(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 625 100**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **87 18181**

(51) Int Cl⁴ : A 61 K 39/21.

(12) DEMANDE DE CERTIFICAT D'ADDITION À UN BREVET D'INVENTION A2

(22) **Date de dépôt** : 24 décembre 1987.

(30) **Priorité** :

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande** : BOPI « Brevets » n° 26 du 30 juin 1989.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés** : 1re addition au brevet 86 03572 pris le 13 mars 1986.

(71) **Demandeur(s)** : *LURHUMA Zirimwabagabo.* — ZR.

(72) **Inventeur(s)** : Zirimwabagabo Lurhuma.

(73) **Titulaire(s)** :

(74) **Mandataire(s)** : Cabinet Regimbeau, Martin, Schrimpf, Warcoin et Ahner.

(54) Utilisation d'antigènes pour la préparation de vaccins, protéine rendue immunogène et composition pharmaceutique la comportant.

(57) La présente invention concerne l'utilisation d'un ou de plusieurs antigènes pour la préparation de vaccins selon la revendication 17 du brevet principal, caractérisée en ce que le ou les antigènes sont constitués de protéines non immunogènes du fait de leur poids moléculaire trop faible.

La présente invention concerne aussi cette protéine rendue immunogène par fixation sur un support ainsi que la composition pharmaceutique comportant ladite protéine.

FR 2 625 100 - A2

La demande de brevet principal concerne un produit utile pour la détermination d'un antigène particulier, ledit produit comportant une particule sur laquelle est fixé au moins un anticorps spécifique dudit antigène particulier.

La présente invention concerne plus particulièrement certains antigènes particuliers qui ont pu être mis en évidence au moyen du produit décrit dans la demande de brevet principal ; la présente addition concerne en effet les antigènes constitués de protéines non immunogènes du fait de leur poids moléculaire trop faible.

On s'est aperçu, lors d'essais pharmacodynamiques, que des protéines élaborées à partir de virus du sida ou d'autres maladies notamment tropicales, n'étaient pas efficaces, à savoir, n'engendraient pas la formation d'anticorps neutralisant l'attaque virale.

Cette inefficacité peut être attribuée au caractère hapténique des antigènes utilisés pour la préparation des vaccins.

C'est pourquoi la présente invention concerne l'utilisation d'un ou de plusieurs antigènes pour la préparation de vaccins, caractérisée en ce que le ou les antigènes sont des protéines non immunogènes du fait de leur poids moléculaire trop faible.

Divers antigènes peuvent être utilisés et seront le plus souvent isolés à partir du sérum de malades.

C'est ainsi que des petites molécules antigéniques ont été isolées par chromatographie d'affinité à partir du sérum de malades atteints du sida (on utilise pour cela les immunoglobulines G (Ig G) d'un patient séro-positif que l'on a préalablement fixées sur du sépharose aminé selon le procédé décrit dans le brevet principal.

On a notamment isolé la protéine p24, à savoir la protéine de noyau ("core") GAG du retrovirus responsable de syndrome d'immuno-déficience acquise (SIDA).

Cette protéine P24 est connue et a déjà fait l'objet de nombreuses publications (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82 (1985) Nov., No. 22, Washington, DC, USA).

Mais d'autres protéines, non immunogènes, peuvent être utilisées dans le cadre de la présente invention.

Pour être utilisées selon la présente invention, les protéines doivent être rendues immunogènes par fixation sur un support qui, de préférence, est choisi parmi les molécules permettant de générer les immunités à médiation cellulaire et/ou les immunités à médiation humorale.

Un support tout particulièrement préféré dans le cadre de la présente invention est constitué par une anatoxine par exemple l'anatoxine tétanique.

Un avantage supplémentaire obtenu lors de l'utilisation de l'anatoxine tétanique est que le vaccin obtenu pourra être utilisé en outre pour prévenir le tétanos.

La fixation de la ou des protéines antigéniques sur un tel support peut être effectuée par tous les moyens connus de l'homme de l'art. Elle sera, de préférence effectuée par l'intermédiaire d'un couplage, notamment à l'aide d'une molécule bifonctionnelle telle que le glutaraldéhyde.

