

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 583 049**

②1 N° d'enregistrement national :

**85 08769**

⑤1 Int Cl<sup>4</sup> : C 07 K 17/08; A 61 K 39/385.

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 10 juin 1985.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 50 du 12 décembre 1986.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : AGENCE NATIONALE DE LA VALORI-  
SATION DE LA RECHERCHE (ANVAR), établissement pu-  
blic. — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Michel Jolivet, Françoise Audibert, Louis  
Chedid et Pierre Lefrancier.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : S. C. Ernest Gutmann, Yves Plasseraud.

⑤4 Produits résultant de la conjugaison d'un support macromoléculaire, d'un haptène et d'un muramyl-peptide par l'intermédiaire d'un groupement substituant la partie saccharidique du muramyl-peptide et compositions sélectivement immunogènes contenant ces produits.

⑤7 L'invention concerne un produit résultant de la conjugaison d'un haptène et d'un muramyl-peptide à un support macromoléculaire, ce produit ayant des propriétés immunogènes sélectives à l'égard d'antigènes ayant en commun un site antigénique ou un épitope en commun avec la partie hapténique entrant dans la constitution de ce produit.

Dans le produit selon l'invention, le muramyl-peptide est lié au support macromoléculaire par l'intermédiaire d'un groupe chimique et via son noyau glucopyranosyle, de préférence en sa position 6.

FR 2 583 049 - A1

Produits résultant de la conjugaison d'un support macromoléculaire, d'un haptène et d'un muramyl-peptide par l'intermédiaire d'un groupement substituant la partie saccharidique du muramyl-peptide et compositions sélectivement immunogènes contenant ces produits.

L'invention est relative à des produits résultant de la conjugaison d'un support macromoléculaire, d'un haptène et d'un muramyl-peptide par l'intermédiaire d'un groupement substituant la partie saccharidique du muramyl-peptide, ces produits présentant des propriétés immunogènes sélectives de la partie hapténique qui entrent dans leur constitution. Elle concerne plus particulièrement encore des compositions immunogènes contenant de tels produits en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable, compositions qui peuvent être utilisées pour la vaccination contre des antigènes possédant un site antigénique ou épitope en commun avec l'haptène.

On connaît l'intérêt porté aux peptides synthétiques, de façon générale à des haptènes de faible poids moléculaire, pour constituer le principe actif de vaccins susceptibles de protéger l'hôte contre l'haptène ou le plus souvent contre un antigène pathogène. Ces haptènes ne présentent pas de pouvoir immunogène sensible, lorsqu'ils sont présentés à l'organisme de l'hôte. Diverses méthodes ont déjà été proposées soit pour conférer, soit renforcer les propriétés immunogènes de tels haptènes, soit encore pour renforcer l'immunogénicité d'antigènes faibles, qu'il s'agisse d'antigènes faibles par nature, ou d'antigènes hautement purifiés dont une partie du pouvoir immunogène a été perdue, notamment au cours des opérations nécessaires à leur purification ou encore de sous-unités dérivées de ces antigènes, ces sous-unités portant cependant encore des sites

antigéniques caractéristiques de ces antigènes.

Il est entendu que l'on donnera dans ce qui suit, une signification extensive au mot "haptène" pour la commodité du langage. Le mot désignera dans ce qui  
5 suit non seulement les haptènes proprement dits, ayant par exemple un poids moléculaire au plus égal à 5 000, mais encore les antigènes faibles dont question ci-dessus. Une solution qui a été envisagée et qui conduit à une forte immunogénicité consiste dans la fixation  
10 (conjugaison ou couplage par covalence) desdits haptènes sur des supports macromoléculaires de poids moléculaires élevés. Les produits de conjugaison ou de couplage ainsi obtenus présentent effectivement souvent une immunogénicité accrue susceptible d'induire in vivo une pro-  
15 duction efficace d'anticorps contre l'haptène présent dans le produit de conjugaison ou même contre des antigènes de poids moléculaires plus élevés ayant un site antigénique ou un épitope en commun avec cet haptène.

Bien que l'on ait déjà proposé de nombreux sup-  
20 ports macromoléculaires susceptibles d'être tolérés par l'organisme, les conjugués ainsi produits présentent cependant un inconvénient important. Ils n'induisent pas seulement une réaction immunitaire in vivo à l'égard de l'haptène, mais également contre le support macromolé-  
25 culaire lui-même. Cet inconvénient peut même présenter un caractère de gravité extrême, lorsque l'hôte a déjà été vacciné contre le support macromoléculaire. Ce cas peut se présenter, notamment lorsque le support macromoléculaire est l'anatoxine tétanique dont est connu  
30 l'effet amplificateur important à l'égard de la réaction immunogène d'haptènes éventuellement greffés sur cette anatoxine. Il a par ailleurs été démontré par des essais réalisés sur l'animal, que l'immunisation contre un haptène couplé à un support macromoléculaire contre lequel  
35 l'animal avait auparavant été immunisé, pouvaient même

entraîner la suppression de la capacité de réponse immunitaire de l'organisme contre l'haptène, au lieu de l'augmenter. Il ne peut donc être envisagé de procéder à des vaccinations mettant en jeu un support macromoléculaire contre lequel le receveur est peut être déjà protégé. Tel serait en particulier le cas avec des produits de conjugaison entre un haptène déterminé et l'anatoxine tétanique, puisque celle-ci est utilisée pour la vaccination d'une partie importante de la population contre le tétanos. C'est l'une des raisons pour lesquelles l'utilisation pour la vaccination, de principes actifs résultant de la conjugaison entre un haptène portant un épitope spécifique d'un agent pathogène contre lequel une protection est recherchée, d'une part, et un support macromoléculaire de poids moléculaire élevé d'autre part, n'a pas été envisagée sérieusement dans la pratique jusqu'à ce jour. C'est aussi l'une des raisons qui a incité les chercheurs à trouver d'autres solutions techniques pour révéler ou accroître l'activité immunogène de tels haptènes, dans des proportions telles que leur utilisation en tant que principe vaccinant puisse être envisagée. Même si des résultats positifs ont été obtenus, il faut reconnaître que la capacité d'amplification recherchée des propriétés immunogènes en cause n'est pas toujours atteint. Même dans les cas les plus favorables, cette amplification n'atteint pas l'importance que l'on a déjà pu observer dans des conjugués formés entre un haptène et un support macromoléculaire de poids moléculaire élevé, tel que l'anatoxine tétanique ou l'anatoxine diphtérique.

L'invention a pour but de remédier en grande partie au moins aux difficultés susceptibles d'être rencontrées dans l'utilisation de produits de conjugaison mettant en jeu un haptène et un support macromoléculaire du type sus-indiqué. Plus particulièrement, l'invention

a pour but de rendre ces produits de conjugaison tels que, tout en possédant un effet immunogène caractéristiques de l'haptène, ils soient en même temps sensiblement dépourvus de cet effet vis-à-vis du support macromoléculaire lui-même. En d'autres termes, l'invention a vocation de fournir des produits de conjugaison de ce type, dans lesquels cette activité immunogène anti-support macromoléculaire est pratiquement supprimée.

Le but de l'invention peut être atteint en ayant recours à des molécules porteuses résultant de la conjugaison du support macromoléculaire choisi à un ou plusieurs groupes muramyl-peptide, par l'intermédiaire d'un groupement chimique jouant le rôle d'un bras, substituant le noyau glucopyranosyle du muramyl-peptide, de préférence sur la position 6 de ce noyau.

Les produits de l'invention consistent donc dans des produits de conjugaison entre les molécules porteuses ainsi formées et l'haptène - ou les haptènes - eux-mêmes porteurs d'un ou plusieurs épitopes contenus dans une molécule, notamment un antigène contre lesquels une protection peut être recherchée.

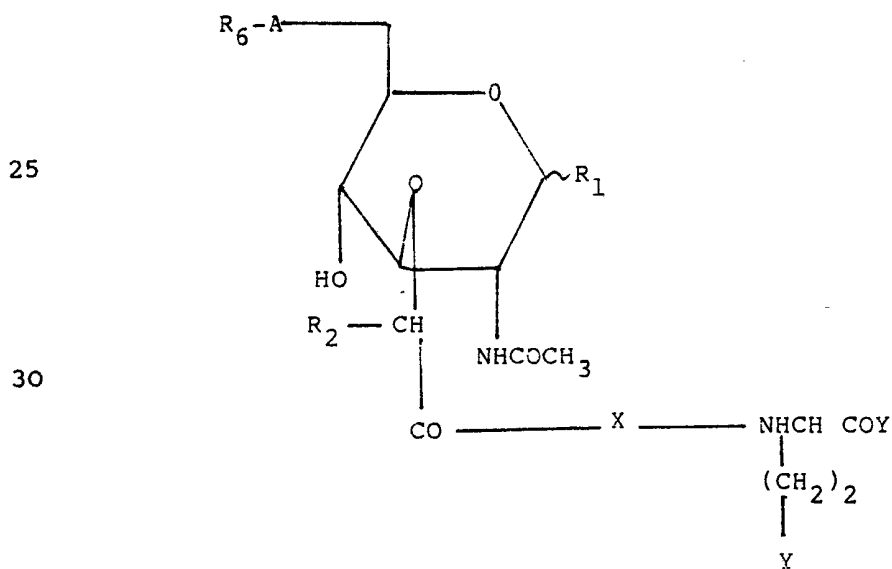
Le produit de l'invention peut donc être caractérisé comme contenant trois principes couplés entre eux par l'intermédiaire de liaisons covalentes, ces trois principes consistant respectivement en un support macromoléculaire, un muramyl-peptide lié à ce support par un groupement chimique via son noyau glucopyranosyle et au moins un haptène portant au moins un épitope responsable de l'activité immunogène recherchée. De préférence, le bras est choisi de façon à conférer, si besoin, des propriétés amphiphiles à l'ensemble bras-muramyl-peptide.

