chez l'agneau en croissance par la séquence 134-154 de la pST par Pell J.M. et Aston R. (J. Endocrinol., 1991, 131, R1-R4) semble confirmer l'observation précédente faite par Pell J.M. sur la souris. L'immunisation contre ce peptide entraîne des effets comparables à ceux d'un apport exogène de GH mais ne s'accompagne d'aucune modification du taux plasmatique d'IGF.1. Les effets de cette immunisation impliquent une action directe de la GH sur le tissu musculaire et cette action semble dépendre de l'interaction de certaines régions de l'hormone avec différents sous-types de récepteurs.

25 Les travaux décrits précédemment ont montré que les immunisations actives, neutralisante pour la somatostatine, potentialisatrice par la modulation des activités de l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH ou GRF) ou de celles de l'hormone de croissance (GH) à l'aide des séquences peptidiques particulières de ces deux hormones, pouvaient avoir un intérêt zootechnique. Ces mêmes travaux ont cependant montré que des incertitudes demeurent quant au niveau

d'intervention et à l'efficacité véritable de ces méthodes.
On a ainsi vu que l'immunomodulation de la GH endogène
n'entraîne pas une diminution significative de la quantité
de graisse. De son côté, l'immunoneutralisation active de la
5 somatostatine révèle des résultats fort contradictoires que
ce soit notamment chez les bovins et les ovins et plus
particulièrement chez les animaux à croissance rapide.

La présente invention a pour objectif de fournir
un procédé permettant d'obtenir chez tous les ruminants et
10 porcins en croissance, destinés à la production de viande,
une augmentation de la croissance pondérale, une efficacité
accrue de la ration alimentaire et une amélioration de la
composition de la carcasse, obtenues par l'augmentation de
l'anabolisme protéique, particulièrement celui du tissu
15 musculaire, et la diminution de la lipogénèse, par
l'augmentation des actions anabolisantes de l'hormone de
croissance (GH) endogène.

La demanderesse a trouvé que cet objectif pouvait
être atteint à l'aide d'une immunisation active multiple
20 faisant intervenir au moins deux valences distinctes
conduisant à une augmentation de la sécrétion basale et
pulsée de l'hormone de croissance GH et de préférence en
outre à une immunomodulation potentialisatrice de cette
hormone, ces deux valences ayant un effet de synergie
25 permettant d'aboutir au résultat recherché même chez les
animaux à croissance rapide.

La présente invention a donc pour objet un procédé
pour améliorer la croissance et la qualité des carcasses des
porcins et ruminants domestiques destinés à la production de
30 viande, par lequel on augmente sensiblement l'anabolisme

protéique, particulièrement celui du tissu musculaire, et l'on diminue la lipogénèse, par l'augmentation des actions anabolisantes de l'hormone de croissance endogène, caractérisé en ce qu'on administre à l'animal une valence congue pour induire une augmentation de la sécrétion basale et pulsée de l'hormone de croissance GH et au moins une autre valence choisie parmi des valences congues pour induire cet effet ou une immunomodulation potentialisatrice de la GH.

10 Malgré les données contradictoires de l'état de la technique au sujet de l'immunisation active antisolmatostatine (supra), la demanderesse a en outre trouvé qu'il était préférable d'assurer l'augmentation de la sécrétion basale et pulsée de la GH par cette technique, en 15 la potentialisant par son association avec l'immunomodulation potentialisatrice de la GH.

Cette dernière est de préférence obtenue par immunisation active dirigée contre un ou plusieurs fragments de la GH de façon à augmenter l'activité de celle-ci.

20 Selon l'invention, on peut encore associer l'immunomodulation potentialisatrice de la GH ou l'immunisation antisolmatostatine à l'immunomodulation potentialisatrice du GRF qui conduit aussi à une augmentation de la sécrétion basale et pulsée de la GH, par 25 immunisation active contre un ou plusieurs fragments du GRF de façon à augmenter l'activité de cette hormone.

Enfin, dans un mode de réalisation intéressant de l'invention, on peut associer ces trois types d'immunisation active.

30 L'immunoneutralisation active de la somatostatine

est de préférence obtenue à l'aide de la somatostatine 14 et/ou l'un au moins de ses fragments peptidiques aptes à induire des anticorps neutralisants.

L'immunomodulation potentialisatrice active du GRF est de préférence obtenue à l'aide d'au moins l'une des séquences peptidiques décrites dans la demande de brevet internationale WO 90/15073, la séquence 28-44 ou l'une quelconque des séquences partielles de cette région et en particulier les séquences 31-44 et 35-44.