C'est ainsi que la protéine P24 isolée à partir de malades atteints du sida a été concentrée à 4,6 mg/ml.

A 1 millilitre de cette concentration, on a ajouté 50 microlitres de glutaraldéhyde à 1 % dans l'eau, puis un millilitre d'anatoxine tétanique concentrée à 4,6 mg/ml.

Après incubation pendant environ 2 heures à température ambiante et dialyse contre une solution de PBS à pH 7,4, on obtient une composition pharmaceutique.

De façon étonnante, cette composition pharmaceutique s'est révelée être, non seulement efficace à titre préventif (il s'agit alors d'un vaccin) mais aussi à titre curatif.

Dans le cadre de l'immunisation, on a, par exemple, utilisé 0,5 ml de la composition pharmaceutique telle qu'elle a été préparée ci-dessus.

On l'a mélangée à 1 ml de phosphate d'alumine et on a injecté le tout par voie IM chez le mouton.

On réalise une piqûre hebdomadaire et on effectue une saignée toutes les deux semaines.

Après deux piqûres, c'est-à-dire au quatorzième jour, le mouton présente déjà des anticorps précipitants (réaction d'Ouchterlony) et agglutination de latex recouvert du virus HIV ou de protéines virales obtenues à partir de surnageant de culture de cellules infectées par le HIV).

Après la quatrième piqûre (saignée au jour 28), les anticorps présentent une très grande affinité pour le virus HIV et les antigènes viraux solubles (réaction d'agglutination au latex).

Six semaines après le début de l'immunisation, le mouton produit des anticorps neutralisants.

Dans le but d'illustrer la présente invention, les exemples suivants présentent une partie des essais réalisés lors de l'élaboration à partir de la protéine P24 du vaccin contre le sida.

EXEMPLE 1

Isolement d'antigènes purifiés :

- Chromatographie d'affinité :

Du facteur rhumatoïde, isolé par précipitation des euglobulines, a été fixé sur du sépharose 4B aminé par la glutaraldéhyde.

Ce réactif a été incubé avec des sérums de patients atteints de SIDA contenant des complexes immuns solubles.

Après lavage jusqu'à ce que les liquides de lavage ne contiennent plus de protéines ($D.O_{280\ nm} = 0$), on élue avec du tampon glycine - HCL 0,1 M, pH 2,8.

- Fractionnement par chromatographie sur gel

L'éluat concentré a été fractionné par du Sephadex G_{200} sur colonne équilibrée par le même tampon que celui de l'élution (glycine-HCL 0,1 M pH 2,8).

Par lecture à 280 nm en U.V. on obtient deux pics.

Après dialyse de chaque pic contre du NaCl 0,9 % et concentration, on recherche la présence d'Ig G humaines par contre-électrophorèse et par ouchterlony.

Le pic ne contenant pas d'Ig G est mélangé à de l'adjuvant complet de Freund 0,5/0,5 ml et injecté à un mouton à raison d'une piqûre par semaine.

Après plus de 6 mois d'observation, le mouton n'a pas produit d'anticorps précipitants par réaction un gel (Ouchterlony) et le mouton est mort en état de cachexie faisant penser au SIDA humain.

EXEMPLE 2

Isolement de complexes antigène - anticorps par cryoprécipitation.

Des sérums de malades atteints de SIDA ont été laissés pendant au moins 4 jours à 4°C. Il se forme un précipité visible à l'oeil nu. Après centrifugation à froid, on recueille le précipité, on le lave 3 à 4 fois avec du NaCl froid (4°C). Ce précipité est resuspendu dans du NaCl froid. Il est mélangé à de l'adjuvant complet de Freund (cf. supra) et injecté à un mouton.

Ce mouton n'a pas non plus produit d'anticorps précipitants et il est mort en état de cachexie avec des manifestations cliniques faisant penser au SIDA.

REMARQUES :

Pour vérifier que le précipité à froid était constitué de complexes immuns solubles, on l'a dialysé contre un tampon acide (cf., supra) et on observe une redissolution.