L'expérience a montré que ce produit de triple-conjugaison bénéficie d'une double amplification de l'activité immunogène de l'haptène, en d'autres termes

des amplifications respectivement induites par le muramyl-peptide, dont les activités immuno-adjuvantes sont connues, et par la molécule porteuse, ce produit de triple conjugaison étant cependant sensiblement, sinon  
 5 totalement, dépourvu d'activité immunogène à l'égard du support macromoléculaire ou de la molécule porteuse. Ce dernier effet (suppression ou masquage des propriétés immunogènes propres à la molécule porteuse ou au support macromoléculaire) est particulièrement remarquable, si  
 10 l'on se rappelle les produits de conjugaison décrits à ce jour et formés entre des muramyl-peptides et des supports macromoléculaires de poids moléculaires élevés, possédaient des effets immunogènes non seulement contre l'haptène éventuellement également présent dans le pro-  
 15 duit de conjugaison, mais aussi contre le support macromoléculaire.

Des muramyl-peptides préférés pour la modification recherchée du support macromoléculaire sont représentés par la formule générale suivante :

20



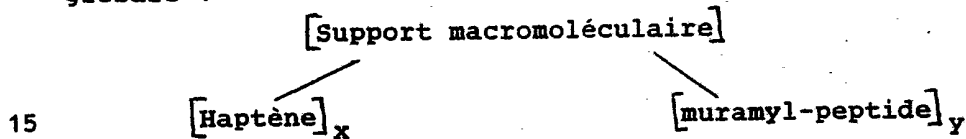
dans laquelle :

- $R_1$  est un groupe OH ou un groupe  $O-C_6H_4-NH_2$  ou  $O-(CH_2)_m-R_a$ , m étant un nombre entier de 1 à 10, et  $R_a$  étant une fonction amine, carboxyle, thiol, hydroxyle ou  
5 un hydrogène,
- A est de l'oxygène ou un groupe NH ;
- $R_6$  est un groupe B-R ou CO-B-R dans lequel B est un groupe ou une chaîne linéaire ou ramifiée pouvant com-  
10 porter jusqu'à environ 100 atomes de carbone et R est un hydroxyle, carboxyle, amine, thiol ou hydrogène, le groupe B étant éventuellement lui-même porteur de un ou plusieurs groupes fonctionnels du type de ceux désignés ci-dessus pour R, ou encore carbonyle, alcoyle ou acy-  
le ;
- 15 -  $R_2$  est un hydrogène ou un groupe alcoyle comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, notamment méthyle ;
- X est un résidu alanyle, arginyle, lysyle, asparagyle, aspartyle, cystéinyle, glutaminyle, glutamyle, glycyle, histidyle, hydroxyprolyle, isoleucyle, leucyle, méthio-  
20 nyle, phénylalanyle, prolyle, séryle, thréonyle, tryptophanyle ou valyle ;
- Y est un groupe OH,  $NH_2$  ou, de préférence,  $OR_7$  ou  $NHR_7$ ,  $R_7$  étant un groupe hydrocarboné pouvant avoir de 1 à 20 atomes de carbone ou pouvant être un acide aminé  
25 tel qu'indiqué pour X, tel qu'alanyle, séryle, valyle ou glycyle, ledit acide aminé étant libre, amidé ou estérifié, le groupe d'estérification pouvant comporter jusqu'à 4 atomes de carbone ;
- Z est un groupe carboxyle, carboxamide, ester compor-  
30 tant de 1 à 10 atomes de carbone, ou encore un groupe alcoyle comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, de préférence  $-CH_2-CH_3$  ou  $-(CH_2)_2-CH_3$  ;  
étant entendu que l'un au moins des groupes  $R_1$  et  $R_6$  (et de préférence  $R_6$ ) possède une fonction réactive permet-  
35 tant sa conjugaison avec une fonction réactive

mentaire portée par une autre molécule, en particulier le support macromoléculaire.

De préférence, dans le triple conjugué selon l'invention, le muramyl-peptide d'une part, l'haptène  
5 d'autre part, sont couplés au support macromoléculaire par l'intermédiaire de groupes fonctionnels distincts initialement présents sur ou portés par le support macromoléculaire.

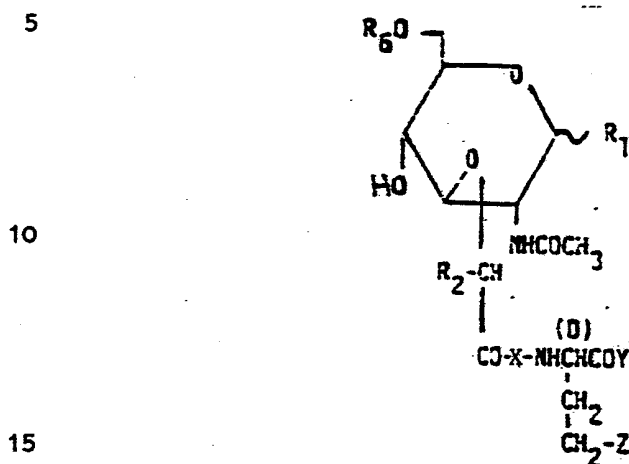
Les "conjugués triples" ainsi obtenus - préférés  
10 vis-à-vis des autres couplages susceptibles d'être imaginés - pourront alors être représentés par la formule globale :



dans laquelle x et y représentent les nombres respectifs de groupes haptène et de groupes muramyl-peptide fixés sur un même support macromoléculaire, étant alors  
20 entendu que la somme x + y ne saurait être plus élevée que le nombre total de groupes fonctionnels initialement portés par le support macromoléculaire de poids moléculaire élevé, dont des exemples seront indiqués plus loin.

25 Ceci étant, on remarquera que ne sont pas exclus de la protection les autres types de conjugaisons qui peuvent être envisagés. Par exemple, il peut être envisagé, si le groupe muramyl-peptide fixé sur le support macromoléculaire porte encore un groupe fonctionnel  
30 libre approprié, de le mettre également en oeuvre dans une opération de conjugaison avec l'haptène. Cependant, les conjugués préférés de l'invention sont ceux dans lesquels le muramyl-peptide et l'haptène sont greffés séparément l'un de l'autre sur le support macromoléculaire.  
35

Un groupe préféré de muramyl-peptides mis en oeuvre dans les "conjugués triples" de l'invention sont caractérisés par la formule suivante :



- $R_1$  est  $-OH$  ou  $-O-C_6H_4-NH_2$  ou  $O-(CH_2)_m-R$  avec  $m$  de 1 à 10 et  $R_a$  étant une fonction amine, carboxyle, thiol, hydroxyle ou un hydrogène ;
- 20 -  $R_2$  est  $-H$  ou  $-CH_3$  ;
- $R_6$  est  $-CO(CH_2)_n-R$  avec  $n$  de 1 à 10 et  $R$  étant une fonction amine, carboxyle, thiol, hydroxyle ou hydrogène ;
- $X$  est Ala, Gly, Ser ou Val ;
- 25 -  $Y$  est  $O(CH_2)_p-H$  avec  $p$  de 1 à 10 ;
- $Z$  est  $CO-NH_2$ ,  $COO(CH_2)_r-H$  ou  $(CH_2)_r-CH_3$  avec  $r$  de 1 à 4.

De préférence, les résidus aminoacide entrant dans la constitution du groupe  $X$  sont levogyres (sauf dans le cas où  $X$  est constitué par un résidu glycyle).

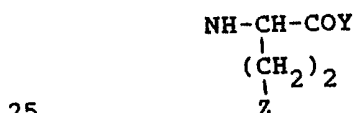
Les muramyl-peptides correspondant à des dérivés du type 2-(2-acétamido-2-désoxy-3-O-D-glucopyranosyl)-alcanoyl-peptides sont suffisamment connus pour qu'il soit inutile d'insister sur leurs modes de préparation.

35 Cependant, comme on l'aura remarqué à la lecture

des significations des groupements appartenant aux muramyl-peptides préférés qui ont été donnés ci-dessus, l'expression muramyl-peptides doit être entendue comme s'étendant aussi à des muramyl-peptides du type 2-(2-acétamido-2-désoxy-3-O-D-gluco-  
 5 cétamido-2-désoxy-3-O-D-gluco-pyranosyl)-alcanoyl-amino-acyl- nor Leucine ou à des dérivés de ces derniers muramyl-peptides.

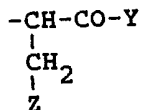
Les composés de ce type, qui peuvent être fabriqués par des procédés tout à fait analogues à ceux qui  
 10 peuvent être mis en oeuvre dans la préparation des dérivés connus du type 2-(2-acétamido-2-désoxy-3-O-D-gluco-pyranosyl)-alcanoyl-peptides, ont été plus particulièrement décrits dans la demande de brevet français 85 06596 déposée le 30 Avril 1985. Le contenu de cette demande de  
 15 brevet doit être considéré comme faisant également partie intégrante de la présente description, pour ce qui est d'éventuels détails relatifs à des modes de préparation préférés de ces composés.

Des muramyl-peptides préférés appartenant à ce  
 20 dernier type de composés préférés sont ceux dans lesquels Y est un groupe OR<sub>7</sub> ou NHR<sub>7</sub>, R<sub>7</sub> ayant la signification sus-indiquée, et dans lesquels le groupe



25 est un dérivé d'un groupe nor Leucine dextrogyre, plus particulièrement d'un groupe D-nor Leucine, dans lequel Z = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>.