L'immunomodulation potentialisatrice active de la GH est de préférence obtenue à l'aide de l'une au moins des séquences peptidiques décrites d'un part pour la pST (somatotropine ou GH porcine) dans les demandes de brevet EP-A-O 284 406 pour la séquence 35-53, WO 89/00166 pour la séquence 112-159 ou des fragments de la séquence 112-159 notamment les séquences 133-159 et 128-147, EP-A-O 429 788 pour les séquences 98-110, 110-118 et 155-163, EP-A-O 303 488 pour les séquences 112-138, 119-131, 130-143, 123-137, 133-146 et dans la publication de Aston R. et al. (Molecular Immunology, 1991, 28, 41-50) pour les séquences 53-73, 134-154 et 174-191, d'autre part pour la bST ou oST (somatotropine ou GH bovine ou ovine) dans les demandes de brevet EP-A-O 284 406 pour les séquences 35-53, WO 89/00166 pour la séquence 112-159 ou l'une quelconque des séquences partielles de cette région (notamment 133-159 et 128-147), EP-A-O 303 488 pour les séquences 122-138, 119-131, 130-143, 123-137, 133-146, et pour la publication d'Aston R. et al. (Molecular Immunology, 1991, 28, 41-50) pour les séquences 32-46, 80-100, 95-115, 120-140, 130-150, 167-191.

Bien entendu, l'invention couvre aussi

l'utilisation de fragments de ces séquences conservant l'activité de la séquence dont ils sont issus et des fragments ou séquences antigéniquement et immunologiquement équivalents aux fragments et séquences ainsi définis, ce qui recouvre aussi des séquences les incorporant.

Ces peptides peuvent être obtenus par synthèse chimique ou biochimique ou par expression d'un ADN recombinant dans un hôte approprié. Ils sont dans tous les cas associés à une molécule porteuse responsable de l'immunogénicité, sous forme d'un conjugué dans lequel la séquence est liée par covalence à la molécule porteuse immunogène ou encore sous forme d'une protéine de fusion immunogène obtenue directement par expression d'un ADN recombinant.

Les valences selon l'invention comprennent de préférence un adjuvant de l'immunité et se présentent avantageusement sous forme d'une émulsion.

Il s'agit de préférence de valences, notamment en émulsion eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau, conçues pour obtenir une immunisation conduisant à l'activation marquée et de longue durée de la GH après une ou deux administrations. Le procédé selon l'invention comprend de préférence une administration précoce des valences chez le jeune animal, notamment dans les premières semaines qui suivent la naissance, de préférence au sevrage chez les porcelets et entre 3 et 4 semaines pour les agneaux et veaux.

Une deuxième administration peut être réalisée ultérieurement, de préférence alors au moins 4 semaines environ après la première, au plus tôt 3 mois environ et au

plus tard 1 mois environ avant l'abattage de l'animal, pour
obtenir une immunisation conduisant à une activation
(activation globale résultant de l'augmentation de la
sécrétion de GH et éventuellement de la potentialisation de
son activité) marquée et de longue durée de la GH.

L'administration dite précoce inclut aussi selon
l'invention l'administration unique des valences sous une
forme assurant leur libération retardée, continue ou pulsée,
apte à maintenir un taux élevé en anticorps.

L'invention a encore pour objet un ensemble de
vaccination contenant une valence déterminant une
augmentation de la sécrétion basale et pulsée de l'hormone
GH et au moins une valence choisie parmi des valences
déterminant ce même effet ou une immunomodulation
potentialisatrice de l'hormone de croissance GH, pour une
utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en
vue d'augmenter les actions anabolisantes de l'hormone de
croissance GH.

La valence potentialisant l'hormone de croissance
peut être un vaccin comprenant à titre de principe actif au
moins une séquence peptidique de la GH et apte à induire des
anticorps dirigés contre la séquence correspondante de la GH
endogène pour potentialiser l'activité de cette dernière.

Les valences déterminantes sur la sécrétion de GH
peuvent être un vaccin comprenant à titre de principe actif
la somatostatine et/ou l'un au moins de ses fragments aptes
à induire des anticorps neutralisants, pour induire des
anticorps antisomatostatine, et/ou un vaccin comprenant au
moins une séquence peptidique de GRF pour induire des
anticorps contre la séquence correspondante de GRF endogène

pour potentialiser son action.

Lesdites séquences peptidiques de GH et de GRF peuvent être choisies parmi celles citées précédemment. Les séquences peptidiques et la somatostatine ou ses fragments
5 sont associées à des molécules porteuses comme vu ci-dessus.

Par utilisation simultanée, on entend l'utilisation d'un mélange, extemporané ou non, des différentes valences. Par utilisation séparée, on entend l'administration séparée des valences non mélangées dans un
10 court intervalle de temps. Enfin, par utilisation étalée dans le temps, on entend l'administration séparée des valences au cours du temps ou l'administration simultanée ou séparée dans le sens ci-dessus des valences mais à plusieurs reprises.

15 Un ensemble de vaccination préféré comprend un mélange des valences, fait ou à faire extemporanément, de préférence en émulsion eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau, qui, après une première administration, induit en général une réponse immunitaire sans effet notable sur l'activité de
20 l'hormone de croissance et qui, après une deuxième administration, induit une immunisation conduisant à une activation marquée et de longue durée de la GH.