EXEMPLE 3

Immunisation par des complexes immuns rendus insolubles

On insolubilise des Ig G anti HIV sur des particules de latex (réaction d'agglutination - Cf demande de brevet principal).

Les agglutinats obtenus lors des tests de divers sérums sont recueillis et lavés plusieurs fois avec du NaCl 0,9 %, puis mélangés à l'adjuvant complet de Freund et injectés à un mouton. Au bout de 4 semaines, on note que le mouton a produit des anticorps anti-HIV et anti-Ig G humaines précipitant en Ouchterlony. Six mois après la dernière injection, le test des anticorps neutralisants était positif.

REMARQUES :

L'analyse par Western Blot du contenu antigénique des agglutinats a montré qu'il s'agissait essentiellement de la protéine p24 et d'autres protéines plus petites du "Core" du virus, donc ce sont des protéines de faibles poids moléculaires qui constituent les antigènes des complexes immuns.

Vu leurs petits poids moléculaires ces protéines sont peu immunogènes et de ce fait elles induisent la production d'anticorps de faible affinité.

Pour vaincre cet effet hapténique il faut alors les coupler à un support ou leur conférer un haut poids moléculaire par l'insolubilisation (voir supra).

EXEMPLE 4

Couplage des protéines à un support :

Par la méthode de la glutaraldéhyde, des protéines éluées par chromatographie d'affinité (anticorps anti-HIV, couplés au sépharose 4B aminé) sont élués par le thiocyanate d'ammonium 5M après un lavage intensif. ($D.O_{250\ nm} = 0$).

Après dialyse contre le NaCl 0,9 %, l'éluat est concentré jusqu'à 4,6 mg /ml puis couplé à l'anatoxine tétanique concentré à 4,6 mg/ml par de la glutaraldéhyde 1 % dans l'eau après une incubation pendant 2 heures.

Un mouton est ensuite immunisé hebdomadairement par 0,5 ml de ce réactif mélangé à 0,5 ml de phosphate d'aluminium.

Après 4 semaines d'immunisation le mouton a produit des anticorps précipitants, mais non neutralisants, mais un test effectué deux semaines plus tard c'est-à-dire six semaines après le début de l'immunisation a montré la présence d'anticorps neutralisants.

REMARQUES :

Un mouton non traité n'a pas produit d'anticorps, de même un mouton auquel on a injecté des antigènes trypanasomiaux, n'a pas produit d'anticorps.

Un mouton ayant reçu du virus entier n'a pas, non plus, produit d'anticorps neutralisants.

EXPERIENCE DE PROVOCATION.

On a injecté le virus entier à un mouton immunisé par les complexes immuns insolubilisés.

Après trois mois d'observation il ne présente pas de signe clinique de maladie alors qu'un autre mouton soumis à la même expérience, mais non préalablement immunisé est mort après trois mois et demi et manifestait déjà des signes cliniques après deux mois.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un ou de plusieurs antigènes pour la préparation de vaccins selon la revendication 17 du brevet principal, caractérisée en ce que le ou les antigènes sont constitués de protéines non immunogènes du fait de leur poids moléculaire trop faible.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'antigène est la protéine P24.

3. Protéine selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est rendue immunogène par fixation sur un support.

4. Protéine selon la revendication 3, caractérisée en ce que le support stimule l'immunité à médiation humorale et/ou l'immunité à médiation cellulaire.

5. Protéine selon la revendication 4, caratérisée en ce que le support est une anatoxine.

6. Protéine selon la revendication 5, caractérisée en ce que le support est l'anatoxine tétanique.

7. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite fixation sur un support est effectuée par l'intermédiaire d'un couplage.

8. Protéine selon la revendication 7, caractérisée en ce que le couplage est réalisé à l'aide d'une molécule bifonctionnelle.

9. Protéine selon la revendication 8, caractérisée en ce que la molécule bifonctionnelle est le glutaraldéhyde.

10. Composition pharmaceutique comportant la protéine P24 selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est destinée à une thérapeutique préventive et/ou curative.

11. Composition selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin.