



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ : A61K 39/106, C07K 15/04, 3/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 87/ 06839 (43) Date de publication internationale: 19 novembre 1987 (19.11.87)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR87/00152 (22) Date de dépôt international: 7 mai 1987 (07.05.87) (31) Numéro de la demande prioritaire: 86/06836 (32) Date de priorité: 13 mai 1986 (13.05.86) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PAS- TEUR VACCINS [FR/FR]; 1, bd. Raymond Poinca- ré, F-92430 Marnes la Coquette (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : GERFAUX, Gé- rard [FR/FR]; 96bis, rue Jean Mermoz, F-92380 Garches (FR). MAZERT, Marie-Christine [FR/FR]; 10, lisière du Golf, F-92380 Garches (FR).		(74) Mandataires: LEMOINE, Michel etc.; Cabinet Le- moine et Bernasconi, 13, bd. des Batignolles, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK, FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), NO, SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec revendications modifiées.</i>
(54) Title: ANTIGENIC FRACTION OBTAINED BY RELEASING IN A CULTURE MEDIUM CHOLERAIC VI- BRIONS, AND VACCINE (54) Titre: FRACTION ANTIGENIQUE DE MILIEU DE CULTURE DE VIBRIONS CHOLERIQUES ET VACCIN (57) Abstract Choleraic vibrios are cultivated in conditions which favour the biosynthesis of surface antigens and the release in a culture medium of a particulate antigenic complex of lipopolysaccharide of smooth character and of proteins of external membrane, and the supernatant, after elimination of bacterial bodies, is subjected to a separation wherein elements having a molecular weight higher than a value of at least 100,000 approximately are recovered. Application to an oral choleraic vaccine. (57) Abrégé On cultive des vibrions cholériques dans des conditions qui favorisent la biosynthèse des antigènes de surface et la libération dans le milieu de culture d'un complexe antigénique particulaire de lipopolysaccharide de caractère lisse et de protéines de membrane externe, et on soumet le surnageant, après élimination des corps bactériens, à une séparation dans laquelle on récupère les éléments possédant un poids moléculaire supérieur à une valeur d'au moins environ 100.000. Ap- plication à un vaccin cholérique oral.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	ML	Mali
AU	Australie	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BE	Belgique	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	IT	Italie	NO	Norvège
BJ	Bénin	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande				

5

10

15

Fraction antigénique de milieu de culture de
vibrions cholérique et vaccin.

20

La présente invention a trait à une nouvelle
fraction antigénique obtenue par libération dans un milieu
de culture de vibrions cholériques pathogènes, et destinée à
25 être utilisée dans la préparation d'un vaccin cholérique
oral.

Elle concerne également le procédé de
préparation d'une telle fraction et le vaccin correspondant.

Le choléra est une maladie qui se caractérise
30 par une diarrhée infectieuse aiguë due à l'entérotoxine du
vibron cholérique et par une déshydratation extrêmement
rapide. Cette maladie, qui sévit principalement dans les
pays pauvres et plus particulièrement en Asie du Sud-Est, au
Bangladesh et dans toute l'Afrique, est souvent mortelle
35 lorsqu'elle atteint des organismes mal nourris et affaiblis.

Le développement des transports et des

échanges interhumains ont facilité ces dernières années la diffusion des vibrions cholériques, créant des foyers secondaires et constituant une menace pour la santé de nombreux pays.

5 On a cherché, depuis, à mettre au point un vaccin qui puisse efficacement protéger contre le choléra et qui soit facile à administrer.

Pendant très longtemps, on a administré par voie parentérale des vaccins constitués de *V. cholerae* tués, sans avoir toutefois de certitude sur l'immunité que de tels
10 vaccins pouvaient apporter.

Des résultats d'études menés au Bengladesh, à Calcutta et aux Philippines et ayant porté sur plusieurs centaines de milliers de sujets ont clairement montré que ce
15 type de vaccin, bien que provoquant une réponse sérologique importante, n'apportait pas une protection suffisante pour pouvoir modifier l'endémicité et l'épidémicité du choléra.

Plus tard, la toxine cholérique ayant été reconnue comme la seule responsable de la maladie, on a
20 espéré pouvoir se protéger contre le choléra, de la même manière que contre la diphtérie ou le tétanos, en vaccinant au moyen d'une anatoxine administrée par voie parentérale. Ce type de vaccination, bien qu'apportant une certaine protection contre le choléra, a été abandonné par suite d'une
25 mauvaise tolérance et d'une durée de protection trop courte.

C'est à la lumière d'études épidémiologiques, mais surtout au vu des résultats obtenus sur volontaires recevant une dose d'épreuve de vibrions cholériques, qu'il est apparu que la maladie elle-même apportait une protection
30 efficace et de longue durée.

