PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 :		(11) Numéro de publication internationale:
A61K 39/39, 39/29	A1	WO 96/19237
		(43) Date de publication internationale: 27 juin 1996 (27.06.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01697

(22) Date de dépôt international: 19 décembre 1995 (19.12.95)

(30) Données relatives à la priorité:
94/15425 21 décembre 1994 (21.12.94) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: VACSYN S.A. [FR/FR]; "Les Chevrons", 33, boulevard du Général-Martial-Valin, F-75015 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement)*: CHEDID, Louis [FR/FR]; 18, rue Gaston-de-Caillavet, F-75015 Paris (FR). AUDIBERT, Françoise [FR/FR]; 22, rue Emeriau, F-75015 Paris (FR).

(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: ENHANCED IMMUNOGENIC VACCINE

(54) Titre: VACCIN PRESENTANT UNE IMMUNOGENICITE ACCRUE

(57) Abstract

Vaccines, composed of antigens absorbed on alum or formulated in an alum-containing composition, have enhanced immunogenicity over existing vaccines. The vaccines of the invention are characterized by their combination with 2-120 μg per kg or 0.1-6 mg by dose, preferentially 6-60 μg per kg or 0.3-3 mg by dose of a hydrosoluble muramyl peptide.

(57) Abrégé

Vaccins composés d'antigènes absorbés sur alum ou formulés dans une composition contenant de l'alum présentant une immunogénicité accrue comparée à celle des vaccins existant et caractérisés en ce qu'ils sont associés à 2 à 120 μg par kg ou 0,1 à 6 mg par dose préférentiellement entre 6 et 60 μg par kg ou 0,3 à 3 mg par dose d'un muramyl peptide hydrosoluble.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

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

AT	Autriche	**GB**	Royaume-Uni	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GE**	Géorgie	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
FR	France	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

VACCIN PRESENTANT UNE IMMUNOGENICITE ACCRUE

La présente invention concerne un perfectionnement aux vaccins contenant de l'alum dans leurs compositions et dans lesquels l'antigène peut être partiellement ou totalement absorbé sur alum. Le perfectionnement consiste en l'association dans la composition constitutive de ces vaccins de 2 à 120 µg par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose, de muramyl peptide ; ces vaccins ainsi perfectionnés ont notamment l'avantage de conférer une immunité accrue de telle façon que le nombre d'injections nécessaires à l'immunisation soit réduit. Les seuls immuno adjuvants actuellement utilisés dans les vaccins humains sont les composés à base d'aluminium tels que l'hydroxyde ou les phosphates d'aluminium (alum).

C'est le cas notamment de différents vaccins dont le principe actif est constitué d'un antigène obtenu par recombinaison génétique in vitro, tel Havrix, vaccin contre l'hépatite A dont le principe actif est un antigène obtenu à partir d'une souche du virus de l'hépatite A cultivée en culture cellulaire, et contenant de l'hydroxyde d'aluminium à raison de 1,5 mg par dose (0,5 mg d'aluminium) et commercialisé par la société Smith Kline & French (6, Esplanade Charles De Gaulle, 92731 Nanterre Cedex) sous la dénomination commerciale d'Havrix. Deux administrations effectuées à un mois d'intervalle permettent d'induire une séroconversion chez 98% des individus.

Trois vaccins recombinants contre le virus de l'hépatite B sont actuellement commercialisés, il s'agit de :

- Genhevac B de Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins (58, avenue Leclerc 69007 LYON FRANCE) lequel vaccin contient au maximum 3,5 mg d'hydroxyde d'aluminium par dose,

- Engerix B, commercialisé par Smith, Kline & French contenant 1,9 mg d'hydroxyde d'aluminium par dose,

- Recombivax HB commercialisé par Merck, Sharp et Dhome contenant 1,5 mg d'hydroxyde d'aluminium par dose.

Les vaccins contre l'hépatite B cités ci-dessus ne sont efficaces qu'après au moins trois injections à 0, 30 et 60 ou 180 jours suivies d'un rappel obligatoire au bout d'un an ; en outre un certain nombre de sujets sont peu répondeurs ou non répondeurs. Dans la population totale ils représentent environ 5% et la capacité d'obtenir une séroconversion dépend beaucoup de l'âge du sujet, elle est déjà significativement plus faible à partir de 30-35 ans. De plus il existe des groupes particulièrement peu répondeurs, ce sont les hémodialysés (30 à 45% de cette population) et les transplantés rénaux dont 75 à 95% d'entre eux ne répondent pas aux vaccins. Différents travaux ont étudié cette résistance à l'immunisation par des vaccins anti hépatite B : il faut citer les travaux de Stevens et al (1) Zachoval et al (2) Grob PJ et al (3). Ce problème de non réponse à un vaccin contre l'hépatite B devient extrêmement grave dans les pays où l'endémie de cette infection virale est importante, et où environ 5% de la population représente un nombre d'individus considérable, elle est en outre particulièrement critique dans les populations à risques telles les hémodialysés qui sont justement amenés à subir de nombreuses transfusions sanguines avec les risques de contamination virale subséquents. Enfin le fait d'avoir à pratiquer au minimum trois injections suivi d'un rappel pour immuniser les patients répondeurs, la quatrième injection venant un an après la première, représente un suivi particulièrement difficile et à risques.