L'invention a également pour objet des vaccins multivalents contenant une valence conçue pour induire une
25 augmentation de la sécrétion basale et pulsée de l'hormone de croissance GH et au moins une valence choisie parmi des valences conçues pour induire ce même effet ou une immunomodulation potentialisatrice de l'hormone de croissance GH. Les valences sont notamment choisies parmi :
30 une valence comprenant à titre de principe actif la

somatostatine et/ou l'un au moins de ses fragments aptes à induire des anticorps neutralisants associés à une molécule porteuse immunogène ; une valence comprenant à titre de principe actif au moins une séquence peptidique de la GH associée à une molécule porteuse immunogène, apte à induire des anticorps potentialisateurs de l'activité de la GH ; une valence comprenant à titre de principe actif une séquence peptidique du GRF associée à une molécule porteuse immunogène, apte à induire des anticorps potentialisateurs de l'activité du GRF. Les vaccins sont adjuvés pour obtenir une immunisation conduisant à une activation marquée et de longue durée de la GH après une ou plusieurs, notamment deux, administrations. Les adjuvants utilisés sont de préférence une émulsion huile-dans-l'eau ou eau-dans-l'huile. Les séquences peptidiques peuvent être notamment choisies parmi celles citées plus haut.

Un vaccin avantageux selon l'invention, nécessitant une seule administration, peut être préparé selon toute technique connue sous une forme assurant une libération retardée, continue ou pulsée, des valences et maintenant ainsi un niveau élevé d'anticorps.

Les émulsions selon l'invention sont de préférence constituées d'un mélange d'huiles minérales hautement purifiées et de tensioactifs non ioniques.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail par l'exposé de méthodes de préparation de vaccins et de modes de réalisation du procédé conformes à l'invention.

NECESSITE D'UNE MOLECULE PORTEUSE IMMUNOGENE

Les différents peptides indiqués pour la mise en

oeuvre de l'invention, qu'ils soient obtenus par synthèse chimique ou biochimique ou par expression d'un ADN recombinant dans un hôte approprié, ne peuvent pas par eux-mêmes déclencher une réponse immunitaire et entraîner
5 l'apparition d'anticorps. Pour être immunogènes, ils doivent être couplés à des molécules porteuses qui sont généralement des protéines (albumine, ovalbumine, anatoxine tétanique, alpha-globuline, thyroglobuline, hémocyanine par ex.) par des liaisons covalentes ou être exprimés dans une hôte
10 approprié à partir d'un ADN recombinant, sous forme de protéine de fusion immunogène, entre par exemple une protéine du périplasma (MalE) ou de la membrane externe (TraTp) d'E. coli ou toute autre protéine ayant des propriétés analogues.

15 La conjugaison d'un peptide sur une protéine (ou une glycoprotéine) implique la création d'une liaison covalente entre le peptide et la protéine. Cette liaison se fait sur les groupements réactifs des résidus des acides aminés de la protéine porteuse (acide aspartique, acide
20 glutamique, histidine, tyrosine, cystéine et surtout lysine) ou sur les oligosaccharides après oxydation périodique (pour les glycoprotéines). Pour le peptide, la liaison peut se faire aussi sur les résidus des acides aminés, sur les extrémités NH_2 et COOH (quand elles sont libres) ; un acide
25 aminé supplémentaire peut être ajouté tel que la tyrosine (qui permet aussi le marquage par l'iode radioactif) et surtout la cystéine qui peut réagir quantitativement avec certains groupements.

De nombreux agents de conjugaison ont été
30 proposés. On peut les classer en 3 grandes classes : les

agents homobifonctionnels, les agents hétérobifonctionnels et les agents de condensation.

Les agents homobifonctionnels sont formés essentiellement d'une chaîne hydrocarbonée, aliphatique et/ou aromatique, possédant à ses extrémités deux groupements identiques susceptibles de réagir avec un bon rendement avec les résidus d'acides aminés portés par le peptide et la molécule porteuse. De nombreux groupements ont été proposés : bisimidates de méthyle, diesters du N-hydroxysuccinimide, bisisothiocyanates, dialdéhydes, qui tous réagissent sur les fonctions amines, benzidine bisdiazotée, qui copulent sur les résidus tyrosine, bismaléimides, qui s'additionnent sur les thiols. L'agent homobifonctionnel le plus largement employé est le glutaraldéhyde. Les agents homobifonctionnels conduisent, en plus de la liaison peptide-protéine porteuse recherchée, à une dimérisation du peptide et de la protéine porteuse et, si la protéine ou le peptide possède plusieurs groupements réactifs, à une réticulation du conjugué rendant sa reproductibilité et sa caractérisation difficiles.

Pour pallier ces inconvénients, des auteurs ont proposé l'emploi des agents hétérobifonctionnels. Ceux-ci sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée ayant à ses extrémités deux groupements réactifs différents. Le couplage se fait en 3 temps :

- (1) : addition de l'agent hétérobifonctionnel sur la molécule porteuse (ou le peptide), par un seul des deux groupements réactifs,
- (2) : (pour certains agents seulement) : déblocage de l'autre groupement réactif,

(3) : addition du peptide (ou de la molécule porteuse) qui réagit avec le groupement libéré précédemment.

Pratiquement, dans la plupart des agents hétérobifonctionnels, l'un des groupements réactifs est un ester du N-hydroxysuccinimide (ou du N-hydroxysulfosuccinimide, plus soluble dans l'eau) qui réagit dans un premier temps en milieu aqueux sur les résidus amine pour donner une liaison amide avec l'agent de couplage. L'autre groupement est généralement soit un groupement susceptible de libérer des thiols [S-acétyl thioglycolate du SATA, hydrolysable par l'hydroxylamine ou les bases diluées, (pyridyl-2)dithio du SPDP, réduit par le dithiothréitol], soit au contraire un groupement susceptible de réagir avec les thiols (maléimide du MBS, SMPB, SMCC ou du GMBS), (pyridyl-2)dithio du SPDP, iodoacétyl du SIAB. Dans la catégorie des agents hétérobifonctionnels, on peut ajouter l'iminothiolane.