Les recherches se sont alors orientées vers la mise au point de vaccins oraux tendant à reproduire la réponse immunitaire obtenue par la maladie, mais en évitant ses effets pathologiques. Ces effets étant strictement
35 limités à la muqueuse de l'intestin grêle, c'est à ce niveau que l'on a cherché à provoquer une réponse immunitaire

capable de s'opposer, soit au développement des vibrions, soit à l'action de l'entérotoxine libérée.

Les vaccins destinés à assurer une neutralisation de la toxine cholérique sont constitués de sous-unités B de cette même toxine (choléragénoïde) ou encore de procholéragénoïde obtenu par chauffage contrôlé de la toxine.

Ceux destinés à empêcher la colonisation de la muqueuse intestinale par le V. cholerae sont constitués de composants antigéniques de vibrions, isolés ou en mélange, tels que flagelle, enzymes extracellulaires, adhésines, lipopolysaccharide, protéines de la membrane externe.

Le brevet français n° 73 03734 décrit un vaccin de ce type constitué d'une fraction antigénique obtenue après lyse d'un culot bactérien dans le but d'en libérer le matériel endocellulaire.

Il a été également proposé des vaccins oraux visant à empêcher la colonisation de la muqueuse intestinale par le V. cholerae, qui sont constitués par des germes tués ou par des germes vivants préparés à partir de mutants, soit hypotoxigéniques (M13), soit produisant une toxine exempte de fragment A et obtenue par clonage après mutation. (Texas-Star SR) ou par des techniques de recombinaison génétique.

Aucun de ces vaccins, toutefois, n'a réussi jusqu'ici à s'imposer, soit en raison de leur mauvaise tolérance, soit parce qu'ils ne confèrent pas une durée de protection suffisamment longue.

Enfin, des vaccins combinant des dérivés de la toxine cholérique avec des constituants membranaires ou des germes entiers tués sont actuellement en développement.

Le demandeur s'est attaché à mettre au point un vaccin cholérique qui soit administrable par voie orale, donc facile à mettre en oeuvre, et qui puisse conférer une protection de longue durée.

Un objectif de l'invention est de proposer

une nouvelle fraction antigénique obtenue par libération dans un milieu de culture de vibrions cholériques pathogènes et qui, lorsqu'elle est administrée par voie orale, est capable d'induire au niveau de l'intestin une réponse
5 immunitaire locale s'opposant à la colonisation ultérieure par les V. cholerae vivants.

Un autre objectif de l'invention est de proposer un procédé de préparation d'une telle fraction vaccinante.

10 Un autre objectif encore de l'invention est de fournir un vaccin cholérique contenant comme principe actif ladite fraction.

Le procédé de préparation de la fraction antigénique conforme à l'invention est caractérisé en ce
15 qu'il consiste :

- à cultiver des vibrions cholériques, de préférence dans un milieu pauvre en éléments nutritifs et exempt de fer, dans des conditions qui favorisent la biosynthèse des antigènes de surface et la libération dans le milieu de cul-
20 ture d'un complexe antigénique particulière de lipopolysaccharide de caractère lisse et de protéines de membrane externe ; et

- à soumettre le surnageant, après élimination des corps bactériens, par exemple par centrifugation, à une
25 séparation dans laquelle on récupère les éléments possédant un poids moléculaire supérieur à une valeur d'au moins 100.000 environ.

La séparation peut, de préférence, comporter une ultrafiltration à un seuil de coupure d'environ 100 000,
30 suivie d'une diafiltration qui élimine tout le matériel provenant de la culture et dont le poids moléculaire est inférieur à environ 100.000.

De préférence, on complète la libération du complexe antigénique par un traitement à la chaleur en
35 présence d'un agent dissociant, tel que l'acide citrique.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré,

dans une étape préliminaire, on prépare des inoculums en culture agitée et en milieu nutritif riche, à partir de souches de *V. cholerae*, de préférence de sérotypes Ogawa et Inaba, choisies parmi les souches pathogènes de caractère lisse.

On ensemence, ensuite, à l'aide de ces inoculums, un milieu pauvre en éléments nutritifs et exempt de fer. Un tel milieu peut être, par exemple, le milieu MSA qui présente, par litre, la composition suivante :

- 10 - Acide glutamique : 1,5 g
- Caséine lactique : 0,8 g
- Proline : 0,18 g
- NaCl : 10 g
- KH₂PO₄ : 0,45 g
- 15 - MgSO₄ : 0,1 g.

La culture est effectuée sous agitation pendant une durée comprise entre 6 et 24 heures et à une température comprise entre 30 et 35°C, le pH étant maintenu au-dessus de 7. En fin de culture, on ajoute un agent dissociant, tel qu'une solution d'acide citrique ou d'acide éthylène-diamine-tétraacétique. On abaisse le pH à environ 6, et on chauffe à une température comprise entre environ 40 et environ 60°C, la culture étant maintenue à cette température pendant environ 15 à 60 minutes.

