



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

| | | |
|---|---|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 35/74, 39/39, A61P 37/04, 35/00, C07K 14/26 // (A61K 35/74, 38:19) | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 00/54790 (43) Date de publication internationale: 21 septembre 2000 (21.09.00) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00623 (22) Date de dépôt international: 15 mars 2000 (15.03.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/03154 15 mars 1999 (15.03.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LIBON, Christine [FR/FR]; 9, avenue de Ternier, F-74160 Saint Julien en Genevois (FR). CORVAIA, Nathalie [FR/FR]; 32, rue des Chênes, F-74160 Saint Julien en Genevois (FR). BECK, Alain [FR/FR]; 503, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges sous Salève (FR). BONNEFOY, Jean-Yves [FR/FR]; Les Noyers, F-74350 Le Sappey (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). | (81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, JP, MX, US, ZA, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> | |
| (54) Title: IMMUNOSTIMULANT BACTERIAL MEMBRANE FRACTIONS IN CANCER TREATMENT (54) Titre: FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES IMMUNOSTIMULANTES DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS (57) Abstract <p>The invention concerns the use of a membrane fraction of gram-negative bacteria, in particular <i>Klebsiella pneumoniae</i> for preparing a pharmaceutical composition that is immunostimulant and/or capable of inducing an antitumoral immune response, designed in particular for treating and preventing cancers. The invention further comprises methods for preparing said membrane fractions and pharmaceutical compositions containing them, in particular combined with anticancer compounds.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, destinée en particulier au traitement et à la prévention des cancers. L'invention comprend en outre des procédés de préparation desdites fractions membranaires ainsi que des compositions pharmaceutiques les contenant, notamment associées à des composés anticancéreux.</p> | | |

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.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave de Macédoine | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | ML | Mali | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | MN | Mongolie | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MR | Mauritanie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MW | Malawi | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MX | Mexique | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | NE | Niger | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NL | Pays-Bas | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norvège | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NZ | Nouvelle-Zélande | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CM | Cameroun | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CN | Chine | KZ | Kazakstan | RO | Roumanie | | |
| CU | Cuba | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| CZ | République tchèque | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DE | Allemagne | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| DK | Danemark | LR | Libéria | SG | Singapour | | |
| EE | Estonie | | | | | | |

FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES IMMUNOSTIMULANTES DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS

5

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae* pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, destinée en particulier au traitement et à la
10 prévention des cancers. L'invention comprend en outre des procédés de préparation desdites fractions membranaires ainsi que des compositions pharmaceutiques les contenant, notamment associées à des composés anticancéreux.

La transformation d'une cellule normale en cellule maligne est le résultat de nombreux événements différents, qui peuvent se produire spontanément, comme les
15 mutations ou les réarrangements de gènes, ou être induits par des agents chimiques, physiques ou viraux.

Les tumeurs sont infiltrées par des cellules immunocompétentes, notamment des lymphocytes, des cellules dendritiques et des macrophages.

Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) proviennent de la circulation
20 sanguine et sont recrutés sur le site tumoral par des cytokines. Les TAM se lient aux cellules tumorales par l'intermédiaire de glycoprotéines, sucres et phospholipides, et prolifèrent au site tumoral (J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90:1583). Ils y sécrètent de nombreuses cytokines qui participent à leur activité antitumorale. Parmi les plus importantes, on trouve le TNF- α et l'IL-12.

25 L'activité antitumorale du TNF- α a été démontrée dans des modèles expérimentaux chez la souris (Beyaert R. and Fiers W., Cytokines, chapter 24, 335-360 Academic. Press. 1998) et a été testée chez l'homme pour traiter les cancers de la vessie : seul, il présente une activité modérée (Steinberg et al., Ann. Oncol., 1992, 3,741-745 ; Eur. Urol. 1992, 22:112).

30 La production d'IL-12 par des macrophages activés sert à moduler la réponse immunitaire en favorisant la formation de lymphocytes T CD4+ de type Th1, qui

produisent de l'IL-2 et de l'IFN- γ . L'activité inhibitrice de l'IL-12 sur l'angiogenèse et la régression tumorale est bien connue, et semble liée à l'induction d'IFN- γ qui stimule la production d'IP-10 (interferon-inducible protein-10) et de MIG (monokine induced by IFN- γ) (J. Natl. Cancer Inst., 1998, 90:1583).

5 La thérapie à BCG (Bacille Calmette Guérin) est utilisée pour prévenir la récurrence de certains types de cancer de la vessie. Le mécanisme d'action proposé actuellement repose sur la production de cytokines : libération précoce de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), dans un deuxième temps production d'IL-2 et d'IFN- γ (réponse Th1), puis plus tardivement d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10 (réponse
10 Th2). Enfin, se produit une phase d'activation cellulaire avec amplification de populations cytotoxiques (Patard et al., Progrès en Urologie, 1998, 8,415-421).

Cependant, la thérapie à BCG n'a pas que des avantages, car l'efficacité parfois observée l'est au prix d'une morbidité également supérieure. De plus, il existe des contre-indications à la BCG thérapie : tuberculose active (mais pas tuberculose
15 antérieure), immunosuppression (HIV, transplantation, ...), réaction systémique antérieure au BCG (hépatite, pneumonie, BCGite), traitements aux stéroïdes. Par ailleurs, il existe des résistances ou des récurrences après une thérapie à BCG.

La fraction membranaire de *K. pneumoniae* I145 entre dans la composition d'une préparation pharmaceutique prévenant la survenue et la récurrence d'infections
20 respiratoires d'origine bactérienne et utilisée chez l'homme depuis 20 ans. A ce titre, il existe un recul de non toxicité du produit. L'ensemble des données citées plus haut montre qu'il existe aujourd'hui un besoin de disposer de nouveaux immunostimulants dépourvus d'activité toxique. De tels immunostimulants seraient d'un grand intérêt pour le traitement de certains types de cancer.

25 De manière surprenante, les auteurs de la présente invention ont mis en évidence que des fractions membranaires d'une bactérie à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae* (dénommée FMKp), en particulier des fractions membranaires obtenues par les procédés tels que décrits ci-après dans les exemples, possèdent les propriétés immunostimulantes recherchées.

30 Les inventeurs ont montré de manière inattendue que la FMKp ou l'un de ses constituants majeurs, la protéine de membrane externe OmpA, dénommée P40 (telle

que décrite dans les demandes de brevets WO 95/27787 et WO 96/14415) était capable non seulement de stimuler la prolifération des cellules mononucléées du sang humain, démontrant ainsi son activité immunostimulante, mais également d'induire la production de TNF- α et d'IL-12, notamment par les monocytes, cytokines impliquées dans la réponse immunitaire antitumorale.

Ainsi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, comme composé immunostimulant et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, ou pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante, et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, et ce quel que soit le mode d'administration in vivo choisi (voie entérale ou parentérale).