Quel que soit le type de muramyl-peptide utilisé, qu'il s'agisse de ceux dans lesquels le groupe  
 30



est dérivé de l'acide glutamique ou de ceux dans lesquels ce même groupe est dérivé de la nor Leucine ou de  
 35

ses homologues, on observera encore que d'autres catégories de composés particulièrement avantageux pour la réalisation des conjugaisons sont ceux dans lesquels A est de l'oxygène et R<sub>6</sub> un groupe  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  tel que le groupe succinyle  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ , ou le groupe  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ , tel que le groupe epsilon-amino-caproyle :  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ , n étant un nombre de 1 à 10.

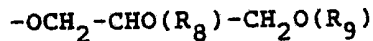
Dans d'autres composés préférés de l'invention, les groupes R<sub>6</sub> contiennent seuls ou en combinaison avec les groupes qui viennent d'être mentionnés, des chaînes linéaires ou ramifiées, dont les maillons sont constitués de chaînes hydrocarbonées, dans lesquelles, le cas échéant, certains des atomes de carbone sont remplacés, de place en place, par des atomes d'azote et/ou d'oxygène, avec notamment pour conséquence la création de fonctions ester, éther, amido, imino, imido, etc.

Parmi les éléments avantageusement contenus dans les chaînes B, on mentionnera des résidus aminoacyle, notamment des chaînons contenant de 1 à 3 résidus aminoacyle successifs, par exemple du type lysyle ou alanyle, (ceux-ci pouvant d'ailleurs être remplacés par tous autres aminoacyles du type indiqué à propos du groupe X), ou encore des éléments glycéryle :  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-$  ou glycolyle :  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$  ou des éléments dérivés du glycérol ou du glycol, des acides glycériques ou glycoliques, par exemple ceux combinant des éléments glycéryle ou glycolyle, d'une part, et des éléments aminoacyle, d'autre part.

D'autres groupes B préférés sont formés par des chaînes telles que ci-dessus définies, elles-mêmes porteuses de ramifications, par exemple par des groupes acylés, notamment des acides gras, lesquels comprennent respectivement notamment de 14 à 30 atomes de carbone, par exemple les groupes palmitoyle.

Ainsi, des groupes B préférés contiennent en

particulier des éléments terminaux représentés par la formule :



dans lesquels  $\text{R}_8$  et  $\text{R}_9$  sont des groupements acyle comprenant de 14 à 30, notamment de 16 à 24, atomes de carbone.

Au titre des muramyl-peptides préférés susceptibles d'être mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention, on mentionnera ceux qui peuvent être désignés par les formules abrégées suivantes (la désignation "MurNac" concernant le groupe N-acétylmuramique) :

- 6-O-epsilon-aminocaproyl-MurNac-L-Ala-D-Gln-OnBu ;
- 6-O-epsilon-aminocaproyl-MurNac-L-Ala-D-Nle-OnBu ;
- 6-O-succinyl-MurNac-L-Ala-D-Gln-OnBu ;
- 15 - 6-O-succinyl-MurNac-L-Ala-D-Nle-OnBu ;

ou encore les dérivés semblables dans lesquels les groupes ester n-butyliques (OnBu) sont remplacés par des groupes ester méthylique (OMe).

Au titre des supports macromoléculaires préférées susceptibles d'être mis en oeuvre dans les "conjugués triples" de l'invention, on mentionnera des molécules naturelles du type sérumalbumine humaine, anatoxines ou autres supports macromoléculaires porteurs ayant des poids moléculaires d'au moins 50 000, par exemple de 50 000 à 250 000 daltons. On peut également avoir recours à des polymères peptidiques synthétiques, du type polylysine ou du genre de ceux décrits dans le brevet européen 13 651.

D'une façon générale, on préfère les supports macromoléculaires constitués par des chaînes peptidiques dont la séquence comporte un grand nombre de groupes fonctionnels latéraux permettant le couplage par covalence, avec les muramyl-peptides particuliers mis en oeuvre dans le cadre de cette invention et/ou avec les haptènes dont l'immunogénicité doit être induite. A cet

égard, les toxines tétaniques et diphtériques sont particulièrement préférées. Par exemple, la toxine tétanique, qui a un poids moléculaire de l'ordre de 160000, porte une cinquantaine de groupes  $\text{NH}_2$  terminaux  
5 libres permettant de fixer un nombre suffisant de groupes haptène et muramyl-peptide. Ces toxines peuvent, après fixation desdits muramyl-peptides et/ou des haptènes, être ensuite aisément détoxifiées, par exemple par un traitement classique par le formaldéhyde.

10 Des conditions dans lesquelles ces conjugaisons peuvent être réalisées, puis les toxines détoxifiées (si nécessaire) sont illustrées plus loin, notamment en rapport avec la fixation sur la toxine tétanique d'un peptide contenant un élément de surface de la protéine  
15 de surface du sporozoïte de Plasmodium knowlesi et de 6-O-epsilon-aminocaproyl-MurNAc-L-Ala-D-Gln-OnBu.

L'invention s'applique enfin à la production de "conjugués triples" faisant intervenir tout haptène comprenant au moins un "site antigénique" utilisable  
20 pour l'induction d'anticorps in vivo, sous réserve qu'il soit conjugué à une molécule amplificatrice de son immunogénicité.

Par "groupe comprenant au moins un site antigénique", il faut entendre tout groupe contenu dans un  
25 antigène à l'égard duquel une production in vivo d'anticorps est recherchée ou tout groupe équivalent sur le plan immunogénique. Au titre des haptènes susceptibles d'être pris en considération dans le cadre de la présente demande de brevet, on mentionnera, par exemple,  
30 ceux qui répondent à la définition qu'en donne la demande de brevet européen 89 290 déposée par l'Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR). Il ne s'agit donc pas seulement d'haptènes porteurs d'un site antigénique qui, lorsque ces haptènes sont couplés à une

molécule amplificatrice, leur confère la capacité d'induire in vivo des anticorps protecteurs contre des agents pathogènes déterminés. L'invention s'étend encore à la fabrication de conjugués triples mettant en jeu  
 5 d'autres haptènes, tels que ceux envisagés dans la demande de brevet européen 89 290, par exemple des hormones.

On mentionnera de façon non limitative parmi les haptènes qui peuvent entrer dans la constitution des  
 10 "conjugués triples" selon l'invention le facteur de libération de la lutéotropine, connue sous la désignation LH-RH, des fragments peptidiques, ou des peptides synthétiques doués de propriétés analogues, par exemple

- des décapeptides du type  
 15  $\text{Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$   
 ou l'acide libre correspondant  
 $\text{pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly}$  ;
- des peptides C-terminaux de la gonadotropine chorionique humaine (hCG) ;
- 20 - des peptides C-terminaux de la sous-unité  $\beta$  de la hCG, notamment un triacontapeptide contenant les résidus aminoacyles correspondant à ceux de l'hCG- $\beta$  ou de dérivés synthétiques terminaux du genre de ceux décrits par S. Matura et coll. (publication déjà mentionnée plus  
 25 haut), des fragments de FSH, etc, ou des peptides consistant essentiellement en les séquences 109-145 et 111-145 des sous-unités C-terminales de hCG- $\beta$  décrites par Arthur C.J. (Lee et coll. dans "Molecular Immunology", vol. 17, p. 749-756). L'invention permet le cou-  
 30 plage de tels fragments hCG- $\beta$  à l'anatoxine tétanique, pour la production de vaccins contraceptifs pour la femme.

La conjugaison des hormones qui précèdent avec les deux autres constituants tels que mentionnés ci-  
 35 dessus, conduit à des principes immunogènes susceptibles

d'induire très efficacement in vivo la production d'anticorps contre les hormones naturelles en question.

On mentionnera encore, à titre d'exemples d'haptènes utilisables dans les conjugués triples selon l'invention, ceux qui mettent en jeu différents peptides synthétiques ayant des séquences de résidus aminoacyle en commun avec les principaux peptides constitutifs de l'antigène HBsAg, notamment ceux dont les aminoacyles d'extrémité correspondent à ceux qui, dans la séquence de HBsAg, occupent les positions suivantes : 48-81 ; 2-16 ; 22-35 ; 95-100 ; 117-137 ; 122-137 ; 117-135 (selon les structures donnée par Pasek et coll. et reproduites dans l'article de Lerner et coll. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, N° 6, 3403-3407. On mentionnera également à titre d'haptènes appropriés les peptides vaccinnants porteurs de sites antigéniques caractéristiques de la toxine diphtérique, des virus de la grippe, de l'herpès, de la poliomyélite, etc.

On citera en outre des peptides synthétiques du genre de ceux décrits par E.H. Beachey et coll. qui sont susceptibles, lorsque couplés avec un muramyl-peptide, de former des anticorps actifs contre la protéine M de la surface de Streptococcus pyogenes, cette protéine étant désignée plus loin dans l'exemple II, sous l'abréviation "M24". On peut également se référer aux séquences peptidiques définies dans le brevet américain 4 284 537, plus particulièrement celles définies sous les abréviations CB<sub>6</sub> et CB<sub>7</sub>.

Des haptènes peptidiques particulièrement préférés sont un ou plusieurs de ceux définis ci-après :

Les haptènes mis en jeu ont été les suivants :

1°) SODP : octodécapeptide contenant une séquence de la "boucle diphtérique" et de formule :

H<sub>2</sub>N-Ala-Ala-cys-Ala-Gly-Asn-Arg-Val-Arg-Arg-Ser-Val-Gly-Ser-Ser-Leu-Lys-Cys.



Enfin, les haptènes susceptibles d'être mis en oeuvre peuvent être constitués par des polypeptides synthétiques ou héli-synthétiques contenant plusieurs sites antigéniques distincts entre eux et aptes à fournir des "polyvaccins". De tels polyvaccins ont été décrits dans la demande de brevet français 84 13989 déposée le 12 5  
Septembre 1984.