Dans la plupart des cas, il est possible de doser simplement la quantité de réactif fixé, et de déterminer le niveau de substitution moyen du conjugué.

Enfin, dans les réactifs de condensation, il n'y a pas de ligand entre la molécule porteuse et le peptide. A cette catégorie appartiennent les carbodiimides et l'oxydation periodique des oligosaccharides des sucres.

Les carbodiimides permettent la formation d'une liaison amide entre les groupements amine et acide carboxylique portés par les deux molécules, peptide et protéine porteuse. La réaction se fait par activation de la fonction acide carboxylique (O-acyl isourée) sur laquelle réagissent les groupements amine. Il a été proposé de

catalyser la réaction par le N-hydroxysuccinimide, l'espèce réactive est alors un ester de N-hydroxysuccinimide, dont la demi-vie est plus longue que celle de l'O-acyl isourée. Quoique la réaction soit très employée pour la préparation des conjugués avec en particulier le N-éthyl-N'-(diméthylamino-3 propyl) carbodiimide (EDCI), avec ou sans N-hydroxysuccinimide, cette méthode souffre des mêmes inconvénients que celles utilisant les agents homobifonctionnels : dimérisation possible du peptide, réticulation de la protéine porteuse, mélange final complexe. De plus il a été montré que le carbodiimide peut s'additionner pour donner un groupement N-acyl urée stable et de plus antigénique. Quant au couplage sur les glycoprotéines par les oligosaccharides, il est employé surtout pour la préparation des conjugués avec les immunoglobulines et certaines enzymes, comme la peroxydase. Après avoir bloqué les groupements amine, la glycoprotéine est oxydée par l'acide periodique, puis purifiée. Ensuite l'autre protéine réagit par ses fonctions amine sur les groupements aldéhyde et enfin le conjugué formé est réduit par le borohydrure. Récemment, il a été proposé d'effectuer le couplage sur les aldéhydes provenant de l'oxydation periodique des sucres par des hydrazines ou des semicarbazides portés par l'autre molécule.

25 Les vaccins de l'invention destinés aux ruminants et porcins domestiques sont constitués notamment de deux ou trois immunogènes associés à des adjuvants de l'immunité, formant les valences des vaccins. Ces valences peuvent être constituées comme suit :

- mélange des conjugués ou des protéines de fusion respectifs à la somatostatine et à une séquence peptidique de GH,
- mélange des conjugués ou des protéines de fusion respectifs à la somatostatine et à une séquence de GRF,
- mélange des conjugués ou des protéines de fusion respectifs à une séquence de GRF et à une séquence de GH,
- mélange des conjugués ou des protéines de fusion respectifs à la somatostatine, à une séquence de GRF et à une séquence de GH.

ADJUVANTS

Les substances adjuvantes de l'immunité, ou adjuvants, sont de nature chimique très variée et ont un mode d'action encore mal connu. Les adjuvants les plus largement employés dans les préparations vaccinales destinées aux animaux peuvent être classés dans trois groupes : les gels d'aluminium, les saponines et les émulsions.

a) Gels d'aluminium

Il s'agit des adjuvants à base d'aluminium, hydroxyde ou phosphate.

Les hydroxydes d'aluminium sont soit préparés in situ, par addition d'alun à la solution d'antigène, soit séparément, avant d'être additionnés à l'antigène. Ces gels apparemment amorphes contiennent cependant des microcristaux de boehmite (AlOOH) (Shirodkar S. et al., Pharm. Res., 1990, 7, 1282-1288).

b) Saponines

Les saponines sont des substances extraites de

végétaux appartenant à diverses familles (Caryophyllacées, Rosacées, Araliacées...) ; leur propriété essentielle est d'abaisser la tension superficielle et beaucoup d'entre elles sont hémolytiques. Au niveau chimique, les saponines sont des mélanges très complexes d'hétérosides de triterpènes ou de stéroïls, chimiquement très proches. L'écorce de bois de Panama a fourni sous le nom de Quil A une fraction purifiée, mais qui est encore un mélange complexe d'hétérosides triterpéniques dont certains sont adjuvants et dont la structure chimique complète n'est connue que pour un très petit nombre d'entre eux.

La saponine Quil A forme avec certaines protéines (généralement amphiphiles) des complexes appelés iscoms (immunostimulating complex) qui sont des adjuvants très puissants.

c) Emulsions

Les émulsions sont des dispersions, macroscopiquement homogènes, d'un liquide dans un autre liquide non miscible. L'un des liquides étant généralement de l'eau, l'autre de l'huile ou une substance miscible à l'huile, on parlera d'émulsion eau-dans-l'huile (E/H) et d'émulsion huile-dans-l'eau (H/E) selon que la phase dispersée est l'eau ou l'huile respectivement. L'émulsion est rendue stable par un troisième composant, qui est le tensioactif.