25 Après refroidissement, on effectue une centrifugation ou une filtration de manière à éliminer les corps bactériens. Le surnageant est ensuite recueilli et filtré sur une membrane de porosité 0,45 μ .

Le filtrat est soumis à une ultrafiltration dans laquelle on ne retient que la fraction possédant un poids moléculaire supérieur à 100 000, qui est ensuite soumise à une diafiltration éliminant le matériel de poids moléculaire inférieur à 100 000.

La fraction recueillie est ensuite lyophilisée. Cette opération s'effectue, en général, en présence d'un adjuvant de lyophilisation tel que le

mannitol.

La fraction lyophilisée constitue le principe actif du vaccin cholérique conforme à l'invention.

Cette fraction antigénique est constituée par
5 un complexe composé de lipopolysaccharide de caractère smooth et de protéines de membrane externe, se présentant sous forme particulière.

La fraction antigénique lyophilisée constituant le principe actif du vaccin conforme à l'invention se
10 caractérise par des propriétés biologiques tout à fait remarquables.

Administrée à l'animal par voie orale, elle provoque :

- l'apparition d'anticorps vibriocides dans le sérum,
- 15 - une protection contre l'infection expérimentale in vivo dans les anses intestinales ligaturées,
- une inhibition de l'adhérence des V. cholerae sur la muqueuse intestinale,
- une inhibition de la colonisation de l'intestin par
20 le V. cholerae,
- une production intestinale d'immunoglobulines spécifiques.

Administrée à la souris par voie parentérale, elle la protège contre l'infection mortelle par le V.
25 cholerae.

Le vaccin cholérique conforme à l'invention se présente, soit sous la forme de comprimés, soit encore sous la forme de microgranules.

Les comprimés sont obtenus en mélangeant le
30 lyophilisat avec un excipient de compression, et sont ensuite enrobés d'une pellicule gastrorésistante.

Dans le cas d'une présentation sous forme de microgranules, le lyophilisat est fixé sur la surface des microgranules par des techniques bien connues de l'homme de
35 l'art. Ces microgranules sont ensuite recouverts d'une pellicule qui leur confère la gastrorésistance et distribués en

gélules.

Cette dernière forme de présentation permet, d'une part, la conservation de toutes les propriétés biologiques du principe actif et, d'autre part, l'administration
5 du vaccin sous forme protégée aux très jeunes enfants.

Selon un perfectionnement particulièrement préféré de l'invention, on peut combiner au principe actif constitué par le complexe antigénique lipopolysaccharidique selon l'invention, un produit constitué de, ou comportant au
10 moins une séquence de la toxine cholérique et notamment de la sous-unité B.

En particulier, le vaccin selon l'invention peut comporter un polypeptide constitué par la séquence 30-50 ou 50-75 ou 30-75 ou encore un mélange de ces différents
15 polypeptides.

Ces polypeptides sont décrits dans la demande de brevet FR-A-82.09167 déposée le 26 mai 1982 au nom de Centre National de la Recherche Scientifique.

Une dose orale peut comporter ainsi au moins
20 10mg de mélange de lyophilisats contenant le complexe antigénique et 50 µg de produit ou de polypeptide précité.

De préférence, du lyophilisat contenant le complexe antigénique est mélangé avec le ou les polypeptide(s) pertinents. Ce mélange est avantageusement
25 transformé en comprimés ou en microgranules gastrorésistants suivant les techniques citées plus haut.

D'autres avantages et particularités de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, donnés à titre purement illustratif, et non limita-
30 tif.

Préparation du complexe lipopolysaccharide-protéines.

On reprend une ampoule contenant sous forme congelée le V. cholerae, sérotype Ogawa, biotype eltor, par 2 à 3 ml de milieu VCM constitué, par litre, de :

35 - Bacto-tryptone (Difco) : 10 g

8

- Extrait de levure : 1 g
- Glucose : 1 g
- NaCl : 5 g
- K₂HPO₄ : 2 g
- 5 - MgSO₄ : 0,1
- le pH étant ajusté à 8,5 avec NaOH.

On ensemence au moyen de cette suspension un flacon de 5 litres contenant 3 litres de milieu VCM et on cultive pendant une nuit sous agitation magnétique, à 20-
10 22°C, à l'abri de la lumière et sous aération constituée par un bullage lent d'air.

Cette culture sert à inoculer un fermenteur de 50 litres contenant 32 litres de milieu VCM. La culture est menée pendant 6 heures à 33-34°C sous agitation suffisante pour obtenir un vortex important.
15

L'aération est apportée à raison de 35 l/h par balayage en surface. Le pH de la culture est maintenu au-dessus de 7,2 par apport de KOH 1 N.