Pour mémoire, on rappelle certaines des techniques préférées pour réaliser les conjugaisons entre le support macromoléculaire, d'une part, et le muramyl-peptide et l'haptène, d'autre part. 10

Conformément à une première technique, on peut avoir recours à une réaction de couplage par l'intermédiaire de glutaraldéhyde, dans la mesure où le support macromoléculaire, l'haptène et le muramyl-peptide considéré 15  
comportent tous des fonctions amine.

S'agissant de la conjugaison entre le support macromoléculaire et le muramyl-peptide, on peut avoir recours à toutes formes de couplage mettant en jeu des positions déterminées sur le cycle glucopyranosyle du muramyl-peptide. En particulier, ces liaisons interviendront au niveau de la position en  $C_1$ , de préférence de celle en  $C_6$  du cycle glucopyranosyle du muramyl-peptide. 20

En ce qui concerne les substitutions impliquant le groupement  $R_6$ , on peut avoir recours aux méthodes de couplage couramment utilisées en synthèse peptidique entre les fonctions appropriées portées, d'une part, par le muramyl-peptide et, d'autre part, par le support macromoléculaire, l'un portant par exemple une fonction amine et l'autre une fonction carboxyle, hydroxyle ou sulfhydrile ou vice-versa. 25  
30

Bien entendu, on peut avoir recours à tout autre type de liaison, mettant en jeu les combinaisons pouvant intervenir entre une fonction sulfhydrile portée par 35

l'un des partenaires que constituent le support macromoléculaire et le muramyl-peptide et un groupe maléimide porté par l'autre réactif, par exemple en faisant usage de la technique décrite par T. Kitagawa et T. Aikagawa dans "J. Biochem." 79 (1976), 233.

La conjugaison peut se faire en utilisant les modes classiques de diazotisation ou de réaction mettant en jeu un isothiocyanate, notamment lorsque le muramyl-peptide porte une fonction aromatique aminée (notamment au niveau du groupe  $R_1$ ) et lorsque le support macromoléculaire porte une fonction amine susceptible d'intervenir dans cette réaction. De telles techniques de réalisation sont décrites par exemple par B.F. Erlanger dans "Pharmacol. Rev.", 25 (1973), 271.

Le couplage peut également être réalisé par la réduction d'une base de Schiff réalisée entre une fonction aldéhyde portée par l'un des réactifs et une fonction amine portée par l'autre (G.R. Gray, "Arch. Biochem. Biophys." 163 (1974), 426).

Toutes ces réactions sont en soi bien connues et le spécialiste appréciera que de nombreuses variantes peuvent être aménagées pour aboutir aux mêmes résultats. En ce qui concerne d'ailleurs plus particulièrement des couplages covalents qui mettent en oeuvre le groupe  $R_1$  du muramyl-peptide, on remarquera aussi que les conjugaisons peuvent s'effectuer au moyen d'un pontage, l'agent de pontage consistant par exemple en un réactif bifonctionnel. De préférence, le groupe de pontage entre le muramyl-peptide et le support macromoléculaire dans le conjugué final n'excèdera pas la longueur d'un enchaînement correspondant à celle d'une chaîne hydrocarbonée p-décyclique.

De tels agents de pontage sont par exemple mentionnés dans le brevet 78 16792 déposé le 5 Juin 1978.

Dans ce qui précède, il a surtout été évoqué le

cas du couplage entre le muramyl-peptide choisi et le support macromoléculaire.

Il va de soi que des techniques semblables peuvent être mises en oeuvre pour réaliser le couplage de  
5 l'haptène au support macromolaire ou à la molécule porteuse.

Naturellement, l'ensemble des réactions qui précèdent suppose que les fonctions actives éventuellement portées par les partenaires et qui ne doivent pas participer à la réaction de couplage soient éventuellement  
10 protégées. Il s'agit là de questions bien connues des spécialistes et il n'y a pas lieu d'insister à leur sujet.

Lorsque les haptènes et les muramyl-peptides  
15 sont couplés séparément au support macromoléculaire, les proportions relatives d'haptène et de muramylpeptides seront ajustées en fonction du nombre de groupes fonctionnels libres disponibles sur ledit support macromoléculaire.

L'expérience et les exemples ci-après montrent qu'il n'est pas nécessaire de "saturer" le support macromoléculaire en groupes muramyl-peptides de la catégorie envisagée. On constate en effet que le masquage ou la suppression de la réaction immunogène propre au  
25 support macromoléculaire lui-même est rapidement annihilée. Il y aura par contre généralement avantage à fixer sur le support macromoléculaire - ou sur la chaîne - autant de groupes haptène qu'il est possible, pour obtenir une réaction immunogène maximum spécifique à  
30 l'haptène.

Avantageusement, le nombre de groupes muramyl-peptide par rapport au nombre de chaînes du support macromoléculaire (nombres exprimés en équivalents  $\text{NH}_2$  mis en oeuvre dans la réaction) seront dans un rapport  
35 1:1 et le nombre de groupes haptène par rapport au

nombre de chaînes de support macromoléculaire seront également dans un rapport au moins égal, cependant de préférence supérieur à 1, par exemple de 1 à 5.

Dans ce qui précède, on a surtout évoqué le cas  
5 des fixations distinctes de l'haptène et du muramyl-peptide sur le support macromoléculaire. On peut naturellement aussi envisager d'autres combinaisons, par exemple celles envisagées plus haut, par exemple celles où l'on fixe au support macromoléculaire le muramyl-  
10 peptide au niveau de la position 6 de son noyau saccharidique, puis l'on fixe l'haptène sur la partie peptidique ou, de préférence, la position 1 du noyau saccharidique du muramyl-peptide. On peut également envisager de fixer d'abord l'haptène sur le muramyl-peptide, no-  
15 tamment au niveau de la position 1 du cycle saccharidique de ce dernier, avant que l'intervienne la fixation de l'ensemble sur le support macromoléculaire, par l'intermédiaire de la position en 6 du cycle glucopyranosyle du muramyl-peptide précédemment modifié.

20 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description des exemples qui suivent. Il sera d'abord fourni un exemple particulier de production d'un conjugué triple conforme à l'invention mettant en jeu le 6-O-epsilon-aminocaproyl-  
25 MurNAc-L-Ala-D-Gln-OnBu (encore désigné sous l'abréviation "MDP-6-O-(ε-aminocaproyl)-murabutide" dans les tableaux qui suivent). On exposera ensuite les propriétés biologiques observées avec le conjugué triple obtenu. On indiquera également à titre de comparaison  
30 les propriétés observées avec un "conjugué triple" obtenu avec un muramyl-peptide n'entrant pas dans la catégorie des muramyl-peptides mis en jeu dans le cadre de l'invention, on l'occurrence la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-lysine (MDP-lysine).

I - Procédé d'obtention du conjugué sur toxine téta-  
nique.

La description qui suit s'applique à la fabri-  
cation d'un produit de conjugaison mettant en oeuvre des  
5 proportions particulières des constituants initiaux  
indiqués ci-après. Il va sans dire que la méthode est  
applicable de la même manière à la production de pro-  
duits de triple conjugaison formés à partir de propor-  
tions différentes des constituants initiaux, par exemple  
10 les conjugués A à F mentionnés plus loin.

L'agent couplant est la glutaraldéhyde employée  
à la concentration finale de 5,2 mM. La glutaraldéhyde  
sert à la fois d'agent couplant et détoxifiant lorsque  
la molécule porteuse est la toxine non détoxifiée, ce  
15 qui permet la disponibilité de suffisamment de groupe-  
ments  $\text{NH}_2$  (une cinquantaine pour une molécule ayant  
160000 de poids moléculaire) pour lier suffisamment de  
muramyl-peptide adjuvant et de peptide antigénique (il  
va sans dire que la "détoxification" est superflue  
20 lorsque la molécule porteuse utilisée est elle-même non  
toxique).

Le peptide est, dans cet exemple, un peptide  
copiant un élément de structure de la protéine de sur-  
face du sporozoïte de Plasmodium knowlesi. Sa structure  
25 est décrite dans Godson et coll. (Nature, 1983, 305, 29)  
et son immunogénicité a été étudiée par gysin et coll.  
(J. Exp. Mec., 1984, 160, 935).

La réaction s'effectue en tampon carbonate-bi-  
carbonate de sodium 0,1M pH 8,5. La toxine tétanique  
30 (2,35 mg), le peptide de sporozoïte (3,75 mg) et le  
6-O-( $\epsilon$ -amino-caproyl)-murabutide (2 mg) sont mis en  
solution et le glutaraldéhyde est ajouté sous agitation.  
La réaction dure une semaine et le produit est filtré  
sur tamis moléculaire, notamment celui commercialisé  
35 sous la marque SEPHADEX-G25 de façon à éliminer toutes

les molécules ayant des poids moléculaires inférieurs à 20 000.

Dans le cas du peptide utilisé, il n'y a pas de réaction possible entre le peptide couplé à la toxine  
5 tétanique et le muramyl-peptide, car le peptide ne contient qu'un groupement réactif à ce pH. Si le peptide et l'adjuvant se conjuguent, le produit de la réaction est éliminé à la filtration ; aussi, le seul conjugué possible est le tryptique où le peptide (pep) et le muramyl-  
10 peptide adjuvant (adj) sont liés séparément sur la toxine tétanique (adj-support-pep). Quand le même procédé est mis en oeuvre avec des peptides portant plusieurs groupements fonctionnels, on peut faire réagir le muramyl-peptide seul avec la toxine tétanique pendant  
15 un certain temps, avant d'ajouter le peptide au milieu de réaction, pour favoriser la liaison toxine tétanique-adjuvant par rapport à la liaison peptide-adjuvant susceptible de venir se conjuguer à son tour au support macromoléculaire.