Les huiles utilisées jusqu'à présent sont des huiles minérales (hydrocarbures) obtenues par raffinage du pétrole. Leur composition chimique exacte n'est pas connue avec précision. Ces huiles se caractérisent par divers paramètres (viscosité, densité, indice de réfraction) qui

sont liés à la masse molaire moyenne et au type d'hydrocarbure : isoparaffinique ou cycloparaffinique (naphténique) ; les hydrocarbures linéaires et les aromatiques ayant été éliminés lors du raffinage.
5 Actuellement des hydrocarbures obtenus par "oligomérisation" d'alcènes, chimiquement beaucoup mieux définis que les huiles minérales, sont disponibles.

Les huiles végétales, qui sont biodégradables, sont envisageables, mais n'ont pas encore conduit à la
10 production industrielle de vaccins en émulsion.

Les tensioactifs sont des substances possédant une partie hydrophile, et une partie lipophile. Ces substances seules ou mélangées entre elles se mettent à l'interface eau-huile et, selon l'importance relative des parties
15 hydrophile et lipophile (balance hydrophile-lipophile ou HLB des auteurs anglo-saxons), conduisent à des émulsions huile-dans-l'eau ou eau-dans-l'huile, dont les propriétés sont différentes, tant au niveau physique (viscosité, comportement vis-à-vis des contenants...) que biologique
20 (pouvoir adjuvant, tolérance).

Un point important, en particulier pour les émulsions destinées à être injectées, est la nature chimique des tensioactifs, en particulier des groupements hydrophiles. D'une manière générale, pour des raisons
25 d'innocuité (absence d'irritation en particulier) les groupements hydrophiles seront de préférence non ioniques.

Une propriété intéressante des tensioactifs lipophiles à très faible HLB tels que le Span 85[®] (trioléate de sorbitan) ou le Pluronic L121[®] (copolymère d'oxyde
30 d'éthylène et d'oxyde de propylène) est qu'ils sont

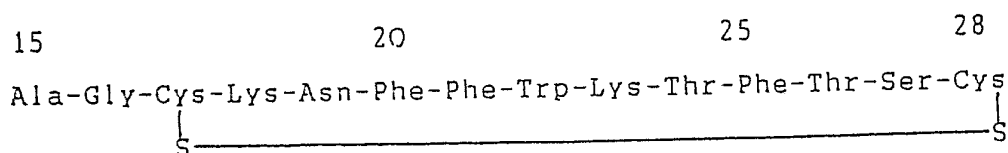
eux-mêmes adjuvants (Woodward L.F., Lab. Anim. Sci. 1989, 39, 222-225). Cela est à relier au pouvoir adjuvant des huiles végétales (plus faible cependant que celui des hydrocarbures) qui peuvent être considérées comme des tensioactifs de très faible HLB.

Il faut ajouter que les émulsions peuvent contenir des corps bactériens utilisés soit comme immunogènes, soit comme adjuvant. L'emploi de mycobactéries tuées, dans l'adjuvant de Freund complet en particulier, est possible au laboratoire, mais est impossible pour les animaux de rente. La recherche de la substance adjuvante présente dans les mycobactéries et de la plus petite structure chimique qui possède cette propriété a conduit à l'isolement, et à la caractérisation du muramyl-dipeptide (MDP), puis à sa synthèse.

PREPARATION DE CONJUGUES-SOMATOSTATINE

Le conjugué avec la somatostatine peut être constitué à partir de l'hormone de forme naturelle, la somatostatine 14' (ou somatostatine 15-28), ou de fragments de celle-ci aptes à induire des anticorps neutralisants. Il est obtenu par l'une ou l'autre des méthodes de conjugaison décrites ci-dessus.

La somatostatine est un tétradécapeptide. Sa formule est la suivante :



A titre d'exemple, les conjugués peuvent être

réalisés par un couplage entre un polymère (Lys-Ala) et la somatostatine par le carbodiimide en présence de N-hydroxysulfosuccinimide, par un couplage entre l'anatoxine tétanique et la somatostatine par le glutaraldéhyde, par un
5 couplage entre la thyroglobuline et la somatostatine par le carbodiimide ou encore par le couplage entre l'alpha-globuline et la somatostatine par le glutaraldéhyde.

EXEMPLES DE PREPARATION DE VACCINS ANTISOMATOSTATINE :

1) Le conjugué est obtenu en additionnant, à 50 mg
10 de somatostatine et 200 mg d'alpha-globuline humaine dissous dans 40 ml d'acétate d'ammonium 0,1 M, 26 ml de solution de glutaraldéhyde 20 mM (0,2 %) sur une durée de 1 heure. Le mélange est laissé une nuit à température ambiante, puis est dialysé plusieurs fois à 4°C contre du tampon NaCl 0,15 M -
15 phosphate 0,01 M, pH 7,5.

Le conjugué, qui forme une suspension ocre, est concentré par ultrafiltration sur membrane ultrafiltrante Amicon de seuil de coupure 10 kDa, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 25 ml.