La culture obtenue sert à inoculer un fermenteur de 1500 litres contenant 900 litres de milieu MSA constitué, par litre, de :

- Acide glutamique : 1,5 g
- Caséine lactique : 0,8 g
- Proline : 0,18 g
- 25 - NaCl : 10 g
- KH₂PO₄ : 0,45 g
- MgSO₄ : 0,1 g
- le pH étant ajusté à 8,4 par KOH, et 100 litres de milieu VCM.

30 On cultive pendant 18 heures à une température de l'ordre de 33-34°C, le pH étant maintenu au-dessus de 7,2 par addition de KOH 1 N. L'oxygène dissous est maintenu à 50 % de la saturation par apport d'air en profondeur, et agitation à 750 t/mn. Après ce laps de temps,
35 on ajoute une solution d'acide citrique à 125 g/l jusqu'à ce que le pH de la culture soit abaissé à 6,0 et on élève la

température de la culture à 55°C. On maintient cette température pendant 45 mn puis on refroidit la culture à environ 10°C.

On effectue ensuite immédiatement la centrifugation en continu et sous refroidissement. On recueille le surnageant et on filtre à + 4°C sur membrane de porosité 0,45µ.

L'ultrafiltration-concentration est effectuée sur membrane possédant un point de coupure PM 100 000. On élimine l'ultrafiltrat jusqu'à ce que le volume de la préparation atteigne 10 litres. On y ajoute un même volume de solution de NaCl à 8,5 g/l stérile et on poursuit l'ultrafiltration pour ramener le volume du rétentat à 10 litres.

On répète 5 fois cette dernière opération et on ajuste le volume de préparation à 20 litres au moyen d'une solution de mannitol stérile et de concentration telle que la concentration finale en mannitol soit égale à 20 g/l.

La préparation est ensuite soumise à une lyophilisation en vrac de 48 heures comportant une dessiccation secondaire de 24 heures à 30°C.

On procède, de la même façon, avec le V. cholerae, sérotype Inaba, biotype eltor, et on mélange les lyophilisats obtenus à partir des deux souches.

La présentation du vaccin sous forme de microgranules gastrorésistants se fait par fixation du mélange de lyophilisats à la surface de microgranules neutres de 1 mm de diamètre et essentiellement constitués d'amidon, en utilisant les techniques connues de l'homme de l'art.

Ces microgranules sont ensuite recouverts d'une enveloppe constituée d'acétophtalate de cellulose.

Ils contiennent 50 mg de mélange de lyophilisats par gramme de microgranules terminés.

Caractérisation du complexe lipopolysaccharide-protéines.

Le complexe lipopolysaccharide-protéines libéré dans le milieu de culture se présente sous forme particulaire.

Le caractère particulaire du complexe est mis en évidence par l'examen au microscope électronique.

La préparation se présente sous forme de vésicules de diamètre compris entre 20 et 100 nm après coloration négative au phosphotungstate.

Association lipopolysaccharide-protéines.

Cette association de composants peut être mise en évidence par le fait que ce complexe présente une vitesse de sédimentation et une densité différentes de celles de ses composants isolés.

Une ultracentrifugation de 65 heures à 39.000 t/mn sur un gradient de saccharose 40-60 %, effectuée sur la préparation obtenue comme il a été indiqué plus haut, montre que le complexe possède une densité de flottation de 1,21 alors que le lipopolysaccharide isolé à partir de la même préparation montre une densité de 1,19.

Les vitesses de sédimentation déterminées par ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-15 % sont respectivement de 30 S pour le complexe de lipopolysaccharide-protéines conforme à l'invention et de 20 S pour le lipopolysaccharide extrait de ce complexe.

Cette association lipopolysaccharide-protéines peut être encore mise en évidence par le fait que la dose nécessaire à l'apparition d'un pouvoir vibriocide dans le sérum de lapins ayant reçu la préparation par voie orale est au moins 40 fois inférieure à celle du lipopolysaccharide extrait du V. cholerae.

Nature des constituants

lipopolysaccharide (LPS) du V. cholerae de caractère lisse.

On extrait du complexe lipopolysaccharide-protéines obtenu comme on l'a indiqué plus haut, le lipopolysaccharide par la technique de Westphal et on soumet

celui-ci à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant selon la méthode de Laemmli. Après oxydation par le periodate, les constituants sont révélés par une coloration au nitrate d'argent. Le profil électrophorétique obtenu est caractéristique du LPS de *V. cholerae* de caractère lisse.

On note que les préparations vaccinales contenant du LPS ne présentant pas le profil du caractère smooth ne possèdent pas les activités biologiques recherchées.

protéines de membrane externe du *V. cholerae*.