20 Le conjugué finalement obtenu est ensuite soumis aux tests suivants :

a) HPLC. Le poids moléculaire du conjugué recherché correspond à un monomère (entre 150000 et 180000 daltons). Les produits de haut poids moléculaire, s'ils  
25 en sont formés, sont éliminés par gel-filtration sur tamis moléculaire d'agarose réticulée, du type SEPHAROSE 6BCL.

b) Dosage du glycopeptide couplé. Le dosage est effectué par la méthode de Reissig (J. Biol. chem.,  
30 1956, 217, 959). Parmi les rapports expérimentés, le plus favorable a été 2 µg de muramyl-peptide (exprimé en MDP) pour 100 µg de conjugué. Des conjugués dans lesquels la dose de muramyl-peptide était de 1 µg pour 100 µg de conjugué ont permis d'obtenir des résultats  
35 similaires.

c) Antigénicité de la toxine tétanique. Ce contrôle est effectué par la méthode ELISA. La toxine tétanique et les conjugués sont dilués de façon à obtenir 10 µg d'antigène tétanique dans 50 µl. Cinquante microli-  
 5 tres de chaque dilution sont déposés dans les puits de la plaque. Après traitement adéquat pour obtenir la fixation de l'antigène sur les plaques, on dépose une quantité fixe de sérum antitétanique calculée pour avoir une densité optique voisine de 1, après révélation par  
 10 le système anti-anticorps marqués à la peroxydase. Dans l'expérience mise en oeuvre, les chiffres suivants ont été obtenus :

	<u>D.O. obtenue</u>
Toxine tétanique 10 µg	0,715
15 Conjugué contenant 10 µg de toxine tétanique	0,145
Bruit de fond	0,120

Cette expérience montre que la conjugaison du muramyl-peptide et du peptide à la toxine tétanique ont modifié l'antigénicité de celle-ci. Les expériences  
 20 décrites ci-après montrent que ce phénomène a également modifié son immunogénicité, sans affecter ses propriétés de support macromoléculaire.

d) Absence de toxicité. Deux tests ont été pratiqués.

25 L'un de ces tests a permis de montrer que la toxine tétanique a perdu son activité toxique. Dix souris ont reçu chacune une quantité de conjugué correspondant à 10 doses mortelles de toxine tétanique : elles ont été observées une semaine sans manifester  
 30 aucun signe clinique du tétanos.

Le second test a consisté en un essai pyrogène ; il a montré que 1,5 µg de muramyl-peptide conjugué n'a induit, chez aucun des trois lapins testés, d'élévation de température supérieure ou égale à 0,5°C. Rappelons  
 35 que 0,8 µg d'un conjugué de MDP-Lys et de toxine

tétanique, obtenu par couplage dans les mêmes conditions ont provoqué des élévations de température variant de 1,6°C à 2°C. On remarquera que dans ce dernier essai, la conjugaison s'était, par nécessité, effectuée au niveau  
5 du groupe peptidique du muramyl-peptide !

II - Essais biologiques et propriétés comparées de conjugués triples conformes à l'invention et de conjugués triples mettant en oeuvre le même haptène et le même support macromoléculaire, d'une part, et la MDP-lysine  
10 d'autre part.

Par la méthode de production de liaisons covalentes mettant en jeu le glutaraldéhyde dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus, on a produit des conjugués triples mettant en oeuvre des proportions  
15 initiales variables du peptide, de la toxine tétanique et soit du 6-O- $\epsilon$ -aminocaproyl-murabutide (conjugués D, E et F), soit de MDP-lysine (conjugués A, B et C). Les quantités de muramyl-peptide seront exprimées en équivalents MDP-(N-acétyl-muramyl)-L-alanyl-D-isoglutamine).  
20 Il sera également dans ce qui suit fait référence aux équivalents  $\text{NH}_2$ , pour l'appréciation des rapports des différents constituants entrant dans les conjugués triples considérés ci-après.

Les conjugués A et D ont été obtenus à partir de  
25 2,35 mg de toxine tétanique, 3,75 mg du peptide malarique et 2 mg de MDP ; les conjugués B et E ont été obtenus à partir de 2,35 mg de TT ; 7,5 mg de PEP et de 1 mg de MDP ; enfin, les conjugués C et F ont été obtenus à partir de 11,7 mg de TT, 18,75 mg de PEP et 0,5 mg  
30 de MDP. Enfin, notamment pour les besoins des comparaisons, un conjugué PEP-TT a été obtenu en procédant comme décrit plus haut, par la conjugaison de PEP et de toxine tétanique. La toxine a été utilisée comme support, car elle contenait davantage de groupes réactifs  
35 que l'anatoxine.

La détoxification des conjugués obtenus a été réalisée par addition de quantités suffisantes de glutaraldéhyde, puis par incubation pendant 5 jours. Les conjugués obtenus et les proportions relatives de leurs constituants apparaissent dans le tableau I. La détoxification complète de chacun des conjugués a été vérifiée avant utilisation, par injection sous-cutanée à 3 souris d'une dose de conjugué correspondant à la dose double de TT entraînant la mort des animaux. La détoxification a été constatée du fait de l'absence de tout signe de paralysie dans les souris utilisées dans ce test ou dans celles qui ont fait l'objet des essais qui suivent.

Des groupes comprenant chacun 6 souris adultes femelles BALB/c ont été immunisés de façon sous-cutanée avec 50 µg de chacun des conjugués A-C (tableau II) administrés sous forme de solution saline. Un autre groupe a reçu 50 µg du PEP-TT en un mélange avec 100 µg de MDP-lysine au sein d'une solution saline. 6 souris témoins ont reçu 50 µg de PEP-TT en solution saline en l'absence d'adjuvant. Les animaux ont reçu un rappel avec les mêmes antigènes 3 semaines plus tard, puis ont été saignés soit 7 jours, soit 14 jours après le rappel. Dans une deuxième série d'expériences, les animaux ont été immunisés avec 50 µg des conjugués D-F (tableau I) au sein d'une solution saline ou avec 50 µg de PEP-TT en mélange avec 100 µg de 6-O-aminocaproyl-murabutide au sein d'une solution saline. Des souris témoins ont reçu 50 µg de PEP-TT sans l'adjuvant.

Les animaux ont été saignés 2 semaines après les immunisations primaires. Au jour 25, ils ont reçu une injection de rappel. Enfin, des prélèvements de sang ont été faits après des délais respectivement de 7, 14 et 123 jours après le rappel. Les sérums prélevés chez les animaux dans chacun des groupes considérés ont été

réunis et testés pour leurs capacités à induire la production in vivo d'anticorps anti-peptide et anti-tétanique dans des essais de diagnostic mettant en jeu la méthode ELISA. La protéine native a été reconnue par des anticorps anti-peptide dans des radio-immuno-essais (de l'anglais radio-immuno-assay : RIA) en utilisant des extraits sporozoïte fixés sur des plaques plastiques, selon la méthode de Vanderberg et coll., 1969, et par des essais mettant en jeu des anticorps et une fluorescence indirecte (indirect fluorescence antibody test: IFA) selon la méthode Gvadz et coll., 1979. La réaction des circumsporozoïtes (CSP) selon Nordin et coll., 1979, a été utilisée pour tester l'activité biologique des anticorps anti-PEP.

15 Production d'anticorps in vitro.

Des cellules spléniques ont été obtenus à partir de souris. Ces cellules, obtenues dans des conditions aseptiques, ont été lavées et suspendues à une concentration de  $10^7$  cellules/ml dans le milieu connu sous la désignation RPMI 1640 fabriqué par la Société SEROMED, contenant 2 g/l de  $\text{NaHCO}_3$  de la glutamine (2 mM), 100 unités/ml de pénicilline, 100  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine, 5% de sérum de veau foetal et du 2-mercaptoéthanol ( $2 \times 10^{-5}\text{M}$ ). les suspensions ont été réparties en portions aliquotes de 100  $\mu\text{l}$ . Celles-ci ont été placées dans les puits de plaques pour cultures de tissus à 96 puits (Costar). 20  $\mu\text{l}$  de TT ou de PEP-TT ont été ajoutés dans chacun des puits à raison de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Les volumes finaux dans chacun des puits ont été ajustés à 0,2 ml.

30 Les puits témoins ne recevaient pas d'antigène. Les plaques ont été incubées dans une atmosphère contenant 10 % de  $\text{CO}_2$  et 90 % d'oxygène à 37°C. Au 4ème jour, les plaques ont été lavées pour éliminer l'antigène. 6 jours plus tard, les surnageants ont été recueillis et testés

35 pour leur teneur en anticorps par la méthode ELISA.

Les résultats suivants ont ainsi pu être observés.

Réponse in vivo exprimée en quantité d'anticorps produits à des conjugués ayant des taux de substitution variables en PEP, TT et MDP-lysine.

Les résultats du tableau II font apparaître que les titres en anticorps produits à l'égard tant du peptide que de TT varient dans certaines proportions selon les taux de peptide et d'adjuvant fixés sur TT. Ce sont les souris qui ont été immunisées avec le conjugué qui contenait la plus forte teneur en peptide qui ont manifesté la plus forte réponse anti-PEP. L'accroissement du taux de substitution de MDP-lysine ne s'est pas manifesté par une réponse concomitante anti-PEP plus élevée ; par contre, l'augmentation du taux de substitution en MDP-lysine s'est manifestée par une réponse anti-TT élevée. Les mélanges de MDP-lysine avec le PEP-TT ont entraîné un léger accroissement de la réponse en anticorps anti-PEP vis-à-vis des témoins ; un fort accroissement de la réponse en anticorps a cependant été observé lorsque l'adjuvant a été conjugué à TT. On a également observé des titres anti-TT plus élevés que chez les témoins, dans ceux des groupes qui avaient été traités avec le MDP-lysine (groupe 3). Ce résultat signifie clairement que la conjugaison de l'adjuvant à PEP-TT se manifeste par un accroissement des réponses tant à l'égard du peptide que du support.

Réponse in vivo en anticorps à l'égard de conjugués contenant le 6-O- $\epsilon$ -amino-caproyl-murabutide.