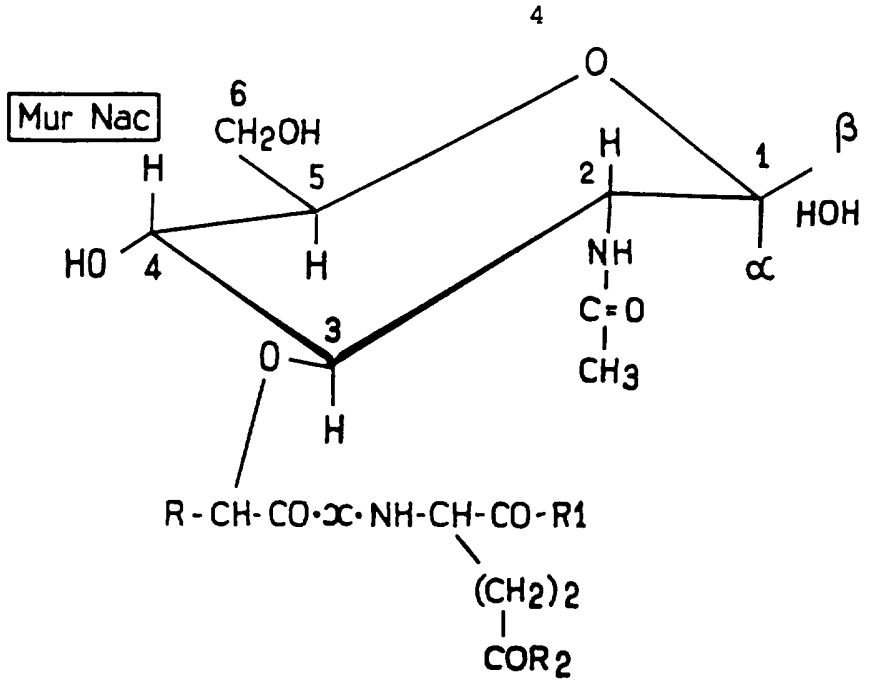
Le problème de la mise au point d'un vaccin qui puisse d'une part conférer aux non répondeurs existants une immunisation contre une infection au virus de l'hépatite et d'autre part permettre de diminuer le nombre de doses vaccinantes chez des répondeurs normaux permettant un suivi et une prophylaxie beaucoup plus rigoureuse dans les zones endémiques ou les populations à risque s'avère une nécessité médicale.

Un autre problème posé pour la prophylaxie des hépatites dans les zones endémiques est la constitution d'un vaccin mixte contre les différentes hépatites et notamment les hépatites A et B. Aujourd'hui la double vaccination contre les hépatites A et B nécessite six injections

dont quatre pour l'hépatite B et deux pour l'hépatite A ; aussi la prophylaxie des hépatites serait avantageusement améliorée par :

- l'amélioration du pouvoir immunogène des vaccins recombinants contre l'hépatite B,
- l'existence d'un vaccin mixte hépatite B + hépatite A permettant en un nombre minimum d'injections d'obtenir une immunisation contre l'infection par ces deux virus ce qui aujourd'hui est impossible compte tenu du pouvoir immunisant des vaccins actuels contre l'hépatite B,
- la possibilité d'immuniser les sujets non répondeurs,
- la possibilité d'établir une prophylaxie après 1 ou 2 injections chez des répondeurs normaux,
- la possibilité d'établir une prophylaxie ou une immunisation quand le principe actif du vaccin est un haptène ou de façon plus générale une molécule difficilement immunogène.