Ces protéines participent à la réponse immunitaire induite par le complexe lipopolysaccharide-protéines.

Ce rôle des protéines est mis en évidence par les faits suivants :

- la dénaturation des protéines par chauffage, par exemple à une température de l'ordre de 100°C pendant 30 minutes, détruit totalement les propriétés vaccinales,

- administré par voie orale au lapin, le complexe lipopolysaccharide-protéines provoque la sécrétion intestinale d'immunoglobulines spécifiques des protéines entrant dans la composition du complexe.

La mise en évidence de ces immunoglobulines est effectuée par la technique d'"immunoblot" sur les protéines du complexe, après que celles-ci ont été séparées par électrophorèse en gel polyacrylamide mono- ou bidimensionnelle.

On observe, enfin, que le pouvoir vibriocide des sérums de lapins vaccinés par voie orale n'est inhibé qu'en partie seulement lorsque ces sérums sont additionnés de LPS extrait de *V. cholerae*, alors que ce pouvoir vibriocide est totalement inhibé par la présence du complexe.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant des protéines du complexe vaccinant permet

de mettre en évidence une série de polypeptides de poids moléculaires compris entre 25 à 28 000 et 70 000 daltons.

Propriétés biologiques.

Les propriétés biologiques du principe actif
5 ont été mises en évidence par une série d'expérimentations effectuées sur l'animal auquel a été administré soit le principe actif lui-même, soit le vaccin correspondant, et dont les résultats sont rapportés ci-dessous.

A - Pour mettre en évidence les propriétés biologiques
10 du principe actif, on a effectué ces essais :

a) Administré par voie parentérale aux souris, il les protège contre l'infection mortelle par le V. cholerae.

En appliquant les conditions recommandées par
15 l'OMS pour le test de protection de la souris, on constate que le principe actif lyophilisé possède (par mg de lyophilisat) une activité supérieure de 2 à 10 fois celle de la référence.

b) Administré par voie sous-cutanée à des
20 lapins, le principe actif induit une forte réponse en anticorps vibriocides.

On observe qu'après injection d'une quantité de principe actif équivalente au 1/20 de la dose humaine, les titres en anticorps vibriocides sont supérieurs à 50
25 000. Ces titres sont semblables à ceux obtenus par l'injection d'une dose humaine de vaccin composé de germes tués.

c) Administré par voie orale à des lapins, le principe actif sous forme de suspension (c'est-à-dire
30 présenté sous forme non gastrorésistante) induit une apparition d'anticorps vibriocides dans le sérum de ces animaux.

On administre par voie orale à des lapins des doses croissantes en deux prises espacées de 7 jours. Les
35 titres en anticorps vibriocides des sérums recueillis 14 jours après la dernière administration montrent un effet

dose linéaire. A titre de comparaison, l'administration de doses croissantes de LPS extrait de *V. cholerae* induit des anticorps vibriocides, mais à des doses 40 fois supérieures.

B - Administré par voie orale à l'animal, le vaccin
5 provoque :

a) l'apparition d'anticorps vibriocides dans le sérum à des taux élevés.

Des lapins reçoivent 200 mg de microgranules à J 0 et J 7. On a procédé au titrage des anticorps à J 21.

10 On obtient les titres suivants :

lapin n°	Ogawa titre des sérums		Inaba titre des sérums	
	avant immunisation	après immunisation	avant immunisation	après immunisation
15				
6316	<40	30780	<40	40960
6317	<40	15360	<40	20480
6318	<40	20480	<40	20480
6319	<40	20480	<40	20480
6320	<40	20480	<40	5180
6321	<40	81920	<40	20480
20				

b) une protection contre l'infection expérimentale in vivo dans les anses intestinales ligaturées.

On immunise des lapins par une dose humaine
25 de vaccin à J 0 et J 7. Environ 25 jours après, on ligature des anses intestinales dans lesquelles on injecte des doses croissantes de *V. cholerae*. 16 à 18 heures après, les volumes sécrétés sont mesurés. On observe une forte diminution des volumes sécrétés chez les animaux immunisés ; les
30 nombres de germes injectés nécessaires pour obtenir la sécrétion de 1 ml de liquide par cm d'intestin sont respectivement :

animaux témoins 10^5

animaux immunisés 10^9

35 c) un effet anti-adhérence et un effet anti-colonisation de l'intestin par le *V. cholerae*.

14

On administre par voie orale à des lapins 200 mg de microgranules à J 0 et J 7 ; 5 jours après la dernière administration, on opère les animaux et on introduit 10^9 V. cholerae vivants dans leur duodénum après avoir ligaturé l'intestin grêle au niveau du caecum. Après 2 à 3 heures de contact, on retire la ligature. 16 à 18 heures après, on dénombre les V. Cholerae dans l'iléon et le jéjunum. On obtient des résultats significativement différents chez les animaux immunisés et chez les animaux témoins.

10.	lapins	nombre de germes/g d'intestin			
		Ogawa		Inaba	
		iléon	jéjunum	iléon	jéjunum
	témoins	10^8	10^7	10^8	10^7
15	immunisés	10^3	10^2	10^5	10^3

d) production intestinale d'IgA spécifiques.

On administre à des lapins 200 mg de microgranules aux jours J 0, J 7 et J 14. On procède ensuite au titrage des IgA spécifiques présentes dans le liquide intestinal et la muqueuse intestinale, par méthode ELISA.

On utilise le complexe antigénique comme phase solide. Seules les IgA spécifiques présentes dans l'échantillon prélevé se fixent sur cette phase solide et sont révélées au moyen d'anticorps de chèvre anti-IgA de lapin conjugués à la peroxydase.

Après révélation de la réaction enzymatique, on obtient les résultats suivants :

30	lapins	Extrait de muqueuse intestinale	
		dilution 1/20-D.O. mesurée à 425 nm	
		immunisés	témoins
		1,80	0,1.

35

Dosage

Les microgranules, contenant par exemple 50

mg ou plus de mélange de lyophilisats additionné ou non de polypeptide(s) pertinent(s) décrits ci-dessous par g de microgranules, sont conditionnés en gélules gastrorésistantes contenant 200 mg de microgranules.

5 A titre d'exemple, la vaccination peut se faire par absorption d'une gélule à J 0, J 7 et J 14, avec un rappel par exemple entre six mois et un an.

Préparation d'un polypeptide comportant au moins une séquence de la sous-unité B de la toxine
10 cholérique.

La préparation d'un polypeptide constituée par la séquence 30-75 ou 50-75 s'effectue par exemple conformément au procédé décrit dans la demande de brevet FR-A-82.09167 déposée le 26 mai 1982 au nom du Centre
15 National de la Recherche Scientifique.

Préparation d'un vaccin combiné.

On mélange le lyophilisat contenant le complexe antigénique avec le produit ou le(s) polypeptide(s) pertinent(s) dans des proportions, par exemple, de 10mg de
20 lyophilisat pour 50 ug de polypeptide.

La présentation du vaccin sous forme de microgranules gastrorésistants se fait de la même façon que pour le lyophilisat seul.

Ces microgranules contiennent 50mg de lyophilisat +
25 polypeptide(s) par gramme de microgranules terminés.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une fraction antigénique destinée à être utilisée comme principe actif dans un vaccin cholérique oral, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à cultiver des vibrions cholériques dans des conditions qui favorisent la biosynthèse des antigènes de surface et la libération dans le milieu de culture d'un complexe antigénique particulière de lipopolysaccharide de caractère lisse et de protéines de membrane externe, et

- à soumettre le surnageant, après élimination des corps bactériens, à une séparation dans laquelle on récupère les éléments possédant un poids moléculaire supérieur à une valeur d'au moins environ 100.000.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on complète la libération du complexe antigénique par un traitement à la chaleur en présence d'un agent dissociant.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en que l'agent dissociant est de l'acide citrique.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que l'étape de séparation comporte une ultrafiltration à un seuil de coupure d'environ 100 000, suivie d'une diafiltration qui élimine tout le matériel provenant de la culture et dont le poids moléculaire est inférieur à environ 100.000.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on cultive les vibrions dans un milieu pauvre en éléments nutritifs et exempt de fer.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, dans une étape préliminaire, on prépare des inoculums en culture agitée et en milieu nutritif riche, à partir de souches de *V. cholerae* de sérotypes Ogawa et Inaba choisies parmi les souches pathogènes de

caractère lisse et en ce que l'on ensemence ensuite, à l'aide de ces inoculums, un milieu pauvre en éléments nutritifs et exempt de fer.

5 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la culture est effectuée sous agitation pendant une durée comprise entre 6 et 24 heures et à une température comprise entre 30 et 35°C, le pH étant maintenu au-dessus de 7.

10 8. Procédé selon l'une des revendications 3 et 4, caractérisé en ce qu'en fin de culture, on ajoute un agent dissociant, tel qu'une solution d'acide citrique jusqu'à abaissement du pH à environ 6, en ce que l'on chauffe la culture à une température comprise entre 40 et 60°C et en ce que l'on maintient cette température pendant
15 15 à 60 minutes.

9. Fraction antigénique obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

20 10. Fraction antigénique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un complexe particulaire de lipopolysaccharide de *V. cholerae* de caractère smooth et de protéines de membrane externe.