20 L'antigène est mis en émulsion à l'aide d'une formulation employée industriellement, dans laquelle entrent de l'huile minérale hautement purifiée et des tensioactifs non ioniques, l'un lipophile, l'autre hydrophile ; le produit final est une émulsion huile-dans-l'eau.

25 2) Le conjugué est obtenu en additionnant, à 12 mg de thyroglobuline et 4 mg de somatostatine dissous dans 2 ml d'eau, 2,3 mg de N-éthyl-N'-(diéthylamino-3 propyl) carbodiimide et 0,83 mg de N-hydroxysulfosuccinimide dissous dans l'eau. Le pH est ajusté autour de 6-7. Le mélange est

laissé une nuit à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée, dessalée par chromatographie sur Séphadex G-50 en tampon NH_4HCO_3 0,05 M, puis est lyophilisée.

5 Les antigènes sont repris dans 2,5 ml de tampon NaCl 150 mM - phosphate 10 mM pH 7,5, puis sont émulsionnés dans une phase huileuse utilisée industriellement pour obtenir une émulsion eau-dans-l'huile. Cette phase huileuse contient de l'huile minérale hautement purifiée et des
10 tensioactifs non ioniques, lipophiles et hydrophiles.

SEQUENCES PEPTIDIQUES DE GH ET DE GRF

Les séquences peptidiques des hormones GRF et GH indiquées dans les demandes de brevet ou dans les articles précités, peuvent être utilisées à raison d'une par type
15 d'hormone pour la préparation de conjugués ou protéines de fusion.

Les séquences peptidiques de GH pouvant être utilisées sont notamment les suivantes :

- de l'hormone GH bovine ou ovine 35-53

20 NH_2 -Thr-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg-Tyr-Ser-Ile-Gln-Asn-Thr-
Gln-Val-Ala-Phe-Cys-COOH

- de l'hormone GH porcine 35-53

Ala-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg-Tyr-Ser-Ile-Gln-Asn-Ala-Gln-
Ala-Ala-Phe-Cys

- de l'hormone GH porcine

98-110 Thr-Asn-Ser-Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr

110-118 Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu

155-163 Leu-Leu-Lys-Asn-Tyr-Gly-Leu-Leu-Ser

- 5 - les séquences 122-138, 119-131, 130-143, 123-137 et
133-146 (des hormones bovine, ovine, porcine).

bovine 122-138 :

Ala-Leu-Met-Arg-Glu-Leu-Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-
Ile-Leu

- 10 Ovine 122-138 :

même séquence que la GH bovine, excepté en 130 où Gly est
remplacé par Val

Porcine 122-138 :

- 15 même séquence que la GH bovine, excepté en 131 où Thr est
remplacé par Ser

Bovine 130-143 :

Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp

Ovine 130-143 :

le 130 Gly est remplacé par Val

- 20 Porcine 130-143 :

Gly-Ser-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp

Bovine, ovine ou porcine 133-146 :

Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-Phe-Asp

Fragments de la séquence 112-159 ;

5 en particulier les oligopeptides des régions 133-159 et
128-147 comprenant de 6 à 7 peptides au minimum et 20 au
maximum.

Certains ont fait l'objet de descriptions par Aston et al.
cité ci-dessus.

- de l'hormone porcine

10 53-73

Cys-Phe-Ser-Glu-Thr-Ile-Pro-Ala-Pro-Thr-Gly-Lys-Asp-Glu-Ala-
Gln-Gln-Arg-Ser-Asp-Val

134-154

15 Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-
Leu-Arg-Ser-Asp-Asp-Ala

174-191

Thr-Tyr-Leu-Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Val-Glu-Ser-Ser-
Cys-Ala-Phe

- de l'hormone bovine ou ovine

20 32-46

Phe-Glu-Arg-Thr-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg-Tyr-Ser-Ile-Gln

80-100

Leu-Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Gly-Pro-Leu-Gln-Phe-Leu-Ser-
Arg-Val-Phe-Thr-Asn-Ser

95-115

Arg-Val-Phe-Thr-Asn-Ser-Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-
Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys-Asp

120-140

5 Ile-Gln-Ala-Leu-Met-Arg-Glu-Leu-Glu-Asp-Gly-Ser-Pro-Arg-Ala-
Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln

130-150

Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-
Phe-Asp-Thr-Asn-Met-Arg

10 167-191

Lys-Asp-Leu-His-Lys-Thr-Glu-Thr-Tyr-Leu-Arg-Val-Met-Lys-Cys-
Arg-Arg-Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe

Préparation d'un conjugué avec une séquence de GH : exemple
de conjugaison avec la fraction GH (134-154).

15 Dans un flacon opaque sont dissous successivement
42 mg de peptide GH (134-154) et 60 mg d'hémocyanine pure de
Megathura crenulata (KHL). Puis 0,8 ml de solution de
glutaraldéhyde 68,5 mM est ajouté très lentement, sur une
durée totale de 5 heures, à raison de 40 µl toutes les 15
20 minutes. La solution est ensuite dialysée à 4°C contre un
tampon isotonique (NaCl 0,15 M - phosphate 0,01 - pH 7,5)
puis est conservée à - 20°C jusqu'à son utilisation.