Certains muramyl peptides comme le murabutide ou Nac-Mur-L-Ala-D-Gln-n-méthyl-ester et le Muramétide ou Nac-Mur-L-Ala-D-Gln méthyl ester ont déjà été développés en essais précliniques d'efficacité et de toxicité aiguë, subaiguë et chronique ainsi que dans des essais de phase 1 chez l'homme ; une excellente tolérance a été démontrée suite à une administration à plus de 200 sujets pour le Murabutide et 50 sujets pour le Murametide. Afin de résoudre le problème posé ci-dessus d'améliorer les vaccins notamment ceux existant contre l'hépatite B ou de créer un vaccin mixte contre les hépatites présentant une immunogénicité accrue permettant de réduire le nombre d'injections d'une part et de protéger contre une infection des sujets qui étaient jusqu'à présent non répondeurs avec les vaccins classiques d'autre part, les inventeurs ont eu l'idée d'associer des muramyls peptides aux vaccins existants dont les antigènes sont formulés en présence d'alum. Les doses adjuvantes contiennent une quantité comprise entre 2 et 120 µg par kg de poids corporel, ou 0,1 à 6 mg par dose unitaire de muramyl peptide hydrosoluble de formule :



(1)

dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyl ; X est un résidu L-alanyl ou L-thréonyl, et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, $O(CH2)_xH$ avec $_x$ = 1, 2, 3 ou 4, étant entendu que, lorsque X est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $O(CH2)_xH$ tel que précédemment défini. Plus particulièrement encore le muramyl peptide de l'invention est l'un de ceux entrant dans la formule ci-dessus dans laquelle le groupe R est un groupe méthyl et le groupe R2 est un groupe NH2.

Dans cette formule les dérivés de MDP préférés sont le murabutide, le muramétide, le muradimétide ou le MDP-thréonyle. Un autre dérivé du MDP est également préféré est le MDP-L-Lys-GDP (Nac-Mur-L-Lys-D-iso Gln glyceryl-sn-dipalmitoyl) qui a la propriété d'être hydrosoluble.

Les doses adjuvantes préférées sont de 6 à 60 µg par kg corporel soit, pour une personne de 50 kg de 0,3 à 3 mg par dose vaccinante.

La combinaison d'un dérivé du MDP tel que décrit ci-dessus avec un vaccin hépatite B contenant des antigènes obtenus par recombinaison génétique et absorbés sur hydroxyde d'aluminium (Alum) est particulièrement intéressante :

- soit pour l'obtention d'un vaccin hépatite B recombinant efficace en deux injections au lieu des trois ou quatres aujourd'hui nécessaires dans les vaccins existants,

- soit pour formuler un vaccin mixte notamment hépatite A + hépatite B, permettant de vacciner une population avec un nombre restreint d'injections,

- soit d'immuniser des populations qui étaient jusqu'alors constituées de sujets non répondeurs au vaccin existant, et notamment les hémodialysés ou les transplantés rénaux.

L'invention est donc relative aux vaccins hépatite absorbés sur alum et améliorés par l'association de 2 à 120 µg par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose vaccinante, préférentiellement de 6 à 60 µg par kg ou 0,3 à 3 mg par dose soit d'un composé de formule (I), soit le MDP-Lys-GDP.

Les vaccins de l'invention peuvent en particulier être améliorés par un dérivé de formule (I) dans lequel

- le groupe R est un groupe méthyl, et

- le groupe R_2 est un groupe NH_2,

et plus particulièrement encore le murabutide, le muramétide, le muradimétide, le MDP-thréonine ou le MDP-Lys-GDP.

Un vaccin selon l'invention est caractérisé en ce qu'il contient un antigène de l'hépatite B recombinant ; il peut s'agir :

- soit d'un vaccin hépatite B

- soit d'un vaccin mixte hépatite A+B

- soit de tout autre vaccin mixte, pourvu qu'il contienne l'antigène recombinant contre l'hépatite B.

Les vaccins contre l'hépatite B de l'invention contiennent préférentiellement comme antigène vaccinant la région S et tout ou partie de la région pré-S, en particulier la région pré-S2 de l'antigène de surface du virus.

L'invention est également relative à un procédé de fabrication d'un vaccin présentant une immunogénicité accrue caractérisée en ce que ledit vaccin est constitué d'antigènes absorbés sur alum ou formulés dans une

composition contenant de l'alum. et dans laquelle sont ajoutés 2 à 120 µg par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose vaccinante, préférentiellement entre 6 et 60 µg par kg ou 0,3 à 3 mg par dose vaccinante de muramyl peptide de formule (I) ci-dessus ou le MDP-Lys-GDP.