25 11. Fraction antigénique selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisée en ce qu'elle comporte un complexe de lipopolysaccharide de *V. cholerae* de caractère lisse et de protéines de membrane externe qui se présente sous la forme de vésicules de diamètre compris entre 20 et 100 nm.

30 12. Fraction antigénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce que,

- lorsque le complexe est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant les protéines du complexe, celle-ci permet de mettre en évidence une série de polypeptides de poids moléculaire compris entre 25000 et
35 75000 daltons,

- lorsqu'elle est administrée par voie orale à

l'animal, elle provoque l'apparition dans le sérum d'un titre élevé en anticorps vibriocides, elle protège contre l'infection expérimentale dans le test de l'anse ligaturée, elle inhibe l'adhérence des V. cholerae sur la paroi intestinale, elle inhibe la colonisation de l'intestin par les V. cholerae, elle provoque la sécrétion intestinale d'immunoglobulines spécifiques,

- lorsqu'elle est administrée à la souris par voie parentérale, elle protège celle-ci contre l'infection mortelle par le V. cholerae,

- lorsqu'elle est chauffée à une température de l'ordre de 100°C pendant une durée de l'ordre de 30 minutes, elle perd ses propriétés vaccinales.

13. Fraction antigénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisée en ce qu'elle est lyophilisée en présence d'adjuvant de lyophilisation, tel que le mannitol.

14. Application de la fraction antigénique définie dans l'une des revendications 9 à 13 à la préparation d'un vaccin cholérique oral.

15. Vaccin cholérique oral, caractérisé en ce qu'il contient, comme principe actif, un complexe de lipopolysaccharide de V. cholerae de caractère lisse et de protéines de membrane.

16. Vaccin cholérique oral selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué de la fraction de surnageant de culture possédant un poids moléculaire supérieur à 100 000.

17. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 15 et 16, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un comprimé.

18. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 15 et 16, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme de microgranules, recouverts d'une pellicule gastro-résistante et qui peuvent être distribués en gélules.

19. Vaccin cholérique oral selon l'une

quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé en ce qu'il contient en outre au moins un produit ou polypeptide constitué de, ou comportant, au moins une séquence de la toxine cholérique, notamment de la sous-unité B de la tox-

5 ine cholérique.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau International le 11 Septembre 1987 (11.09.87);
revendication 12 modifiée (1 page)]

caractère lisse et en ce que l'on ensemence ensuite, à l'aide de ces inoculums, un milieu pauvre en éléments nutritifs et exempt de fer.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la culture est effectuée sous agitation pendant une durée comprise entre 6 et 24 heures et à une température comprise entre 30 et 35°C, le pH étant maintenu au-dessus de 7.

8. Procédé selon l'une des revendications 3 et 4, caractérisé en ce qu'en fin de culture, on ajoute un agent dissociant, tel qu'une solution d'acide citrique jusqu'à abaissement du pH à environ 6, en ce que l'on chauffe la culture à une température comprise entre 40 et 60°C et en ce que l'on maintient cette température pendant 15 à 60 minutes.

9. Fraction antigénique obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

10. Fraction antigénique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un complexe particulaire de lipopolysaccharide de *V. cholerae* de caractère smooth et de protéines de membrane externe.

11. Fraction antigénique selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisée en ce qu'elle comporte un complexe de lipopolysaccharide de *V. cholerae* de caractère lisse et de protéines de membrane externe qui se présente sous la forme de vésicules de diamètre compris entre 20 et 100 nm.

12. Fraction antigénique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée en ce que,

- lorsque le complexe est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant les protéines du complexe, celle-ci permet de mettre en évidence une série de polypeptides de poids moléculaire compris entre 28000 et 75000 daltons,

- lorsqu'elle est administrée par voie orale à

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 87/00152

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁴ : A 61 K 39/106; C 07 K 15/04; C 07 K 3/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁴	A 61 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	Chemical Abstracts, vol. 100, no. 1, 02 January 1984, (Columbus, Ohio, US), Y. Komagata et al.: "Isolation of pro- tective substances from <i>Vibrio cholerae</i> ", see page 391, abstract 4487v, Tokyo Joshi Ika Daigaku Zasshi 1983, 53(8), 770-7 --	1-19
A	Infection and Immunity, vol. 49, no 1, July 1985, C.V. Sciortino et al.: "Monoclonal antibodies to outer membrane antigens of <i>Vibrio cholerae</i> ", see pages 122-131 see the whole document --	1-19
A	Lancet, no. 8440, June 1985, (London, GB), H. Champsaur et al.: "Induction of <i>Vibrio cholerae</i> specific billiary anti- bodies after oral immunisation with a cholera cell-wall fraction", pages 1276-1277 see the whole document --	1-19
[*] Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
24 July 1987 (24.07.87)		20 August 1987 (20.08.87)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Nature, vol. 292, no. 5822, 30 July-August 1981, Macmillian Journals Ltd., (Chesham, Bucks, GB), J. Holmgren: "Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera", pages 413-417, see page 413, left-hand column, lines 33-50; page 414, right-hand column, line 45 - page 415, left-hand column, line 27 --	1-19
A	Infection and Immunity, vol. 13, no. 3, March 1976, American Society for Microbiology, A.-M. Svennerholm et al.: "Synergistic protective effect in rabbits of immunization with Vibrio cholerae lipopolysaccharide and toxin/toxoid", pages 735-740, see page 735, right-hand column, lines 11-16; page 737, right-hand column, lines 1-9 --	1,9,15
A	Chemical Abstracts, vol. 75, no. 5, 02 August 1971, (Columbus, Ohio, US), J. Holmgren et al.: "Immunochemical studies of two cholera toxin-containing standard culture filtrate preparations of Vibrio cholerae", see page 293, abstract 33342q, Infec. Immunity 1971, 3(6), 747-55 --	1,9
A	FR, A, 2388049 (ANVAR) 17 November 1978 see page 1, lines 5-13, line 35 - page 2, line 17; page 2, lines 31-39; claims 1-7,12,13 --	1,5-7
A	EP, A, 0095426 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, ET INSTITUT PASTEUR) 30 November 1983, see page 1, lines 3-6; claims 1-4 cited in the application -----	1,15,19

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 87/00152 (SA 17163)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 04/08/87

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

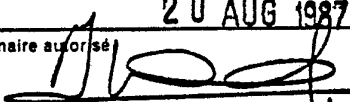
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2388049	17/11/78	None	
EP-A- 0095426	30/11/83	FR-A, B 2527445	02/12/83

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 87/00152

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁴ : A 61 K 39/106; C 07 K 15/04; C 07 K 3/00		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	A 61 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	Chemical Abstracts, volume 100, no. 1, 2 janvier 1984, (Columbus, Ohio, US), Y. Komagata et al.: "Isolation of protective substances from <i>Vibrio cholerae</i> ", voir page 391, résumé 4487v, Tokyo Joshi Ika Daigaku Zasshi 1983, 53(8), 770-7	1-19
A	Infection and Immunity, volume 49, no. 1, juillet 1985, C.V. Sciortino et al.: "Monoclonal antibodies to outer membrane antigens of <i>Vibrio cholerae</i> ", voir pages 122-131 voir le document en entier	1-19
A	Lancet, no. 8440, juin 1985, (Londres, GB), H. Champsaur et al.: "Induction of <i>Vibrio cholerae</i> specific billiary antibodies after oral immunisation with a cholera cell-wall fraction", pages 1276-1277 voir le document en entier	1-19
[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date « L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée « T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention « X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive « Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. « & » document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 juillet 1987		20 AUG 1987
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		Signature du fonctionnaire autorisé M. VAN MOL 

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁴ (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées ¹⁸
A	Nature, volume 292, no. 5822, 30 juillet-août 1981, Macmillan Journals Ltd., (Chesham, Bucks, GB), J. Holmgren: "Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera", pages 413-417 voir page 413, colonne de gauche, lignes 33-50; page 414, colonne de droite, ligne 45 - page 415, colonne de gauche, ligne 27 --	1-19
A	Infection and Immunity, volume 13, no. 3, mars 1976, American Society for Microbiology, A.-M. Svennerholm et al.: "Synergistic protective effect in rabbits of immunization with Vibrio cholerae lipopolysaccharide and toxin/toxoid", pages 735-740 voir page 735, colonne de droite, lignes 11-16; page 737, colonne de droite, lignes 1-9 --	1,9,15
A	Chemical Abstracts, volume 75, no. 5, 2 août 1971, (Columbus, Ohio, US), J. Holmgren et al.: "Immunochemical studies of two cholera toxin-containing standard culture filtrate preparations of Vibrio cholerae", voir page 293, résumé 33342q, Infec. Immunity 1971, 3(6), 747-55 --	1,9
A	FR, A, 2388049 (ANVAR) 17 novembre 1978 voir page 1, lignes 5-13, ligne 35 - page 2, ligne 17; page 2, lignes 31-39; revendications 1-7,12,13 --	1,5-7
A	EP, A, 0095426 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, ET INSTITUT PASTEUR) 30 novembre 1983 voir page 1, lignes 3-6; revendications 1-4 cité dans la demande -----	1,15,19

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 87/00152 (SA 17163)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 04/08/87

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
FR-A- 2388049	17/11/78	Aucun	
EP-A- 0095426	30/11/83	FR-A, B 2527445	02/12/83

Pour tout renseignement concernant cette annexe :
voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82