Par composé ou composition pharmaceutique immunostimulante, on entend désigner dans la présente invention un composé ou une composition pharmaceutique capable d'augmenter une réponse immune non spécifique.

Par composé ou composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, on entend désigner dans la présente invention un composé ou une composition pharmaceutique capable en particulier d'accroître l'efficacité d'un composé anticancéreux ou d'accroître l'efficacité d'un traitement anticancéreux, tel que par exemple un traitement par radiothérapie.

L'invention concerne également l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches différentes de bactéries.

Par fraction membranaire de bactérie, on entend désigner dans la présente invention toute fraction ou extrait membranaire purifié ou partiellement purifié obtenu à partir d'une culture de ladite bactérie et dont le procédé de préparation comprend au moins une étape de lyse des bactéries obtenues après culture et une étape de séparation de la fraction contenant les membranes desdites bactéries du lysat total obtenu après l'étape de lyse, notamment par centrifugation ou filtration.

Par fraction membranaire de bactérie lorsque ladite bactérie est *Klebsiella pneumoniae*, on entend désigner également dans la présente invention la protéine P40,

fraction active de la fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*, de séquence d'acides aminés SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments.

Selon l'invention, les fractions membranaires pourront être préparées selon les méthodes connues de l'homme de l'art telles que par exemple la méthode décrite par
5 Haeuw J.F. et al. (Eur. J. Biochem, 255, 446-454, 1998).

Selon un mode de réalisation particulier, l'invention est relative à une utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance
10 suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans
15 une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéolytiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- 20 f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

L'étape b) de désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a) peut être réalisée par toutes méthodes connues de désactivation d'enzymes, telles qu'en particulier par chauffage du culot bactérien remis en suspension à une température de préférence voisine de 100°C, ou par addition d'inhibiteur de l'activité
25 de ces enzymes.

L'étape c) d'extraction et d'élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) peut être réalisée par exemple par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction correspondant à l'addition d'une solution hypertonique (solution d'extraction), de préférence une
30 solution saline de molarité voisine de 1 M, suivie après un temps de contact suffisant pour l'effet désiré d'une centrifugation de la suspension obtenue et de l'élimination du

surnameant obtenu après ladite centrifugation, ce cycle de lavage pouvant être reproduit plusieurs fois.

L'étape d) de digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) peut être réalisée en présence d'une solution d'enzymes protéolytiques telles que par exemple la trypsine, la chymotrypsine ou toute enzyme à activité protéolytique connue, les conditions de la réaction, pH de la solution, température et durée de la réaction, étant de préférence ajustées aux conditions optimales pour l'activité de ou des enzymes choisies, suivie d'une centrifugation, ce cycle de digestion pouvant être reproduit plusieurs fois avec la même enzyme, la même combinaison d'enzymes ou avec une enzyme différente pour chaque cycle de digestion effectué.

L'étape e) de lavage du culot obtenu à l'étape d) est réalisée par reprise du culot dans une solution physiologique ou dans de l'eau distillée suivie, après un temps de contact suffisant, d'une centrifugation, ce cycle de lavage pouvant être reproduit plusieurs fois.

Enfin, l'étape f) d'ultrasonication du culot a pour objectif en particulier de désintégrer et d'homogénéiser la fraction membranaire obtenue en fin d'étape e). Les conditions d'ultrasonication (durée et puissance) seront déterminées par l'homme de l'art en fonction par exemple de la quantité de fraction membranaire à traiter.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention est relative à une utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;

f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et

g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

5 Les conditions de décongélation à l'étape b) du procédé ci-dessous seront bien entendu déterminées par l'homme de l'art en fonction de la quantité de culot initiale à traiter, de préférence réalisée à 4°C pendant au moins 48 heures pour l'équivalent de 1 Kg de cellules sèches.

10 A l'étape c), l'élimination des acides nucléiques est réalisée par exemple par l'addition d'une DNase, à une concentration finale de 5 mg/ml d'une suspension de cellules à une concentration équivalente à 5 % de cellules sèches.

Le broyage des cellules obtenues à l'étape c) peut être réalisé au moyen de tout système ou appareillage connu par l'homme de l'art pour le broyage de cellules tel que les presses ou de préférence tel que le broyage en boucle de Manton Gaulinet
15 pendant 30 minutes.

La clarification de la suspension obtenue après broyage pourra être réalisée au moyen de tout système ou appareillage connu par l'homme de l'art pour la clarification de broyats cellulaires bactériens tel que le système Sharpless.

20 L'étape e) de précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) peut être réalisée par exemple avec l'acide acétique. La précipitation est suivie par l'élimination du culot au moyen par exemple d'un système de type Sharpless et par la récupération du surnageant.

L'étape f) consiste en une étape dans laquelle le surnageant, obtenu après précipitation en milieu acide, est neutralisé, dilué, dialysé puis concentré.

25 Enfin, la dernière étape consiste en une étape de stérilisation du concentré de fraction membranaire obtenu à l'étape précédente comme par exemple par chauffage à 121°C pendant environ 35 minutes.

L'invention concerne de manière particulière l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, l'un de ses fragments ou une protéine
30 homologue dont la séquence présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de

préférence 90 %, 95 % et 99 %, avec la séquence SEQ ID N° 2, lesdits fragments ou ladite protéine homologue étant capables d'induire une activité immunostimulante et/ou antitumorale.

Par « pourcentage, degré ou taux d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale par fenêtre de comparaison dans laquelle la région de la séquence d'acide nucléique ou d'acides aminés à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total

de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences », disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les
5 paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap penaltie » : 5, et « extension gap penaltie » : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

10 Par fragment de la protéine P40, on entend désigner en particulier tout fragment de séquence d'acides aminés compris dans la séquence d'acides aminés de la protéine P40 capable d'augmenter une réponse immune non spécifique et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale, et comprenant au moins 5 acides aminés, de préférence au moins 10 acides aminés ou de manière plus préférée au
15 moins 15 acides aminés.

Bien entendu, ladite protéine P40, ou ses fragments, pourront être obtenus par synthèse chimique ou sous forme de peptides recombinants.

Les méthodes de préparation de peptides recombinants sont aujourd'hui bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description.
20 Parmi les cellules utilisables pour la production de ces peptides recombinants, il faut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins P.O. et Lee S.C., 1993, Recent advances in heterologous gene expression in E. coli. Curr. Op. Biotechnology 4:520-525), mais également les cellules de levure (Buckholz R.G., 1993, Yeast Systems for the Expression of Heterologous Gene Products. Curr. Op. Biotechnology 4:538-542),
25 de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards C.P. et Aruffo A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4, 558-563) mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre par exemple des baculovirus (Luckow V.A., 1993, Baculovirus systems for
30 the expression of human gene products. Curr. Op. Biotechnology 4, 564-572).