Avantageusement le dérivé du muramyl peptide est choisi parmi le muramétide, le murabutide, le muradimétide, le MDP thréonyle. Le procédé de l'invention permet de fabriquer des compositions vaccinantes améliorées contre l'hépatite B, et permet également de fabriquer des compositions vaccinantes mixtes permettant de vacciner une population à la fois contre le virus de l'hépatite B ou tout vaccin mixte pourvu qu'il contienne l'antigène recombinant contre l'hépatite B et notamment un vaccin mixte hépatite A+B ou hépatite A+B+C, dès lors que leur formulation contienne de l'alum.

Enfin l'invention est relative à l'utilisation de 2 à 120 µg par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose et de préférence de 6 à 60 µg par kg de poids ou 0,3 à 3 mg par dose vaccinante d'un muramyl peptide de formule (1) ci-dessus ou de MDP-Lys-GDP, pour améliorer l'immunogénicité d'un vaccin composé d'antigènes recombinants absorbés sur alum ou formulés dans une composition contenant de l'alum. Cette utilisation s'applique tout particulièrement au vaccin recombinant contre l'hépatite B, ou à un vaccin mixte pourvu qu'il contienne l'antigène recombinant contre l'hépatite B et notamment un vaccin mixte hépatite A+B ou hépatite A+B+C, dès lors que leur formulation contienne de l'alum. Dans cette utilisation, sont plus particulièrement préférés le murabutide, le muramétide, le muradimétide et le MDP thréonyle.

La vaccination à l'égard de molécules de petites tailles, comme les haptènes, est problématique compte tenu de leur faible immunogénicité. Afin de stimuler cette dernière, l'haptène peut être couplé à une molécule porteuse (« carrier » en anglais) ; mais le risque est de provoquer une réponse à l'encontre de la molécule porteuse au détriment de l'haptène. L'utilisation de 0,1 à 6 mg par dose vaccinante, et de préférence 0,3 à 3 mg de muramylpeptides de formule (1) ou de MDP-Lys-GDP dans la

fabrication d'un vaccin comprenant au moins un haptène comme antigène vaccinant fait également partie de l'invention, ainsi que les vaccins contenant comme immunogène au moins un haptène couplé ou non à une molécule porteuse.

Les vaccins comprenant au moins un haptène et au moins un antigène recombinant, l'un d'entre eux étant absorbés sur alum, associés à un dérivé de muramyl peptide, font partie de l'invention.

Comme le montrent les exemples ci-dessous, non limitatifs et les figures, l'association d'un dérivé de formule (I) ou du MDP-Lys-GDP à l'alum d ans une composition vaccinante a pour effet d'induire :

1) des cellules T spécifiques : Il est connu que les cellules T capables de proliférer en présence de l'antigène qui ont donc été sensibilisées spécifiquement à celui-ci sont les cellules responsables de l'établissement de la mémoire immunitaire. C'est grâce à elles que l'individu vacciné peut répondre immédiatement à une agression par le virus vis-à-vis duquel il a cherché à acquérir une protection. Il est donc capital de proposer un vaccin capable non seulement d'induire durablement des anticorps mais également des cellules T mémoire. Ceci permet aux individus vaccinés de bénéficier de deux lignes de défenses immunitaires.

2) une synthèse accrue d'anticorps spécifiques : Cette synthèse accrue se fait au détriment de la synthèse d'IgE qui sont connues pour les risques qu'elles entraînent de provoquer des réactions de nature allergiques. Les exemples suivants illustrent la capacité des divers muramyl peptides de donner un effet de synergie avec l'alum.

3) d'induire une réponse spécifique contre un haptène utilisé comme immunogène dans un vaccin.

Dans tout ce qui précède, ces effets sont plus particulièrement induits quant le rapport poids/poids entre l'alum et les muramylpeptides reste à l'intérieur d'une certaine fourchette qui est de 0,15 à 35 et de préférence 1 et ~~15~~ 10 . Ce rapport est calculé sur les quantités suivantes par dose vaccinante :

- 1 à 3,5 mg d'alum,

- 0,1 à 6 mg de muramylpeptide.

La figure et les exemples ci-après illustrent le perfectionnement apportée par l'invention sans la limiter.

La figure 1 représente la prolifération des cellules T mesurée par incorporation de thymidine tritiée, en fonction de quantité croissante d'antigènes de l'hépatite.