Deux essais ont été réalisés avec ces derniers types de conjugués. Des résultats représentatifs de ces essais sont montrés dans le tableau III. On remarque que tous les groupes ayant reçu les adjuvants ont manifesté des réponses immunitaires approximativement équivalentes 15 jours après le rappel, et ce indépendamment de la

conjugaison ou de la non-conjugaison de l'adjuvant avec PEP-TT. Cette équivalence a été observée malgré le fait que les conjugués D-F ne contenaient respectivement que 1,0 µg, 0,6 µg et 0,3 µg d'adjuvant par 50 µg de conjugué. Il résulte des observations qui ont été faites que des conjugués contenant 100 fois moins de l'adjuvant induisent des réponses en anticorps anti-peptide du même ordre de grandeur que les mélanges mettant en oeuvre le muramyl-peptide non combiné par covalence avec l'anti-gène. Un contraste manifeste a cependant été observé au niveau des réponses primaires anti-tétaniques. Ceux des animaux qui avaient reçu les conjugués n'ont conduit qu'à des réponses très faibles (titres inférieurs à 400) tandis que ceux qui avaient reçu PEP-TT seul ou en mélange avec l'adjuvant ont conduit à l'observation de titres 8-40 fois supérieurs.

Les différences entre les réponses anti-support qui pouvaient être observées entre les groupes 1-2 d'une part, et les groupes 3-5 d'autre part ont même été davantage prononcées postérieurement aux rappels (aux jours 32 et 39). Des groupes traités avec le conjugué, c'est le groupe 5 qui avait été traité avec le conjugué contenant les plus faibles proportions d'adjuvant qui a manifesté des réponses en anticorps anti-TT les plus élevées. La production en anticorps anti-TT fortement favorisée chez les animaux qui avaient reçu l'adjuvant sous forme associée (et non conjuguée) aux autres constituants du conjugué pouvait encore être observée 123 jours après l'injection de rappel.

Les observations suivantes ont été faites au niveau des réponses anti-peptide. On a observé chez les animaux traités avec les conjugués D et E des réponses un peu plus élevées que celles constatées chez ceux des animaux qui avaient été traités avec PEP-TT en mélange avec l'adjuvant. Il a été constaté une activité

adjuvante relativement faible chez ceux des animaux qui avaient reçu le conjugué F, donc celui dont les teneurs en adjuvant étaient initialement faibles. Ces résultats semblent indiquer que la dose d'adjuvant utilisée  
5 (0,3 µg/souris/injection) était à la limite des quantités minima nécessaires pour induire une réponse anti-peptide.

L'ensemble de ces résultats montre néanmoins que les groupements adjuvants amphiphiles exposés à la sur-  
10 face du support, et ce après conjugaison de la molécule porteuse ainsi formée avec le peptide, jouent un rôle important au niveau de l'induction de la production d'anticorps anti-PEP et anti-TT respectivement.

Des observations semblables ont été faites au  
15 jour 32 dans ceux des animaux dont la réactivité a été testée par RIA en mettant en oeuvre la protéine circumsporozoïte naturelle, dans les plaques en plastique revêtues avec des extraits de sporozoïtes et d'adjuvant incomplet de Freund. Les activités biologiques, mesurées  
20 par CSP ont également été mesurées. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau IV. Des titres élevés ont été observés dans les sérums provenant de tous les groupes, que ce soit dans ceux qui avaient reçu PEP-TT en mélange avec l'adjuvant ou chez ceux qui avaient été  
25 traités avec le conjugué triple. Cependant, ce sont les animaux traités avec le conjugué D qui ont conduit aux titres les plus élevés (aussi bien dans les tests IFA que CSP). Ces résultats démontrent que ce sont les conjugués qui non seulement reconnaissent le parasite  
30 dans sa forme tridimensionnelle, mais encore entraînent une régression de la protéine circumsporozoïte des parasites vivants.

Production d'anticorps in vitro par des cellules splé-  
niques de souris, au contact d'un conjugué  
35 PEP-TT-6-O-(ε-amino-caproyl)-murabutide.

La capacité des cellules spléniques de souris de produire des anticorps anti-TT in vitro comme suite à une stimulation avec PEP-TT ou du TT libre a été testée, en raison du taux particulièrement faible des anticorps  
5 circulants anti-TT chez ces animaux, lorsque ceux-ci avaient été traités avec des conjugués contenant le murabutide. Les résultats sont montrés dans le tableau V. Les surnageants de ces cultures ont été testés dans le système ELISA. Ils révèlent que seules les cellules  
10 spléniques des groupes 4 et 5 ont fabriqué des anticorps anti-TT, après avoir été stimulées soit avec TT, soit avec PEP-TT in vitro. Au contraire, tous les groupes expérimentaux se sont révélés produire des anticorps anti-peptide, lorsqu'ils ont été stimulés in vitro avec  
15 PEP-TT. Des anticorps anti-PEP n'ont pas été détectés dans des surnageants de cellules spléniques d'animaux témoins (groupe 1), peut-être parce que la population des cellules productrices d'anticorps anti-PEP au sein de la rate des animaux n'ayant pas reçu l'adjuvant était  
20 trop faible pour être détectée. Ces résultats démontrent que la conjugaison du 6-O-( $\epsilon$ -amino-caproyl)-murabutide au PEP-TT conduit à une stimulation moins efficace à l'égard du support macromoléculaire TT que ne le fait un mélange du support macromoléculaire agissant en tant  
25 qu'antigène avec l'adjuvant. Cette différence peut être due à des modifications introduites dans les déterminants de TT ou au fait que ces déterminants ont été rendus inaccessibles au système immunitaire, d'où l'immunogénicité réduite observée.

30 Les essais qui précèdent appellent les observations suivantes.

Des différences considérables ont été observées dans les essais d'adjuvantité in vivo effectués avec des conjugués triples contenant les mêmes supports

macromoléculaires et peptides, par contre, des muramyl-peptides différents, notamment le 6-O-( $\epsilon$ -amino-caproyl)-murabutide et le MDP-lysine respectivement. Dans le cas du dernier adjuvant, l'accroissement de la proportion d'adjuvant dans le conjugué a également entraîné l'accroissement de la réponse anti-support macromoléculaire. Au contraire, lorsque le muramyl-peptide entrant dans la constitution du conjugué était le 6-O-( $\epsilon$ -amino-caproyl)-murabutide amphiphilique, la réponse en anticorps anti-TT n'a guère été augmentée. Cependant, des sérums de souris traitées avec le conjugué contenant le plus d'adjuvant ont aussi donné les titres les plus élevés en anticorps reconnaissant le peptide et la protéine native. Ces derniers types de conjugués ont également provoqué une réaction CSP. Celle-ci est corrélable au degré de protection qui peut être observé chez les souris et les singes. En conséquence, les doses faibles de 6-O-( $\epsilon$ -amino-caproyl)-murabutide conjugué à PEP-TT se sont révélées induire une réponse en anticorps protecteurs nettement plus élevée que celle qui peut être obtenue avec les doses du même adjuvant en l'absence de conjugaison ou avec le MDP-lysine.

Les sérums de souris traitées avec les conjugués contenant le murabutide se sont révélés avoir des titres d'anticorps anti-TT beaucoup plus faibles que les sérums des animaux qui avaient reçu PEP-TT (en l'absence du muramyl-peptide). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette réponse réduite. Selon une première hypothèse, l'utilisation des muramyl-peptides particuliers entrant dans le cadre de l'invention a introduit des changements conformationnels du support macromoléculaire à l'occasion de sa conjugaison avec le peptide et l'adjuvant. Selon une seconde hypothèse, l'antigénicité du support macromoléculaire a été

modifiée par masquage de ses déterminants, ceux-ci étant alors rendus inaccessibles aux cellules du système immunitaire.

Le couplage du 6-O-( $\epsilon$ -amino-caproyl)-murabutide à la toxine tétanique rend peut-être l'anatoxine suffisamment hydrophobe pour qu'elle soit légèrement masquée à l'égard du système immunitaire, tandis qu'au contraire le peptide est davantage exposé et sensible à l'action adjuvante du muramyl-peptide. C'est peut-être en raison du caractère hydrophile du MDP-lysine que l'effet adjuvant à l'égard de la toxine s'ajoute à l'effet adjuvant observable à l'égard du peptide.

Enfin, les essais de production d'anticorps in vitro ont été choisis de façon à déterminer si des cellules de souris qui avaient été stimulés avec les conjugués pourraient être également stimulés in vitro par PEP-TT ou TT et par conséquent pour déterminer dans quelle mesure les déterminants de l'anatoxine tétanique étaient exprimés au sein des conjugués. Les résultats montrent clairement que les cellules des groupes traités avec le conjugué ne donnent que de faibles réponses, sinon une absence de réponse à TT, que celui-ci soit utilisé à l'état libre ou à l'état conjugué au peptide. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'antigénicité de TT au sein des conjugués triples a été modifiée. Par contre, les réponses anti-peptide in vivo sont approximativement les mêmes dans les groupes 1-4 (tableau II), un peu plus faibles pour les animaux du groupe 5. En outre, des cellules de tous ces groupes formaient des anticorps anti-peptide in vitro, après stimulation avec PEP-TT. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'absence de production d'anticorps anti-TT in vitro par les cellules des groupes 1-3, était due à une altération des déterminants antigéniques du support macromoléculaire ou à leur masquage, au cours de la stimulation

in vivo. Enfin, les essais démontrent encore que la production d'anticorps anti-peptide peut être fortement stimulée par l'utilisation de conjugués conformes à l'invention, même lorsque ceux-ci ne contiennent que des proportions relativement faibles des muramyl-peptides particuliers envisagés.

Il résulte des essais qui précèdent que les conjugués triples selon l'invention ont une immunogénicité spécifiquement dirigée contre l'haptène.

10 L'invention concerne donc également des compositions pharmaceutiques dans lesquelles les conjugués triples sus-définis sont associés à un véhicule physiologiquement acceptable.

Des compositions pharmaceutiques avantageuses sont constituées par des solutions injectables contenant une dose efficace d'au moins un conjugué triple selon l'invention. De préférence, ces solutions sont réalisées dans une phase aqueuse stérilisée isotonique, de préférence saline ou glucosée. L'invention concerne également des compositions dans lesquelles ces conjugués triples sont encapsulés dans des liposomes aptes à former des suspensions injectables.

L'invention concerne plus particulièrement de telles solutions ou suspensions qui sont aptes à être administrées par injections intradermiques, intramusculaires ou sous-cutanées, intraveineuses ou encore par scarifications.

L'invention concerne aussi des compositions pharmaceutiques, administrables par d'autres voies, notamment par voie orale ou rectale, ou encore sous des formes destinées à venir en contact avec des muqueuses, notamment les muqueuses oculaires, nasales, pulmonaires ou vaginales.

En conséquence, elle concerne des compositions pharmaceutiques dans lesquelles l'un au moins des

conjugués triples selon l'invention se trouve associé à des excipients pharmaceutiquement acceptables, solides ou liquides, adaptés à la constitution de formes d'administration orales, oculaires ou nasales, ou à des excipients adaptés à la constitution de formes d'administration rectale. Elle concerne aussi des compositions destinées à la voie pulmonaire, notamment des solutions préparées en vue de l'administration au moyen d'un appareil d'aérosols classique.

10 A titre d'exemples de doses susceptibles d'être administrées, pour stimuler les réponses immunitaires de l'hôte contre des antigènes déterminés, on mentionnera des doses, en microgrammes par kg de corps, par exemple de 50 à 1000, de préférence de 100 à 300,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , lorsque  
15 l'administration est effectuée par voie parentérale, ou de 0,5 à 10 mg/kg par voie orale.

Des compositions vaccinales préférées selon l'invention contiennent en outre un véhicule, tel que la polyvinylpyrrolidone, facilitant l'administration du  
20 vaccin. A la place de la polyvinylpyrrolidone, on peut utiliser tout autre type d'adjuvant au sens classique que l'on donnait autrefois à cette expression, c'est-à-dire d'une substance permettant l'absorption plus aisée d'un médicament ou facilitant son action dans l'orga-  
25 nisme. A titre d'exemples d'autres adjuvants de ce dernier type, on mentionnera encore la carboxyméthylcellulose, les hydroxydes et phosphates d'aluminium ou tous autres adjuvants de ce type, bien connus de l'homme de l'art.

30 Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont donc essentiellement destinées à induire chez l'hôte une réaction immunitaire, lui permettant de produire des anticorps ou une immunité à médiation cellulaire à l'égard d'un antigène contenant le site antigé-  
35 nique spécifiquement porté par l'haptène entrant dans le

conjugué triple selon l'invention.

L'invention concerne aussi plus particulièrement un autre type de compositions pharmaceutiques utiles en thérapeutique humaine ou vétérinaire, chaque fois qu'est  
5 recherchée une modification de l'évolution ou du comportement de l'organisme humain ou animal, par exemple au niveau de la fécondité de l'espèce ou de l'orientation dirigée de son métabolisme vers la suppression de certaines hormones. Dans des cas préférés de ce dernier  
10 type, l'haptène entrant dans le conjugué mis en oeuvre est constitué par l'hormone elle-même ou un fragment de celle-ci.

Dans le domaine vétérinaire, on citera en outre la production accrue de certains constituants, au détriment  
15 d'autres constituants. On citera par exemple les applications des vaccins vétérinaires administrés dans le but d'accroître chez l'animal la production de viande par castration immunologique.

L'invention a en particulier pour objet des compositions vétérinaires contenant des doses efficaces des  
20 susdits conjugués triples, dans lesquels l'haptène lui-même est constitué soit par l'hormone elle-même, soit par une séquence peptidique ayant une partie commune avec l'hormone, l'hormone appartenant à la classe des  
25 hormones peptidiques ou glycopeptidiques. Une hormone particulièrement intéressante à cet égard est constituée par le facteur de libération de l'hormone lutéostimulante LH-RH.

Des doses unitaires efficaces de ces conjugués  
30 sont, à titre d'exemples, comprises entre environ 50 et 1000, de préférence de 100 à 300,  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de corps, lorsqu'ils sont administrés par voie parentérale, et entre environ 0,5 et 10  $\text{mg}/\text{kg}$  lorsqu'ils sont administrés par  
voie orale.

L'invention concerne également encore des réactifs biologiques essentiellement formés à partir de ces conjugués triples. En particulier, la partie hapténique peut être constituée par un principe actif de médicament ou de drogue (par exemple la morphine) ou encore le produit d'expression d'un oncogène. Ces réactifs biologiques peuvent alors être utilisés pour fabriquer des anticorps, notamment d'anticorps monovalents ou monoclonaux. Ces anticorps sont alors à leur tour utiles pour la constitution de réactifs permettant par exemple l'étude de l'action de médicaments en cause sur l'hôte vivant. En particulier, ces anticorps permettront la détection de récepteurs cellulaires, ou encore l'étude du métabolisme et du mode d'action des médicaments en cause.

Comme il va de soi, et comme il résulte de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de réalisation plus spécialement indiqués, elle en embrasse, au contraire, toutes les variantes, notamment celles où le muramyl-peptide entrant dans les conjugués triples de l'invention porterait des substituants distincts de ceux qui ont été indiqués, dans la mesure où ces substituants n'entraîneraient cependant pas de modification du comportement sus-indiqué du muramyl-peptide ainsi modifié à l'intérieur des conjugués triples ici considérés.

On remarquera encore que les contenus des documents et brevets mentionnés dans la présente demande sont considérés comme appartenant à la description de cette dernière.

TABLEAU I

Conjugué	Dose/ souris	Equivalents NH <sub>2</sub> toxine: pep:adjuvant	Adjuvant utilisé (do- se/souris/injection)
A		1 : 1 : 2	MDP-lysine (1 µg)
B		1 : 2 : 1	MDP-lysine (0,6 µg)
C		1 : 1 : 0,5	MDP-lysine (0,3 µg)
D		1 : 1 : 2	6-O-(ε-amino-ca- proyl)murabutide (1 µg)
E		1 : 2 : 1	6-O-(ε-amino-ca- proyl)-murabudiee (0,6 µg)
F		1 : 1 : 0,5	6-O-(ε-amino-ca- proyl)-murabutide (0,3 µg)

T A B L E A U    II

Effet sur les réponses anti-peptide et anti-support de différents rapports de substitution entre le peptide malarique et la MDP-lysine sur l'anatoxine tétanique.

Conjugué	Groupe	Equivalents NH <sub>2</sub> toxine:pep:MDP-lysine	J 28		J 35	
			anti-pep	anti-TT	anti-pep	anti-TT
A B C	1	pep-TT + solution saline	3,17	1,5	4,32	1,19
	2	pep-TT + MDP-lysine	5,3	1,3	8,6	0,92
	3	1 : 1 : 2	14	13	12,3	6
	4	1 : 2 : 1	38	3,8	22	3,1100
	5	1 : 1 : 0,5	10,8	4,48	9	1,42

Valeurs exprimées en titres de sérum donnant une D.O. de 2 x bruit de fond x 10<sup>4</sup> dans un essai ELISA.

## T A B L E A U III

Effet de différents rapports de substitution de l'anatoxine tétanique, du peptide malarique et de l'adjuvant sur les réponses anti-anatoxine tétanique et anti-peptide.

Conjugué	Groupe	Equivalents NH <sub>2</sub> TT:pep:adjuvant	J 14		J 32		J 39		J 123	
			pep	TT	pep	TT	pep	TT	pep	TT
	1	pep-TT en solution saline	0,28	1,22	1,06	24,6	11,1	33,8	3,9	4,60
	2	pep-TT + adjuvant (100 µg)	0,80	1,66	29,8	39,7	26,0	34,2	10,7	7,40
D	3	1 : 1 : 2	0,83	<0,04	19,6	1,15	45,5	1,45	9,30	0,160
E	4	1 : 2 : 1	1,15	<0,04	14,5	2,55	35,9	2,86	10,5	0,340
F	5	1 : 1 : 0,5	1,00	0,14	8,85	5,70	17,7	5,90	7,46	0,80

Valeurs exprimées en titres de sérum donnant une D.O. de 2 x bruit de fond x 10<sup>4</sup> dans un essai ELISA.

T A B L E A U IV

Reconnaissance du peptide et de la protéine native par des anticorps anti-peptide.