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité à induire une réponse immunitaire antitumorale, telle que sous la forme d'une émulsion de type huile dans eau ou eau dans huile, ou sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.

Est également comprise dans la présente invention, l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.

Parmi lesdits agents permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires, on préfère les cytokines et les composés cellulaires.

Parmi les cytokines, on peut citer, mais sans s'y limiter : l'IL-2, l'IL-12, l'IL-18, l'IFN- γ et l'IFN- α .

Parmi les composés cellulaires, on préfère notamment les acides nucléiques, les composés de la famille des ribosomes, ou encore les protéines de la famille des protéines de choc thermique.

Est également comprise dans la présente invention, l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent potentialisateur permettant de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.

Parmi lesdits agents potentialisateurs permettant de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires, on préfère les hormones et les facteurs de croissance.

Parmi les hormones, on peut citer, mais sans s'y limiter la β -hCG.

Parmi les facteurs de croissance, on peut citer, mais sans s'y limiter : l'EGF, l'IGF-1, l'IGF-2, le GM-CSF et le G-CSF.

L'invention a également pour objet l'utilisation selon l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anticancéreux, notamment un traitement anticancéreux par chimiothérapie (mono ou polychimiothérapie) et/ou une radiothérapie.

5 Selon l'invention, la préparation de la composition pharmaceutique est destinée à être administrée, par voie entérale ou parentérale, simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anticancéreux.

L'invention comprend en outre l'utilisation selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique comprenant un composé à activité
10 anticancéreuse associé à ladite fraction membranaire.

De nombreux composés à activité anticancéreuse peuvent être ainsi associés à ladite fraction membranaire immunostimulante et/ou capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale.

Parmi ces composés, on peut citer notamment, mais sans s'y limiter, les
15 inhibiteurs de protéases ou les composés à activité anti-angiogénique, tels que par exemple :

- les inhibiteurs de protéases tels que les TIMPs ;
ou les composés à activité anti-angiogénique suivants : l'angiostatine, l'endostatine, MCP-1, IP-10 et PF-4 ainsi que des anticorps, des antisens ou des peptides anti-
20 VEGF, anti-angiogénine, anti-aFGF, anti-bFGF.

Ainsi, l'invention est relative à l'utilisation selon l'invention, caractérisée en ce que ledit traitement anticancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation selon l'invention, pour la
25 préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou le traitement des cancers, notamment les cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie, ou les mélanomes malins.

Sous un autre aspect, l'invention est relative à un procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae*,
30 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- 5 c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- 10 e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

L'invention comprend aussi le procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae*,
15 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une décongélation et du séchage des cellules ;
- 20 c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- 25 f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

Les fractions membranaires susceptibles d'être obtenues par lesdits procédés
30 font bien entendu partie de l'invention.

Le titre en protéoglycane des fractions membranaires susceptibles d'être obtenues par lesdits procédés, principe actif de la FMKp, représenté par la somme des teneurs en galactose et en protéine, est de préférence compris :

- pour le galactose : entre 1,2 g/l et 3,4 g/l ;
- 5 - pour les protéines : entre 7,5 g/l et 14,9 g/l.

De manière plus préférée, ce titre sera :

- pour le galactose : entre 1,8 g/l et 2,6 g/l ;
- pour les protéines : entre 9,3 g/l et 11,7 g/l.

L'invention concerne en outre les compositions pharmaceutiques comprenant
10 une fraction membranaire susceptible d'être obtenue par les procédés selon l'invention.

Sont également comprises dans la présente invention, les compositions pharmaceutiques comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, caractérisée en ce qu'elle est associée à un
15 traitement anticancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

On entend ici désigner par fraction membranaire, toute fraction membranaire de bactérie gram négatif telle que définie précédemment, dont celle susceptible d'être obtenue par les procédés selon l'invention et la protéine P40 ou l'un de ses fragments.

De façon préférée, l'invention concerne une composition pharmaceutique selon
20 l'invention, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, notamment un composé anticancéreux choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.

De préférence, lesdites compositions pharmaceutiques selon l'invention,
25 pourront comprendre en outre des agents tels que les véhicules, agents capables de potentialiser et/ou de réguler l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires tels que définis précédemment.

Les légendes des figures et exemples qui suivent sont destinés à illustrer
30 l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Légendes des figures :

Figure 1 : Prolifération de PBMC en présence de FMKp – Etude dose-réponse

Les cellules mononucléées (PBMC) sont obtenues par séparation à l'aide d'une solution de Ficoll-sodium métrizoate à partir du sang total. Les PBMC sont alors ensemencés à raison de 10 000 cellules/puits en présence d'agents stimulants, sous un volume total de 200 μ l. Après 72 h d'incubation, la prolifération est objectivée par addition de thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en index de stimulation = [cpm PBMC + stimulus]/[cpm PBMC sans stimulus (= milieu RPMI + 10 % SVF)].

Figure 2 : Prolifération de PBMC en présence de FMKp - Reproductibilité de l'effet sur plusieurs donneurs (FMKp à 250 μ g/ml).

Figure 3 : Production de TNF- α par des monocytes sanguins

Les monocytes sont cultivés en milieu RPMI 1640+SVF 10 % et en présence de différentes concentrations de produit. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Conditions de cultures : 200 000 cellules/puits, 18 h d'incubation. Après incubation, les plaques de culture sont centrifugées et les surnageants sont aliquotés et conservés à - 80°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de cultures sont déterminées par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) : kit Predicta de Genzyme (seuil de détection à 3 pg/ml).

Figure 4 : Production d'IL-12 p70 (biologiquement active) par des monocytes sanguins.

Les monocytes sont cultivés en milieu RPMI 1640+SVF 10 % et en présence de différentes concentrations de produit. Les cellules sont incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Conditions de cultures : 500 000 cellules/puits, 24 h d'incubation. Après incubation, les plaques de culture sont centrifugées et les surnageants sont aliquotés et conservés à - 80°C jusqu'au dosage. Les concentrations de cytokines présentes dans les surnageants de cultures sont déterminées par ELISA : couple d'anticorps Endogen (seuil de détection à 15 pg/ml).

Exemple 1 : Obtention de la fraction membranaire de *K. pneumoniae* (FMKp)

Procédé N° 1

L'extraction des membranes de *K. pneumoniae* I145 à partir du culot de centrifugation de l'étape est précédée de préférence par une étape de destruction des enzymes lytiques des composants cellulaires contenus dans le culot, par exemple par chauffage à 100°C de celui-ci, éventuellement après remise en solution.

- 5 L'extraction proprement dite des membranes à partir du culot de centrifugation est réalisée de préférence par traitement des composants cellulaires du culot, après une éventuelle destruction des enzymes lytiques, à l'aide d'une solution saline, par exemple du chlorure de sodium 1 M, une ou plusieurs fois, puis centrifugation, de préférence, à 20 000 g, de la suspension obtenue, le surnageant de cette
- 10 centrifugation, qui est éliminé, contient les impuretés non membranaires telles que protéines et acides nucléiques, tandis que le culot contient les membranes.