Exemple 1 : augmentation de cellules T spécifiques

L'effet surprenant obtenu, et notamment celui de rendre immunogène un vaccin actuellement non immunogène dans certaines catégories de la population peut être lié à l'augmentation spécifique d'une réponse proliférative des cellules T. Cette augmentation du nombre de cellules T sensibilisées à l'antigène permet aussi d'évaluer le niveau de mémoire immunologique qui a été induit. Ceci est illustré par l'expérience suivante :

Des souris ont été sensibilisées à l'antigène de surface de virus de l'hépatite B ; la prolifération des cellules T a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée après incubation avec l'antigène présent dans le milieu de culture. La figure 1 représente cette réponse dans quatre cas de figure en ce qui concerne l'adjuvant utilisé : a) pas d'adjuvant (carrés blancs); b) de l'alum seul à la dose de 40 µg (triangles noirs); c) du murabutide seul à la dose de 100 µg (cercles blancs) et d) l'association du murabutide à 100 µg et de l'alum à 40 µg (carrés noirs). Les résultats indiqués sur cette figure montrent que l'alum seul est capable d'augmenter la prolifération des cellules T mais que la combinaison avec le murabutide induit une réponse 3 fois plus élevée à celle obtenue en présence d'alum seul comme le montre la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (45000 CPM versus 15000).

Le protocole de cette expérience est le suivant : les souris balb/C ont reçues 5 µg d'antigènes HBS par injection sous cutanée à la base de la queue dans 0,1 ml de tampon PBS avec ou sans adjuvants. Deux semaines plus tard, les lymphocytes T ont été cultivées dans du PBS. ou avec des doses croissantes d'antigènes HBS comme indiqué en abscisse. Après cinq jours la réponse proliférative a été mesurée par incorporation

de thymidine tritiée. Les résultats de la figure (I) sont indiqués comme le nombre de coups moyen par minute dans des triplicates.

Exemple 2 : Effet des murabutides sur la synthèse d'anticorps spécifiques

L'effet de l'addition d'un dérivé de MDP de formule (I) ou de MDP-Lys-GDP en présence d'alum peut également être démontrée par une augmentation relative de la réponse en immunoglobulines spécifiques suite à l'effet vaccinant. Un vaccin recombinant Hépatite B absorbé sur alum a été utilisé. Différentes expériences ont été réalisées soit sur des souris Swiss soit sur des souris Balb/C ; elles démontrent de façon constante l'effet de l'addition de murabutide sur les vaccins Hépatite B absorbés sur alum. De plus, ces expériences ont montré de façon reproductible que le taux des anticorps de type IgG est augmenté tandis que celui des anticorps IgE est diminué indiquant que l'utilisation du muramyl peptide a permis de réduire les risques du type allergique au vaccin.

a) Deux groupes de 40 souris ont été immunisées avec deux injections de vaccin à 1 mois d'intervalle en présence ou en absence de Murabutide. 70% des animaux traités au murabutide ont des titres anticorps (mesurés en utilisant la trousse EIA AUSAB, Laboratoires Abbot) supérieurs à 50 mUI et ceci durant plus de 4 mois, alors que seulement 25% des témoins montrent ce titre, qui de plus est transitoire car il est déjà effondré après 2 mois.

b) Le tableau 1 représente le cumul des résultats obtenus dans 6 expériences similaires. Les titres en anticorps anti-HBS sont exprimés en milli-unités par ml en fonction du temps. Un groupe témoin a reçu deux vaccinations, un deuxième groupe témoin a reçu trois vaccinations et un groupe expérimental a reçu deux injections du vaccin additionné de murabutide.

Tableau 1

Immunisation	Anticorps J20	Anticorps J40	Anticorps J70	Anticorps J140
HBS+alum 2 injections	30	120	170	250
HBS + alum 3 injections	30	120	950	1200
HBS + alum + Murabutide 2 injections	40	300	1500	2600

Les souris swiss (8 par groupe) ont reçu par injection sous-cutanée 1 µg d'antigène HBS et 135 µg d'alum avec ou sans 100 µg de murabutide au jour 0. Elles reçoivent une injection rappel au jour 30. Au jour 60 seul le groupe témoin avec de l'alum et sans murabutide reçoit une troisième injection. Les anticorps sont mesurés par EIA.

Il apparaît clairement que les animaux ayant reçu uniquement deux vaccinations avec le murabutide ont un titre en anticorps supérieur à celui des animaux ayant reçu trois injections du vaccin seul, quant aux contrôles ayant reçus deux injections, le titre de leurs anticorps reste modeste et décroît rapidement.

Ces expériences montrent que l'amélioration des vaccins anti-Hépatites B existants par l'addition d'un muramyl peptide tel que défini dans la formule (I) et plus particulièrement du muramétide, du murabutide, du muradimétide, ou du MDP-Lys-GDP peut permettre de résoudre un problème posé aussi important que de vacciner en 1 ou 2 injections les individus répondeurs et de pouvoir vacciner les populations actuellement résistantes à la vaccination soit naturellement soit à la suite de traitements tels l'hémodialyse ou une transplantation.