Les séquences peptidiques de GRF pouvant être
utilisées sont notamment les suivantes :

25 Les séquences 28-44 porcine, bovine (ou ovine ou caprine) et

plus particulièrement les séquences 31-44 ou 35-44

28-44 porcin

Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Arg-Val-Arg-Leu

5 28-44 bovin, ovin, caprin

Asn-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Arg-Asn-Gln-Glu-Gln-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-Leu

et les séquences 31-44 et 35-44 des GRF des différentes espèces ou peptides équivalents du point de vue antigénique et immunologique.

10

Préparation d'un conjugué avec une séquence de GRF : exemple de conjugaison avec la fraction GRF (28-44).

Dans un flacon opaque contenant 11,5 ml de NaHCO_3 0,1 M sont dissous successivement 50 mg de peptide GRF (28-44) et 36 mg d'hémocyanine de Megathura crenulata (KLH) lyophilisée. Puis 475 μl de glutaraldéhyde 68,5 mM sont additionnés sur une durée totale de 5 heures (soit 50 μl toutes les 30 minutes). Puis la solution est immédiatement dialysée à + 4°C contre un tampon isotonique (NaCl 0,15 M - phosphate 0,01 M - pH 7,5).

15

20

Préparation de vaccins plurivalents

En tenant compte de l'animal destinataire, on prépare un vaccin comprenant, dans une émulsion eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau, un conjugué immunogène de l'une des susdites séquences GRF et/ou de GH et un conjugué immunogène de la somatostatine 14. La première

25

administration du vaccin induit une réponse immunitaire sans effet notable sur l'activité de l'hormone de croissance. La deuxième administration du vaccin est nécessaire pour que l'immunisation et ses effets sur l'immunomodulation potentialisatrice de la GH deviennent marqués et prolongés. Les émulsions sont stables et faites d'un mélange d'huiles minérales hautement purifiées et de tensioactifs non ioniques.

Le calendrier de vaccination est le suivant :

- porc : premier vaccin au sevrage des porcelets ;
- bovins, ovins : premier vaccin administré aux veaux et agneaux entre 3 et 4 semaines ;
- pour tous, deuxième vaccin au moins 4 semaines après le premier, au plus tôt 3 mois et au plus tard 1 mois avant l'abattage.

Le mode d'administration de ces formulations est de préférence transcutané, notamment à l'aide d'un appareil d'injection sans aiguille par jet sous pression, notamment selon la demande de brevet FR-A-2 652 257.

L'efficacité de l'immunisation active est mesurée par les réponses immunitaires et les effets sur la croissance pondérale et la composition en eau, en protéines et en graisses du tissu musculaire. Les titres en anticorps sont déterminés par radio-immuno-essai jusqu'au moment de l'abattage et concernent les anticorps antisomatostatine et anti-séquences peptidiques des hormones GRF et GH.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour améliorer la croissance et la qualité des carcasses des porcins et ruminants domestiques destinés à la production de viande, par lequel on augmente sensiblement l'anabolisme protéique, particulièrement celui du tissu musculaire, et l'on diminue la lipogénèse, par l'augmentation des actions anabolisantes de l'hormone de croissance endogène, caractérisé en ce qu'on administre à l'animal une valence conçue pour induire une augmentation de la sécrétion basale et pulsée de l'hormone de croissance GH et au moins une autre valence choisie parmi des valences conçues pour induire cet effet ou une immunomodulation potentialisatrice de la GH.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'augmentation de la sécrétion basale et pulsée de la GH est obtenue par immunisation active antisomatostatine et/ou par immunomodulation potentialisatrice de l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GRF).

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'immunomodulation potentialisatrice de la GH et/ou de GRF est obtenue par immunisation active dirigée contre un ou plusieurs fragments peptidiques de l'hormone correspondante de façon à augmenter l'activité de celle-ci.

4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que la valence conçue pour induire une augmentation basale et pulsée de la GH comprend la somatostatine 14 et/ou l'un au moins de ses fragments

peptidiques, associés à une molécule porteuse immunogène.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la valence conçue pour induire une immunomodulation potentialisatrice de la GH comprend l'une au moins des séquences de GH qui suivent :

- séquences de la GH porcine 35-53, 112-159, 133-159, 128-147, 98-110, 110-118, 155-163, 122-138, 119-131, 130-143, 123-137, 133-146, 53-73, 134-154, 174-191 ;

10 - séquences de la GH bovine ou ovine 35-53, 112-159, 133-159, 128-147, 122-138, 119-131, 130-143, 123-137, 133-146, 32-46, 80-100, 95-115, 120-140, 130-150, 167-191 ;

15 - fragments de ces séquences conservant l'activité de la séquence dont ils sont issus et fragments ou séquences antigéniquement et immunologiquement équivalents, les fragments ou séquences étant associés à une molécule porteuse immunogène.

6. Procédé selon la revendication 3 ou 5, caractérisé en ce que l'immunisation active dirigée contre GRF est obtenue par une valence comprenant l'une au moins des séquences 28-44, 31-44, 35-44 ou fragments de ces séquences conservant l'activité de la séquence dont ils sont issus et fragments ou séquences antigéniquement et immunologiquement équivalents, les fragments ou séquences étant associés à une molécule porteuse immunogène.

25 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les valences comprennent un adjuvant de l'immunité.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les valences sont conçues pour obtenir une immunisation conduisant à

30

l'activation marquée et de longue durée de la GH après une ou deux administrations.

5 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les valences sont en émulsion eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau.

10 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend une administration précoce des valences chez le jeune animal, notamment dans les premières semaines qui suivent la naissance.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que cette administration précoce a lieu au sevrage chez le porcelet et entre 3 et 4 semaines chez les agneaux et veaux.

15 12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que les valences sont sous une forme leur assurant une libération retardée, continue ou pulsée.

20 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que l'on effectue une deuxième administration 4 semaines environ après l'administration précoce, au plus tôt 3 mois environ et au plus tard 1 mois environ avant l'abattage de l'animal.

25 14. Ensemble de vaccination contenant une valence déterminant une augmentation de la sécrétion basale et pulsée de l'hormone de croissance GH et au moins une autre valence déterminant ce même effet ou une immunodulation potentialisatrice de l'hormone de croissance GH, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en vue d'augmenter les actions anabolisantes de l'hormone de
30 croissance GH.

15. Ensemble de vaccination selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comporte une valence constituée par un vaccin comprenant à titre de principe actif au moins une séquence peptidique de la GH et apte à induire des anticorps dirigés contre la séquence correspondante de la GH endogène pour potentialiser l'activité de cette dernière.

16. Ensemble de vaccination selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il comporte une valence constituée par un vaccin comprenant à titre de principe actif la somatostatine pour induire des anticorps antisomatostatine.

17. Ensemble de vaccination selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce qu'il comporte une valence constituée par un vaccin comprenant à titre de principe actif au moins une séquence peptidique de la GRF pour induire des anticorps contre la séquence correspondante de la GRF endogène pour potentialiser son action.

18. Ensemble de vaccination selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange, fait ou à faire extemporanément, des valences selon les revendications 14 à 16 destiné à induire une immunisation conduisant à l'activation marquée et de longue durée de la GH après une ou deux administrations.

19. Vaccin multivalent contenant une valence conçue pour induire une augmentation basale et pulsée de l'hormone de croissance GH et au moins une autre valence choisie parmi des valences conçues pour induire cet effet ou une immunomodulation potentialisatrice de l'hormone de croissance GH.

20. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé

en ce que les valences sont choisies parmi les valences comprenant à titre de principe actif la somatostatine et/ou l'un au moins de ses fragments peptidiques, associés à une molécule porteuse immunogène, au moins une séquence
05 peptidique de la GH associée à une molécule porteuse immunogène, apte à induire des anticorps potentialisateurs de l'activité de la GH, et au moins une séquence peptidique du GRF associée à une molécule porteuse immunogène, apte à induire des anticorps potentialisateurs de l'activité du GRF ; le vaccin étant adjuvé pour induire une
10 immunisation conduisant à l'activation marquée et de longue durée de la GH après une ou plusieurs administrations.

21. Vaccin selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il se présente sous une forme assurant une libération retardée, continue ou pulsée, des valences.

15 22. Ensemble de vaccination ou vaccin selon la revendication 15 ou 20, caractérisé en ce que la ou les séquences peptidiques de la GH sont choisies parmi les séquences ou fragments définis à la revendication 5.

20 23. Ensemble de vaccination selon la revendication 17, caractérisé en ce que la ou les séquences peptidiques de GRF sont choisies parmi les séquences ou fragments définis à la revendication 6.

25 24. Vaccin selon la revendication 20, caractérisé en ce que la ou les séquences peptidiques de GRF sont choisies parmi les séquences ou fragments définis à la revendication 6.



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 4621
BE 9300778

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
D,X	EP-A-0 405 763 (COOPERS ANIMAL HEALTH LIMITED) * page 2, ligne 1 - page 5, ligne 37; revendications * ---	1-24	A61K39/00
D,X	JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY vol. 131, no. 1, Octobre 1991, LONDRES, GRANDE BRETAGNE pages R1 - R4 J. PELL ET AL. 'Active immunization with a synthetic peptide region of growth hormone: Increased lean tissue growth.' * abrégé * ---	1,3,5, 7-13	
A	JOURNAL OF DAIRY SCIENCES vol. 72, no. 12, Décembre 1989, URBANA IL, ÉTATS-UNIS pages 3363 - 3371 J. REEVES ET AL. 'Vaccines against endogenous hormones: A possible future tool in animal production.' * abrégé * * page 3368, colonne de gauche, ligne 7 - colonne de droite, ligne 29 * ---	1-24	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5) A61K
A	EP-A-0 272 890 (ELI LILLY AND COMPANY) * le document en entier * -----	1-3,6-9	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 Mars 1994		Nooij, F	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arriére-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 4621
BE 9300778

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

15-03-1994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0405763	02-01-91	AU-A-	5732690	07-01-91
		WO-A-	9015073	13-12-90
		JP-T-	5500206	21-01-93
EP-A-0272890	29-06-88	AU-B-	599180	12-07-90
		AU-A-	8269987	23-06-88
		DE-A-	3780431	20-08-92
		ES-T-	2044958	16-01-94
		JP-A-	63166831	11-07-88
		US-A-	4997825	05-03-91