Groupe	Equivalents NH <sub>2</sub> anatoxine:peptide: adjuvant	ELISA		RIA SPZ	IFA	CSP
		anti-pep	anti-TT			
1	pep-TT en solu- tion saline	10 600	246 000	320	2 500	< 5
2	pep-TT + murabu- tide	298 000	397 000	20 000	20 000	10
3	1 : 1 : 2	196 000	11 500	2 500	41 000	40
4	1 : 2 : 1	145 000	25 500	1 280	10 000	< 5
5	1 : 1 : 0,5	88 500	57 000	2 500	5 000	< 5

T A B L E A U V

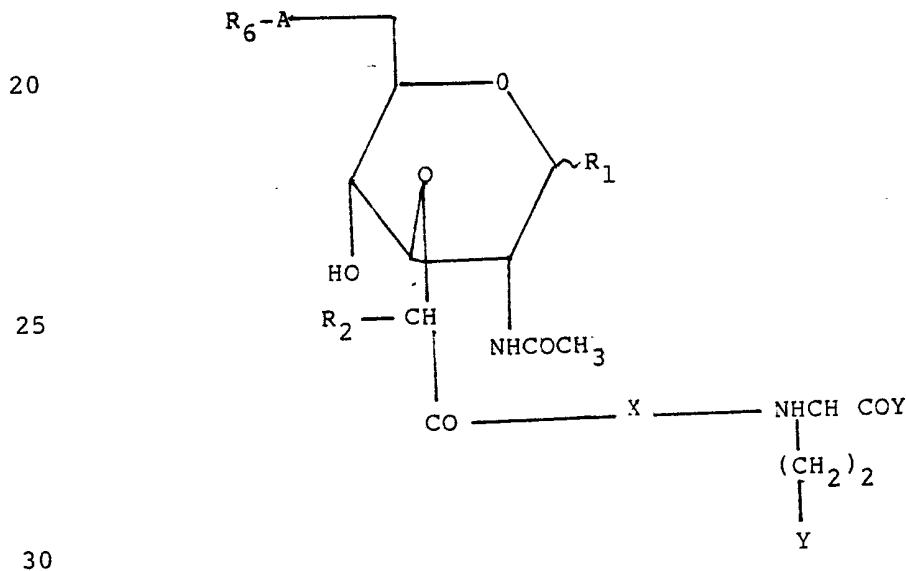
Stimulation in vitro avec :	Groupe 1 pep-TT en solu- tion saline anti-pep		Groupe 2 pep-TT + adjuvant a-pep		Groupe 3 Conjugué D a-pep		Groupe 4 Conjugué E a-pep		Groupe 5 Conjugué F a-pep		Groupe 6 TT + solu- tion saline a-pep	
	anti-TT		a-pep	a-TT	a-pep	a-TT	a-pep	a-TT	a-pep	a-TT	a-pep	a-TT
pep-TT	0	0,625	1,344	1,05	0,833	0	0,43	0	> 2	0	0	0,625
TT	-	0	-	0	-	0	-	> 2	-	> 2	-	> 2

REVENDEICATIONS

1. Produit caractérisé par la conjugaison de trois principes entre eux, ces trois principes consistant respectivement en un support macromoléculaire, un muramyl-peptide lié à ce support par un groupement chimique via son noyau glucopyranosyle, et au moins un haptène portant au moins un épitope responsable de l'activité immunogène recherchée.

2. Produit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le muramyl-peptide d'une part, l'haptène d'autre part, sont couplés au support macromoléculaire par l'intermédiaire de groupes fonctionnels distincts initialement présents sur ou portés par le support macromoléculaire.

3. Produit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le muramyl-peptide entrant dans la constitution de ce produit peut être représenté par la formule générale suivante :

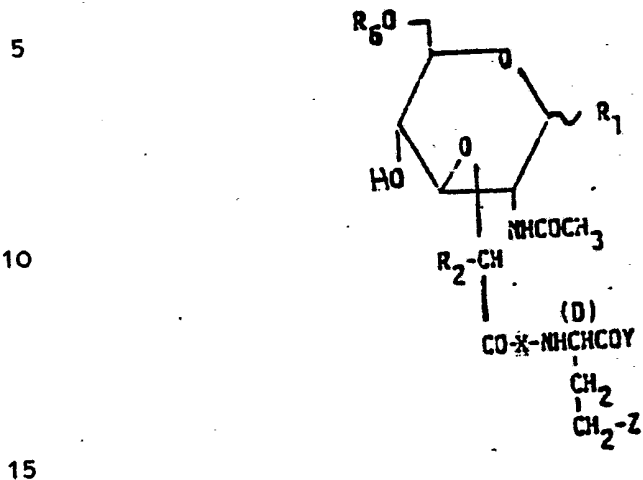


dans laquelle :

-  $R_1$  est un groupe OH ou un groupe  $O-C_6H_4-NH_2$  ou

- $O-(CH_2)_m-R_a$ ,  $m$  étant un nombre entier de 1 à 10, et  $R_a$  étant une fonction amine, carboxyle, thiol, hydroxyle ou un hydrogène ;
- A est de l'oxygène ou un groupe NH ;
  - 5 -  $R_6$  est un groupe B-R ou CO-B-R dans lequel B est un groupe ou une chaîne linéaire ou ramifiée pouvant porter jusqu'à environ 100 atomes de carbone et R est un hydroxyle, carboxyle, amine, thiol ou hydrogène, le groupe B étant éventuellement lui-même porteur de un ou
  - 10 plusieurs groupes fonctionnels du type de ceux désignés ci-dessus pour R, ou encore carbonyle, alcoyle ou acyle ;
  - $R_2$  est un hydrogène ou un groupe alcoyle comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, notamment méthyle ;
  - 15 - X est un résidu alanyle, arginyle, lysyle, asparagyle, aspartyle, cystéinyle, glutaminyle, glutamyle, glycyle, histidyle, hydroxyprolyle, isoleucyle, leucyle, méthionyle, phénylalanyle, prolyle, séryle, thréonyle, tryptophanyle ou valyle ;
  - 20 - Y est un groupe OH,  $NH_2$  ou, de préférence,  $OR_7$  ou  $NHR_7$ ,  $R_7$  étant un groupe hydrocarboné pouvant avoir de 1 à 20 atomes de carbone ou pouvant être un acide aminé tel qu'indiqué pour X, tel qu'alanyle, séryle, valyle ou glycyle, ledit acide aminé étant libre, amidé ou estéri-
  - 25 fié, le groupe d'estérification pouvant porter jusqu'à 4 atomes de carbone ;
  - Z est un groupe carboxyle, carboxamide, ester comportant de 1 à 10 atomes de carbone, ou encore un groupe alcoyle comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, de préfé-
  - 30 rence  $-CH_2-CH_3$  ou  $-(CH_2)_2-CH_3$  ;
- étant entendu que l'un au moins des groupes  $R_1$  et  $R_6$  (et de préférence  $R_6$ ) possède une fonction réactive permettant sa conjugaison avec une fonction réactive complémentaire portée par une autre molécule, en particulier
- 35 le support macromoléculaire.

4. Produit selon la revendication 3, caractérisé par la formule suivante :



- $R_1$  est  $-OH$  ou  $-O-C_6H_4-NH_2$  ou  $O-(CH_2)_m-R$  avec  $m$  de 1 à 10 et  $R_a$  étant une fonction amine, carboxyle, thiol, hydroxyle ou un hydrogène ;
- 20 -  $R_2$  est  $-H$  ou  $-CH_3$  ;
- $R_6$  est  $-CO(CH_2)_n-R$  avec  $n$  de 1 à 10 et  $R$  étant une fonction amine, carboxyle, thiol, hydroxyle ou hydrogène ;
- $X$  est Ala, Gly, Ser ou Val ;
- 25 -  $Y$  est  $O(CH_2)_p-H$  avec  $p$  de 1 à 10 ;
- $Z$  est  $CO-NH_2$ ,  $COO(CH_2)_r-H$  ou  $(CH_2)_r-CH_3$  avec  $r$  de 1 à 4.

5. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les résidus amino-  
30 acyle entrant dans la constitution du groupe  $X$  sont lévogyres (sauf dans le cas où  $X$  est constitué par un résidu glycyle).

6. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le muramyl-peptide  
35 entrant dans la constitution dudit produit est du type

2-(2-acétamido-2-désoxy-3-O-D-gluco-pyranosyl)-alcanoyl-peptide.

7. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le muramyl-peptide entrant dans la constitution dudit produit est du type 2-(2-acétamido-2-désoxy-3-O-D-gluco-pyranosyl)-alcanoyl-aminoacyl- non Leucine.

8. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel Y est un groupe  $OR_7$ , avec  $R_7$  comportant de 1 à 10 atomes de carbone, et Z est un groupe  $-CONH_2$ .

9. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel Y est un groupe  $OR_7$ , avec  $R_7$  comportant de 1 à 10 atomes de carbone, et Z est un groupe  $-CH_2-CH_3$ .

10. Produit selon l'une quelconque des revendications 3 à 9, caractérisé en ce que A est de l'oxygène et  $R_6$  un groupe  $-CO-(CH_2)_n-COOH$  tel que le groupe succinyle  $-CO-(CH_2)_2-COOH$ , ou le groupe  $-CO-(CH_2)_n-NH_2$ , tel que le groupe epsilon-amino-caproyle :  $-CO-(CH_2)_6-NH_2$ , n étant un nombre de 1 à 10.

11. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dont la partie muramyl-peptide est dérivée de l'un des muramyl-peptides suivants :

- 25 - 6-O-epsilon-aminocaproyl-MurNAc-L-Ala-D-Gln-OnBu ;
- 6-O-epsilon-aminocaproyl-MurNAc-L-Ala-D-Nle-OnBu ;
- 6-O-succinyl-MurNAc-L-Ala-D-Gln-OnBu ;
- 6-O-succinyl-MurNAc-L-Ala-D-Nle-OnBu ;

ou encore des muramyl-peptides précédents dans lesquels les groupes ester N-butylique (OnBu) sont remplacés par des groupes ester méthylique (OMe).

12. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le support macromoléculaire a un poids moléculaire d'au moins 50 000, notamment compris entre 50 000 et 250 000 daltons.

13. Produit selon la revendication 12, caractérisé en ce que le support macromoléculaire est dérivé de l'anatoxine tétanique.

5 14. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la partie haptène entrant dans ledit produit présente un poids moléculaire au plus égal à 5 000.

10 15. Produit selon la revendication 14, caractérisé en ce que la partie haptène est un groupe polypeptidique.

15 16. Composition pharmaceutique ayant notamment des propriétés immunogènes sélectives inductrices d'anticorps protecteurs contre un antigène déterminé, caractérisé en ce que le principe actif de cette composition est conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 15 et en ce que le constituant haptène de ce produit contient un site antigénique ou un épitope commun avec l'antigène contre lequel la protection est recherchée.