Après séparation de la solution saline contenant les impuretés, les membranes sont digérées en présence d'enzymes protéolytiques, de préférence la trypsine et la chymotrypsine, en solution à pH 8 à 37°C pendant 4 heures.

- 15 Après digestion, la solution est homogénéisée par ultrasonication. Le produit ainsi obtenu constitue la fraction membranaire nommée FMKp.

Le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions, de préférence à 140 000 g.

Préparation des glycopeptides membranaires

- 20 Cette fraction est préparée à partir du culot obtenu par centrifugation à 40 000 g pendant 20 minutes. Ledit culot est remis en suspension dans du sérum physiologique puis cette suspension est portée pendant 10 minutes à 100°C dans un bain-marie d'eau bouillante pour désactiver les enzymes lytiques. Après refroidissement, on centrifuge 30 mn à 20 000 g. Le culot obtenu est extrait deux fois
- 25 avec du NaCl 1M pour éliminer les protéines et les acides nucléiques. Les membranes sont recueillies par centrifugation durant 30 minutes à 20 000 g.

Elles sont ensuite soumises à une digestion par de la trypsine à pH 8 et à 37°C pendant 4 heures puis par de la chymotrypsine dans les mêmes conditions.

- Les membranes sont alors recueillies par centrifugation à 2 000 g pendant 30
- 30 minutes, lavées avec du sérum physiologique puis de l'eau distillée et sont soumises à une désintégration par les ultrasons de 15 minutes.

Procédé N° 2

Après décongélation à + 4°C pendant 48 h minimum, 1 kg de cellules sèches de *K. pneumoniae* est remis en suspension à 5 % cellules sèches. La DNase est ajoutée à 5 mg/l. On procède ensuite au broyage en boucle au Manton Gaulin pendant 5 30 min puis à une clarification sur SHARPLES à 50 l/h, suivie d'une précipitation à l'acide acétique à pH = 4,2 + 0,1 pendant 30 min. Le culot est éliminé (SHARPLES à 25 l/h) et le surnageant est neutralisé, dilué à 2 fois le volume initial avec de l'eau osmosée. Une dialyse à volume constant est alors effectuée sur PUF 100 jusqu'à 800 Ω cm, suivie d'une concentration de la suspension membranaire (SM) ainsi 10 obtenue, à 11 l/kg de cellules sèches. On procède alors à l'autoclavage de la SM à + 121°C durant 35 min que l'on peut conserver à + 4°C pendant 6 semaines.

Caractéristiques de la FMKp

Par définition, le titre en protéoglycane, principe actif de la FMKp, est égal à la somme des teneurs en galactose et en protéines.

- 15 - Galactose : en moyenne 2,2 g /l
- Protéines : en moyenne 10,5 g/l

Exemple 2 : Prolifération de PBMC du sang humain

Les résultats obtenus montrent que, de manière surprenante, la FMKp 20 déclenche la prolifération de PBMC. Cet effet est dose-dépendant et maximal pour 2,5 mg/ml de FMKp (figure 1). Par ailleurs, cet effet est reproductible (figure 2).

Exemple 3 : Production de cytokines par des monocytes purifiés du sang humain

Les monocytes humains sont obtenus à partir des cellules mononucléées 25 (lymphocytes, monocytes, cellules NK, ...) préalablement isolées du sang total humain. L'obtention des monocytes repose sur l'expression en grande quantité de l'antigène de surface CD14 sur ces cellules. La séparation est une sélection positive. L'efficacité de la séparation magnétique des monocytes est ensuite évaluée par cytométrie en flux en effectuant un marquage avec un anticorps CD13 couplé à la 30 fluorescéine iso-thiocyanate (FITC) : la suspension cellulaire contient alors 94 à 97 % de monocytes.

Les résultats d'études in vitro démontrent que, de manière intéressante, la FMKp est un immunostimulant qui induit la prolifération de PBMC du sang humain avec un effet direct sur les monocytes : production de TNF- α (figure 3), et d'IL-12 p70 (figure 4). Il est remarquable que la protéine P40 recombinante (rP40), l'OmpA de *K. pneumoniae*, est également capable de stimuler la production de TNF- α (figure 3), et d'IL-12 p70 (figure 4) par des monocytes humains.

REVENDICATIONS

- 1/ Utilisation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif pour la préparation d'une composition pharmaceutique immunostimulante capable d'induire
5 une réponse immunitaire antitumorale.
- 2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend une fraction membranaire de *Klebsiella pneumoniae*.
- 3/ Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire comprend au moins des fractions membranaires de deux souches
10 différentes de bactéries.
- 4/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :
- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- 15 b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- 20 d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).
- 25 5/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la fraction membranaire est préparée par un procédé comprenant les étapes suivantes :
- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une
30 décongélation et du séchage des cellules ;

- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du culot ;
- f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et
- g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

10 6/ Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la fraction membranaire est la protéine P40 de *Klebsiella pneumoniae* de séquence SEQ ID N° 2, ou l'un de ses fragments, ou une protéine dont la séquence présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % avec la séquence SEQ ID N° 2.

15 7/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de véhiculer ladite fraction membranaire sous une forme permettant d'améliorer sa stabilité et/ou son activité immunostimulante et/ou sa capacité d'induire une réponse immunitaire antitumorale.

20 8/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent est de type émulsion huile dans eau ou eau dans huile.

 9/ Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit agent est sous la forme d'une particule de type liposome, microsphère, nanosphère ou tout type de structure permettant l'encapsulation et la présentation sous forme particulière de ladite fraction membranaire.

25 10/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique comprend en outre un agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires.

30 11/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est une cytokine.

12/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les hormones.

5 13/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un agent de régulation choisi parmi les facteurs de croissance.

10 14/ Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'agent permettant de potentialiser l'activité immunostimulante et/ou la réponse immunitaire antitumorale desdites fractions membranaires est un composé cellulaire.

15/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un acide nucléique choisi parmi les ADN et les ARN.

15 16/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est un composé de la famille des ribosomes.

17/ Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit composé cellulaire est une protéine de la famille des protéines de choc thermique.

20 18/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée en association avec un traitement anticancéreux.

19/ Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le traitement anticancéreux est une chimiothérapie et/ou une radiothérapie.

25 20/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 19 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée simultanément, séparément ou étalée dans le temps avec le traitement anticancéreux.

21/ Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est administrée par voie entérale ou parentérale.

30 22/ Utilisation selon l'une des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que ledit traitement anticancéreux associé est un traitement chimiothérapeutique comprenant un inhibiteur de protéases ou un composé à activité anti-angiogénique.

23/ Utilisation selon l'une des revendications 1 à 22, pour la prévention et/ou le traitement des cancers.

24/ Utilisation selon la revendication 23, pour la prévention et/ou le traitement des cancers de la vessie, de la prostate, du colon, du foie et des mélanomes malins.

25/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie d'une centrifugation de ladite culture ;
- 10 b) le cas échéant, désactivation des enzymes lytiques du culot de bactéries obtenu à l'étape a), puis centrifugation de la suspension obtenue ;
- c) extraction et élimination des protéines non membranaires et des acides nucléiques du culot obtenu à l'étape a) ou b) par au moins un cycle de lavage du culot dans une solution d'extraction ;
- 15 d) digestion du culot de membranes obtenu à l'étape c) en présence d'enzymes protéasiques suivie d'une centrifugation ;
- e) au moins un cycle de lavage du culot obtenu à l'étape d) dans une solution physiologique et/ou dans de l'eau distillée ; et
- f) ultrasonication du culot obtenu à l'étape e).

20 26/ Procédé de préparation d'une fraction membranaire de bactéries à gram négatif, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la culture desdites bactéries dans un milieu de culture permettant leur croissance suivie le cas échéant d'une centrifugation ;
- b) la congélation du milieu de culture ou du culot obtenu à l'étape a) suivie d'une
- 25 décongélation et du séchage des cellules ;
- c) élimination au moyen d'une DNase des acides nucléiques des cellules sèches obtenues à l'étape b) remises en suspension ;
- d) broyage des cellules obtenues à l'étape c) et clarification de la suspension obtenue ;
- e) précipitation en milieu acide de la suspension obtenue à l'étape d) et élimination du
- 30 culot ;

f) neutralisation du surnageant obtenu à l'étape e) contenant la suspension membranaire, suivie d'une dialyse et d'une concentration de la suspension membranaire ; et

g) stérilisation de la suspension membranaire concentrée obtenue à l'étape f).

5 27/ Procédé selon la revendication 25 ou 26, caractérisé en ce que ladite bactérie à gram négatif est *Klebsiella pneumoniae*.

 28/ Fraction membranaire susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 25 à 27.

 29/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire
10 selon la revendication 28.

 30/ Composition pharmaceutique comprenant une fraction membranaire de bactérie gram négatif, notamment de *Klebsiella pneumoniae*, ou composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce qu'elle est associée à un traitement anticancéreux par chimiothérapie et/ou par radiothérapie.

15 31/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'elle contient un composé anticancéreux comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

 32/ Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce que ledit composé anticancéreux est choisi parmi les inhibiteurs de protéases ou
20 parmi les composés présentant une activité anti-angiogénique.

1/2

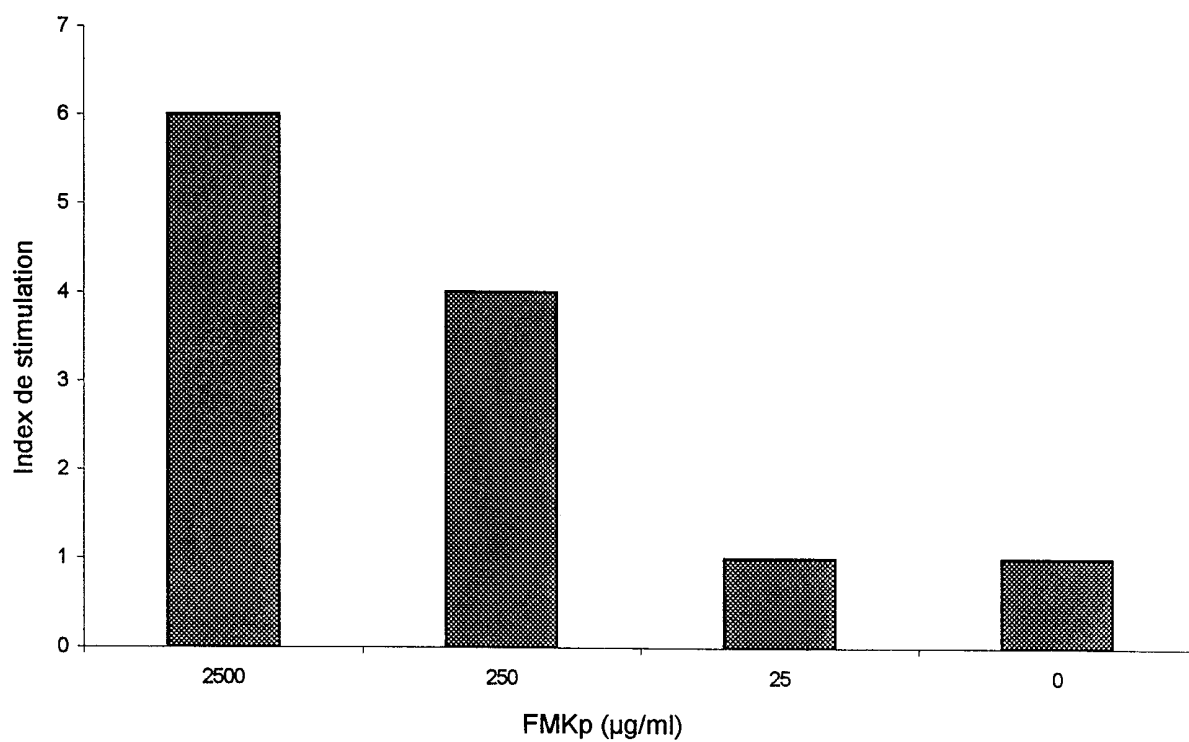


FIGURE 1

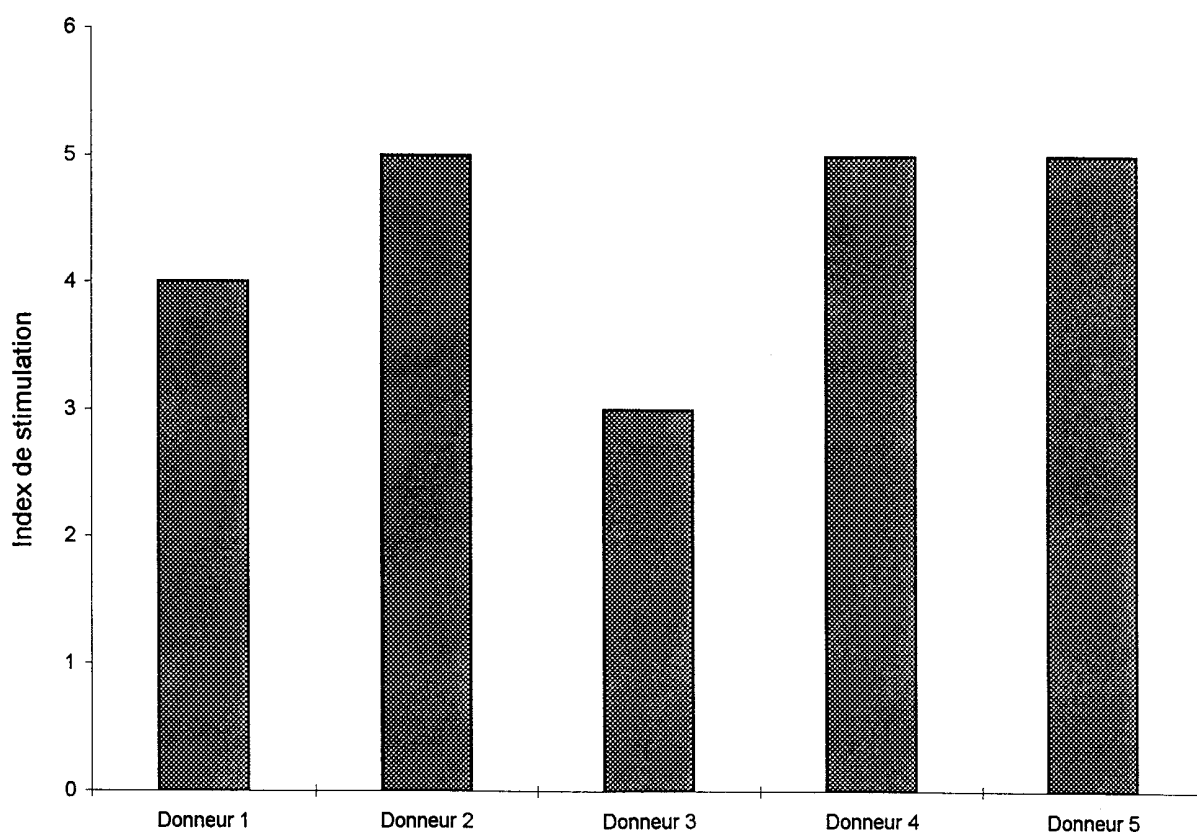


FIGURE 2

2/2

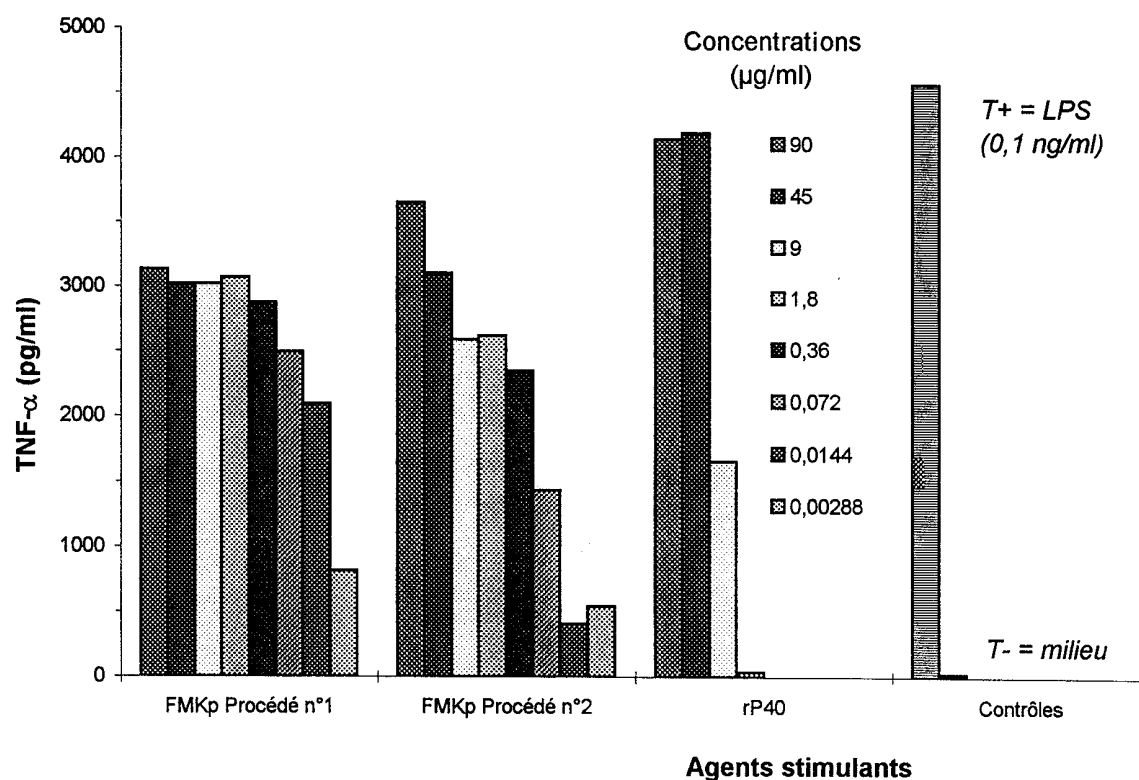


FIGURE 3

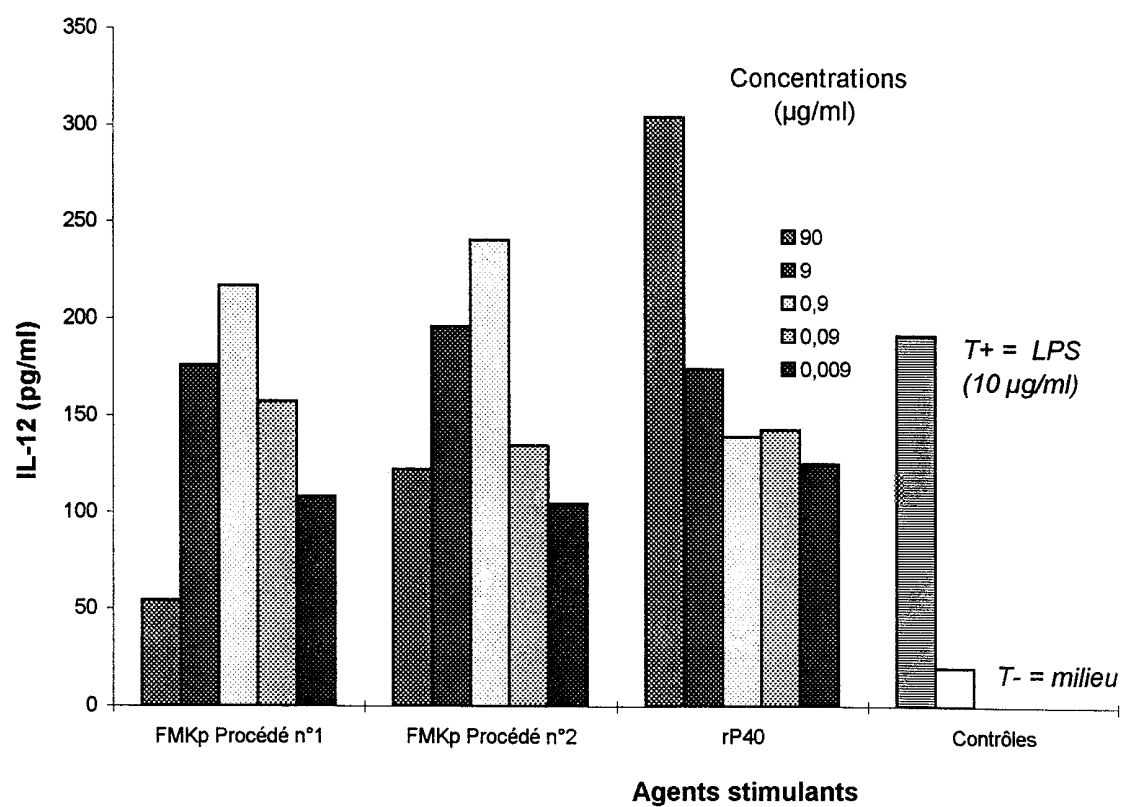


FIGURE 4

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> UTILISATION DE FRACTIONS MEMBRANAIRES BACTERIENNES A
 ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE DANS LE TRAITEMENT DE
 CANCERS, LEURS PROCEDES DE PREPARATION ET LES
 COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.

<130> D17974

<140> FR 99 03154

<141> 1999-03-15

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1035

<212> ADN

<213> Klebsiella pneumoniae

<220>

<221> exon

<222> (1)..(1032)

<220>

<221> intron

<222> (1033)..(1035)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atg aaa gca att ttc gta ctg aat gcg gct ccg aaa gat aac acc tgg | 48 |
| Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp | |
| 1 5 10 15 | |
| tat gca ggt ggt aaa ctg ggt tgg tcc cag tat cac gac acc ggt ttc | 96 |
| Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe | |
| 20 25 30 | |
| tac ggt aac ggt ttc cag aac aac aac ggt ccg acc cgt aac gat cag | 144 |
| Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln | |
| 35 40 45 | |
| ctt ggt gct ggt gcg ttc ggt ggt tac cag gtt aac ccg tac ctc ggt | 192 |
| Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly | |
| 50 55 60 | |
| ttc gaa atg ggt tat gac tgg ctg ggc cgt atg gca tat aaa ggc agc | 240 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Phe | Glu | Met | Gly | Tyr | Asp | Trp | Leu | Gly | Arg | Met | Ala | Tyr | Lys | Gly | Ser | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | 75 | | | | | 80 | | | |
| gtt | gac | aac | ggt | gct | ttc | aaa | gct | cag | ggc | gtt | cag | ctg | acc | gct | aaa | 288 | |
| Val | Asp | Asn | Gly | Ala | Phe | Lys | Ala | Gln | Gly | Val | Gln | Leu | Thr | Ala | Lys | | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | |
| ctg | ggt | tac | ccg | atc | act | gac | gat | ctg | gac | atc | tac | acc | cgt | ctg | ggc | 336 | |
| Leu | Gly | Tyr | Pro | Ile | Thr | Asp | Asp | Leu | Asp | Ile | Tyr | Thr | Arg | Leu | Gly | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | |
| ggc | atg | gtt | tgg | cgc | gct | gac | tcc | aaa | ggc | aac | tac | gct | tct | acc | ggc | 384 | |
| Gly | Met | Val | Trp | Arg | Ala | Asp | Ser | Lys | Gly | Asn | Tyr | Ala | Ser | Thr | Gly | | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| gtt | tcc | cgt | agc | gaa | cac | gac | act | ggc | gtt | tcc | cca | gta | ttt | gct | ggc | 432 | |
| Val | Ser | Arg | Ser | Glu | His | Asp | Thr | Gly | Val | Ser | Pro | Val | Phe | Ala | Gly | | |
| | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| ggc | gta | gag | tgg | gct | gtt | act | cgt | gac | atc | gct | acc | cgt | ctg | gaa | tac | 480 | |
| Gly | Val | Glu | Trp | Ala | Val | Thr | Arg | Asp | Ile | Ala | Thr | Arg | Leu | Glu | Tyr | | |
| | | | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | 160 | | |
| cag | tgg | gtt | aac | aac | atc | ggc | gac | gcg | ggc | act | gtg | ggt | acc | cgt | cct | 528 | |
| Gln | Trp | Val | Asn | Asn | Ile | Gly | Asp | Ala | Gly | Thr | Val | Gly | Thr | Arg | Pro | | |
| | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | |
| gat | aac | ggc | atg | ctg | agc | ctg | ggc | gtt | tcc | tac | cgc | ttc | ggt | cag | gaa | 576 | |
| Asp | Asn | Gly | Met | Leu | Ser | Leu | Gly | Val | Ser | Tyr | Arg | Phe | Gly | Gln | Glu | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| gat | gct | gca | ccg | gtt | gtt | gct | ccg | gct | ccg | gct | ccg | gct | ccg | gaa | gtg | 624 | |
| Asp | Ala | Ala | Pro | Val | Val | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Glu | Val | | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| gct | acc | aag | cac | ttc | acc | ctg | aag | tct | gac | gtt | ctg | ttc | aac | ttc | aac | 672 | |
| Ala | Thr | Lys | His | Phe | Thr | Leu | Lys | Ser | Asp | Val | Leu | Phe | Asn | Phe | Asn | | |
| | | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| aaa | gct | acc | ctg | aaa | ccg | gaa | ggt | cag | cag | gct | ctg | gat | cag | ctg | tac | 720 | |
| Lys | Ala | Thr | Leu | Lys | Pro | Glu | Gly | Gln | Gln | Ala | Leu | Asp | Gln | Leu | Tyr | | |
| | | | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | 240 | | |
| act | cag | ctg | agc | aac | atg | gat | ccg | aaa | gac | ggt | tcc | gct | gtt | gtt | ctg | 768 | |
| Thr | Gln | Leu | Ser | Asn | Met | Asp | Pro | Lys | Asp | Gly | Ser | Ala | Val | Val | Leu | | |
| | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |
| ggc | tac | acc | gac | cgc | atc | ggt | tcc | gaa | gct | tac | aac | cag | cag | ctg | tct | 816 | |
| Gly | Tyr | Thr | Asp | Arg | Ile | Gly | Ser | Glu | Ala | Tyr | Asn | Gln | Gln | Leu | Ser | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| gag | aaa | cgt | gct | cag | tcc | gtt | gtt | gac | tac | ctg | gtt | gct | aaa | ggc | atc | 864 | |

Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 ccg gct ggc aaa atc tcc gct cgc ggc atg ggt gaa tcc aac ccg gtt 912
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
 290 295 300
 act ggc aac acc tgt gac aac gtg aaa gct cgc gct gcc ctg atc gat 960
 Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
 305 310 315 320
 tgc ctg gct ccg gat cgt cgt gta gag atc gaa gtt aaa ggc tac aaa 1008
 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
 325 330 335
 gaa gtt gta act cag ccg gcg ggt taa 1035
 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 340

<210> 2

<211> 344

<212> PRT

<213> *Klebsiella pneumoniae*

<400> 2

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp
 1 5 10 15
 Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln
 35 40 45
 Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly
 50 55 60
 Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser
 65 70 75 80
 Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly
 100 105 110
 Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly
 115 120 125
 Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140

Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr
 145 150 155 160
 Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro
 165 170 175
 Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu
 180 185 190
 Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val
 195 200 205
 Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn
 210 215 220
 Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr
 225 230 235 240
 Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu
 245 250 255
 Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser
 260 265 270
 Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
 290 295 300
 Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
 305 310 315 320
 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
 325 330 335
 Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 340

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00623

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26
 //(A61K35/74, 38:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-------------------------------------|
| X | FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 May 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; claims 1-6 --- | 1-3, 6-24, 28-32 |
| X | FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 September 1987 (1987-09-25) page 2, line 8 - line 13; examples 1,3 --- | 1-3,5, 7-24, 26-32 |
| A | FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 June 1981 (1981-06-26) the whole document --- -/- | 1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"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 when the document is taken alone

"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

Date of the actual completion of the international search

7 June 2000

Date of mailing of the international search report

14/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00623

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|------------------------|
| A | WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ;YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 September 1991 (1991-09-05) ----- | |
| E | WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ;AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 May 2000 (2000-05-18) page 5, line 8 - line 11 page 8, line 29 -page 9, line 14 claims 21-24 ----- | 1-3, 6-24, 28-32 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00623

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| FR 2726472 | A | 10-05-1996 | AU 714423 B | 06-01-2000 |
| | | | AU 4119996 A | 31-05-1996 |
| | | | CA 2204510 A | 17-05-1996 |
| | | | EP 0791063 A | 27-08-1997 |
| | | | WO 9614415 A | 17-05-1996 |
| | | | JP 10508595 T | 25-08-1998 |
| | | | ZA 9509416 A | 06-06-1996 |
| FR 2596064 | A | 25-09-1987 | AT 79037 T | 15-08-1992 |
| | | | AU 7009387 A | 24-09-1987 |
| | | | DE 3780843 A | 10-09-1992 |
| | | | DE 3780843 T | 24-12-1992 |
| | | | EP 0238407 A | 23-09-1987 |
| | | | ES 2051759 T | 01-07-1994 |
| | | | GR 3005567 T | 07-06-1993 |
| | | | JP 1124396 A | 17-05-1989 |
| FR 2471785 | A | 26-06-1981 | AT 5797 T | 15-01-1984 |
| | | | AU 538896 B | 30-08-1984 |
| | | | AU 6558880 A | 25-06-1981 |
| | | | CA 1181703 A | 29-01-1985 |
| | | | DE 3066115 D | 16-02-1984 |
| | | | EP 0031285 A | 01-07-1981 |
| | | | ES 498476 D | 16-11-1981 |
| | | | ES 8200229 A | 16-01-1982 |
| | | | WO 8400688 A | 01-03-1984 |
| | | | JP 56123918 A | 29-09-1981 |
| | | | US 4389396 A | 21-06-1983 |
| | | | ZA 8007985 A | 27-01-1982 |
| WO 9112813 | A | 05-09-1991 | AU 7477791 A | 18-09-1991 |
| WO 0027432 | A | 18-05-2000 | FR 2785542 A | 12-05-2000 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No

PCT/FR 00/00623

| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K35/74 A61K39/39 A61P37/04 A61P35/00 C07K14/26 //(A61K35/74,38:19) | | |
|---|---|---|
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K C07K | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | FR 2 726 472 A (PF MEDICAMENT) 10 mai 1996 (1996-05-10) SEQ. ID. N°2 page 1; revendications 1-6 --- | 1-3, 6-24, 28-32 |
| X | FR 2 596 064 A (PF MEDICAMENT) 25 septembre 1987 (1987-09-25) page 2, ligne 8 - ligne 13; exemples 1,3 --- | 1-3,5, 7-24, 26-32 |
| A | FR 2 471 785 A (FABRE SA PIERRE) 26 juin 1981 (1981-06-26) le document en entier --- -/-- | 1-4,7, 10,11, 14-16, 23-30 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe | | |
| * Catégories spéciales de documents cités: "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 après la date de dépôt international ou 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 par rapport au document considéré isolément "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 | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 7 juin 2000 | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 14/06/2000 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé Teyssier, B |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/00623

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | WO 91 12813 A (MCCALL CATHERINE ANNE ; YUNIS ADEL A (US); JIMENEZ JOAQUIN J (US)) 5 septembre 1991 (1991-09-05) ----- | |
| E | WO 00 27432 A (LECOANET SYBILLE ; AUBRY JEAN PIERRE (FR); PF MEDICAMENT (FR); JEAN) 18 mai 2000 (2000-05-18) page 5, ligne 8 - ligne 11 page 8, ligne 29 - page 9, ligne 14 revendications 21-24 ----- | 1-3, 6-24, 28-32 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 00/00623

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| FR 2726472 A | 10-05-1996 | AU 714423 B | 06-01-2000 |
| | | AU 4119996 A | 31-05-1996 |
| | | CA 2204510 A | 17-05-1996 |
| | | EP 0791063 A | 27-08-1997 |
| | | WO 9614415 A | 17-05-1996 |
| | | JP 10508595 T | 25-08-1998 |
| | | ZA 9509416 A | 06-06-1996 |
| FR 2596064 A | 25-09-1987 | AT 79037 T | 15-08-1992 |
| | | AU 7009387 A | 24-09-1987 |
| | | DE 3780843 A | 10-09-1992 |
| | | DE 3780843 T | 24-12-1992 |
| | | EP 0238407 A | 23-09-1987 |
| | | ES 2051759 T | 01-07-1994 |
| | | GR 3005567 T | 07-06-1993 |
| | | JP 1124396 A | 17-05-1989 |
| FR 2471785 A | 26-06-1981 | AT 5797 T | 15-01-1984 |
| | | AU 538896 B | 30-08-1984 |
| | | AU 6558880 A | 25-06-1981 |
| | | CA 1181703 A | 29-01-1985 |
| | | DE 3066115 D | 16-02-1984 |
| | | EP 0031285 A | 01-07-1981 |
| | | ES 498476 D | 16-11-1981 |
| | | ES 8200229 A | 16-01-1982 |
| | | WO 8400688 A | 01-03-1984 |
| | | JP 56123918 A | 29-09-1981 |
| | | US 4389396 A | 21-06-1983 |
| | | ZA 8007985 A | 27-01-1982 |
| WO 9112813 A | 05-09-1991 | AU 7477791 A | 18-09-1991 |
| WO 0027432 A | 18-05-2000 | FR 2785542 A | 12-05-2000 |