Exemple 3 : Effet du murametide sur la synthèse d'anticorps spécifiques

Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant le muramétide et le muradimétide comme il est montré par les expériences suivantes:

Des souris Balb/C (8 par groupe) ont reçu par injection sous cutanée 1 µg d'antigène HBS et 135 µg d'alum avec ou sans 100 µg de

muramétide aux jours 0 et 30. Les anticorps sont mesurés par ELISA aux jours 28 et 54.

Tableau 2

Immunisation	Anticorps J28	Anticorps J54
HBS + alum (Témoin)	35	520
HBS + alum + Muramétide	245	2700

Exemple 4 : Effets du muradimétide et du MDP-Lys-GDP sur la synthèse d'anticorps spécifiques

Dans une expérience séparée effectuée chez des souris Swiss recevant les mêmes doses de vaccin et d'adjuvant que celles indiquées dans l'exemple 3, le muradimétide et le MDP-Lys-GDP ont été capables d'induire des réponses primaires et secondaires 3 à 4 fois plus élevées que celles des témoins.

Tableau 3

Immunisation	Anticorps J21	Anticorps J80
HBS + alum (Témoin)	10	700
HBS + alum + Muradimétide	60	2250
HBS + alum +MDP-Lys-GDP	35	2600

L'invention peut aussi s'appliquer à d'autres antigènes comme le montre l'exemple 5.

Exemple 5 : Efficacité de l'association de Murabutide et de l'alum pour augmenter la réponse humorale à un vaccin βHCG (βHCG conjugué à l'anatoxine tétanique)

L'antigène est un conjugué contenant de la chaîne β de l'hormone choriogonatrope (βHCG) couplée à l'anatoxine tétanique (TT) (20% de

βHCG dans le conjugué). Ce conjugué est destiné à être utilisé comme vaccin contraceptif car les anticorps anti-HCG bloquent l'implantation et le développement de l'oeuf.

Des souris Balb/C (groupes de 8 femelles) ont reçu par voie sous-cutanée 10µg de βHCG conjugué à l'anatoxine. L'antigène a été administré soit seul soit dans une émulsion de Freund's Incomplet (FIA) soit avec alum (200 µg) soit avec du Murabutide (100 µg) soit avec alum et Murabutide. Les anticorps se combinant à HCG ont été mesurés par ELISA au jour 20. Le conjugué βHCG-TT est administré absorbé sur l'alum, et les résultats obtenus indiqués dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4 :

Efficacité de l'association de Murabutide et de l'alum pour augmenter la réponse humorale à un vaccin βHCG

(βHCG conjugué à l'anatoxine tétanique)

Adjuvant	Réponse anticorps au jour 20
Aucun (Témoin)	12.500
FIA (huile)	26.000
Alum	15.500
Murabutide	53.000
Alum + Murabutide	200.000

Il est clair qu'après une seule injection de vaccin absorbé sur alum et, adjuvanté par le Murabutide on obtient des titres très élevés d'anticorps qui reconnaissent l'hormone HCG. Des expériences séparées nous ont montré que ces anticorps sont biologiquement actifs et neutralisent l'activité de HCG.

Les données obtenues dans l'exemple 5 sont très renforcées par celles décrites dans l'exemple 6 ci-dessous :

Exemple 6 : Système haptène-carrier où l'association muramyl peptide/alum permet d'obtenir des titres anticorps élevés mais surtout des

anticorps biologiquement actifs, résultat essentiel pour le succès d'une vaccination

Dans l'exemple 6, la vaccination a pour but d'obtenir des anticorps capables de neutraliser l'activité biologique d'une hormone. Cette hormone est un décapeptide produit par l'hypothalamus et n'est absolument pas immunogène. Même après couplage sur une molécule porteuse « carrier », elle est incapable après plusieurs injections d'induire la production d'un taux notable d'anticorps.

L'hormone considérée appelée Luteineizing Hormone - Releasing Hormone ou LH-RH est synthétisée au niveau central dans l'hypothalamus et à la suite d'une cascade d'interactions, elle contrôle entièrement la synthèse des hormones sexuelles chez le mâle ou la femelle et en particulier la production de la testostérone. Par voie de conséquence, LH-RH contrôle le développement et le fonctionnement des testicules, de la prostate et des vésicules séminales. Si le taux de LH-RH est faible mais surtout pour ce qui nous intéresse, si son activité est neutralisée par des anticorps biologiquement actifs, il y a diminution du taux de testostérone circulante et involution des organes sexuels. Il a été montré par de nombreux auteurs et dans toutes les espèces testées (souris, rat et cobaye, bétail), qu'un conjugué LH-RH sur l'anatoxine tétanique (LH-RH-TT) ne permet d'obtenir des anticorps biologiquement actifs (c'est-à-dire capables de neutraliser l'activité de LH-RH) que s'il est administré combiné à une préparation adjuvante très puissante. La préparation généralement utilisée est l'adjuvant complet de Freund (FCA) dont il est également bien connu que ses effets secondaires importants interdisent absolument l'utilisation humaine ou vétérinaire. Or il existe des cancers (cancers de la prostate) dont le développement est lié à la sécrétion de testostérone. Il est donc important si l'on veut mettre au point un traitement immunologique par vaccination de ce type de cancer, de trouver une formulation efficace de la LH-RH compatible avec une administration clinique. Le même besoin existe si l'on veut utiliser chez l'animal un vaccin anti-LH-RH afin de provoquer un effet de castration.

L'association muramylpeptide/alum répond à ces exigences comme le démontre l'exemple suivant.

Dans l'expérience décrite, des rats mâles de race Sprague-Dawley et pesant 250 g ont reçu à 30 jours d'intervalle, trois injections de conjugué LH-RH-TT (50 µg). Ce conjugué a été administré :

a) seul,

b) dans un émulsion de FCA,

c) mélangé à 100 µg de muramétide,

d) absorbé sur alum (400 µg),

e) absorbé sur alum et additionné de muramétide.

Les anticorps anti-LH-RH sont mesurés à divers temps au cours de l'expérience ainsi que les taux de testostérone sanguine. Après 130 jours, les animaux sont sacrifiés et leurs organes sexuels prélevés pour l'étude histologique. Les résultats d'une expérience caractéristique sont consignés dans le tableau 5 suivant. Ils montrent que les taux d'anticorps les plus élevés ont été obtenus dans le groupe recevant le FCA mais aussi dans le dernier groupe (alum/muramétide). De façon encore plus intéressante, il n'y a que dans ces deux groupes que l'on observe une baisse considérable du taux de testostérone et une involution des organes sexuels.

Les résultats de l'association Muramétide-Alum sur la production d'anticorps anti-LH-RH biologiquement actifs sont indiqués dans le tableau 5 ci-après :

Tableau 5 :

IMMUNISATION	Titre anticorps anti-LR-RH obtenus par Elisa aux jours				Taux de testostérone en ng/ml serum aux jours				Histologie des organes Ø					
									Testicules		Prostate		Vésicules séminales	
	20	40	70	130	20	40	70	130	Poids moyen (g)	Nombre d'animaux atteints	Taille moyenne (mm)	Nombre d'animaux atteints	Taille moyenne (mm)	Nombre d'animaux atteints
LH-RH-TT	<1000	1200	3800	3200	3,5	1,85	1,50	1,10	2	0/6	2,67	0/6	6,5	0/6
LH-RH-TT + FCA	1000	7500	25000	22000	2,80	0,60	0,20	0,10	0,4	5/6	NT°		NT	
LH-RH-TT + Muramétide	<1000	1100	3500	3500	2,95	1,50	1,35	1,5	1,95	0/6	NT		NT	
LH-RH-TT + Alum	1000	3450	13000	7100	2,70	0,70	0,70	0,80	1,55	1/6	2,8	1/6	5,6	1/6
LH-RH-TT + Alum + Muramétide	1300	9800	28000	15000	2,55	0,50	0,07	0,14	0,5	5/6	2,08	5/6	3,6	5/6

Ø Les organes ont été prélevés puis pesés ou mesurés. Après avoir subi une préparation adéquate, ils ont été soumis à des examens anatomopathologiques. Les lésions observées chez les animaux atteints sont caractéristiques d'une absence de stimulation par la testostérone.

° NT = non testés.

Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant le murabutide ou le MDP-lys-GDP associés à l'alum.

Les exemples 5 et 6 décrits ci-dessus montrent que l'association de muramyl peptides avec des antigènes absorbés sur alum est particulièrement avantageuse dans le cas où le principe vaccinant est un haptène nécessitant le couplage à une molécule porteuse. Ce cas peut se présenter quant le principe vaccinant est un peptide, une protéine peu immunogène ou un sucre.

Sur la base de ces résultats, l'homme du métier peut facilement envisager la réalisation de vaccins polyvalents contenant, outre un haptène, un autre antigène vaccinant, à partir du moment où l'une des molécules vaccinantes est absorbée sur alum et où la conjonction vaccinante contient-un dérivé du MDP selon l'invention.

REFERENCES

(1) Stevens, C.E., Goodman, A.I., Szmuness, W., Weseley, S.A., Fotino, M. Hepatitis B. vaccine : immune responses in haemodialysis patients. The Lancet 1980, ii; 1211-1213.

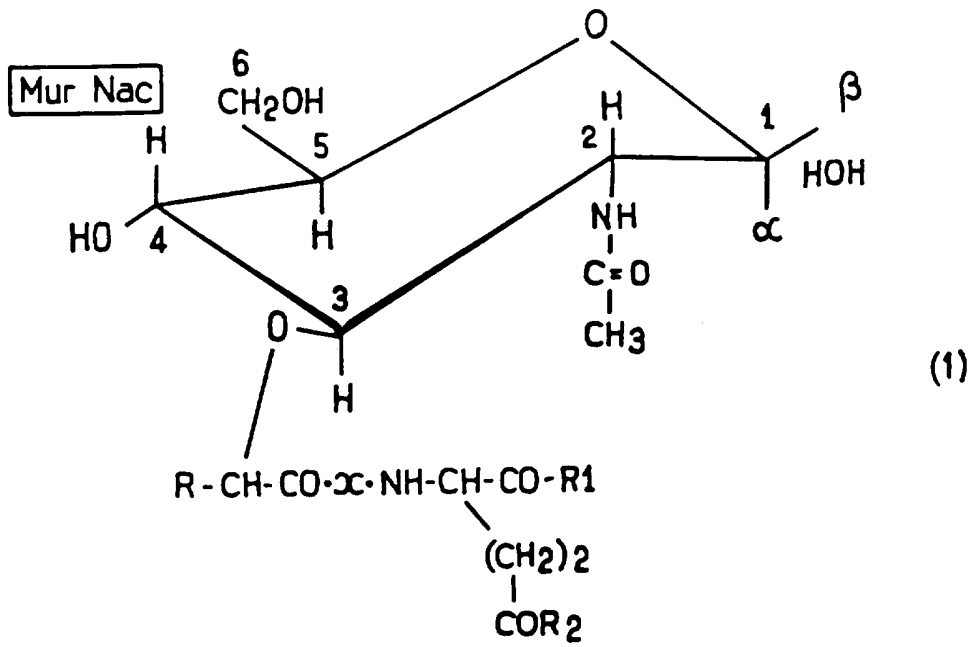
(2) Zachoval, R., Frosner, G., Deinhardt, F. Impfung gegen Hepatitis B. Ergehnisse einer Immunogenitätsstudie. Münchner medizinische Wochenschrift 1981, 123:1506-1508.

(3) Grob, P.J., Binswanger, U., Zaruba, K., Joller-Jemelka, H.I., Schmid, M., Häcji, W., Blumberg, A., Abplanalp, A., Herwig, W., Iselin, H. Descoeudres, C. Immunogenicity of hepatitis B subunit vaccine in hemodialysis and in renal transplant recipients. Antiviral Research 1983, 3:43-52.

Revendications

1. Vaccins composés d'antigènes absorbés sur alum ou formulés dans une composition contenant de l'alum présentant une immunogénicité accrue comparée à celle des vaccins existants et caractérisés en ce qu'ils sont associés à 2 à 120 µg par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose vaccinante :

- soit d'un muramyl peptide de formule :



(1)

dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyl ; X est un résidu L-alanyle ou L-thréonyle, et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, $O(CH_2)_xH$ avec $_x$ = 1, 2, 3 ou 4, étant entendu que, lorsque X est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $O(CH_2)_xH$ tel que précédemment défini.

- soit le MDP-Lys-GDP - (II)

2. Vaccins selon la revendication 1 caractérisé en ce que la dose vaccinante contient 6 à 60 µg par kg de poids corporel ou 0,3 à 3 mg par dose vaccinante d'un composé de formule (I) ou (II).

3. Vaccins selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le muramyl peptide est l'un de ceux entrant dans la formule de la revendication 1 dans laquelle :

- le groupe R est un groupe méthyl. et

- le groupe R_2 est un groupe NH_2

4. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le muramyl peptide est choisi parmi le murabutide, le muramétide, le muradimétide ou le MDP-thréonine.

5. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qui le vaccin permet la prophylaxie simultanée des hépatites A, B et C.

6. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qui le vaccin permet la prophylaxie simultanée des hépatites A et B.

7. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qui le vaccin permet la prophylaxie de l'hépatite B, notamment chez les hémodialysés, les transplantés rénaux ou autres sujets mauvais répondeurs aux vaccinations classiques.

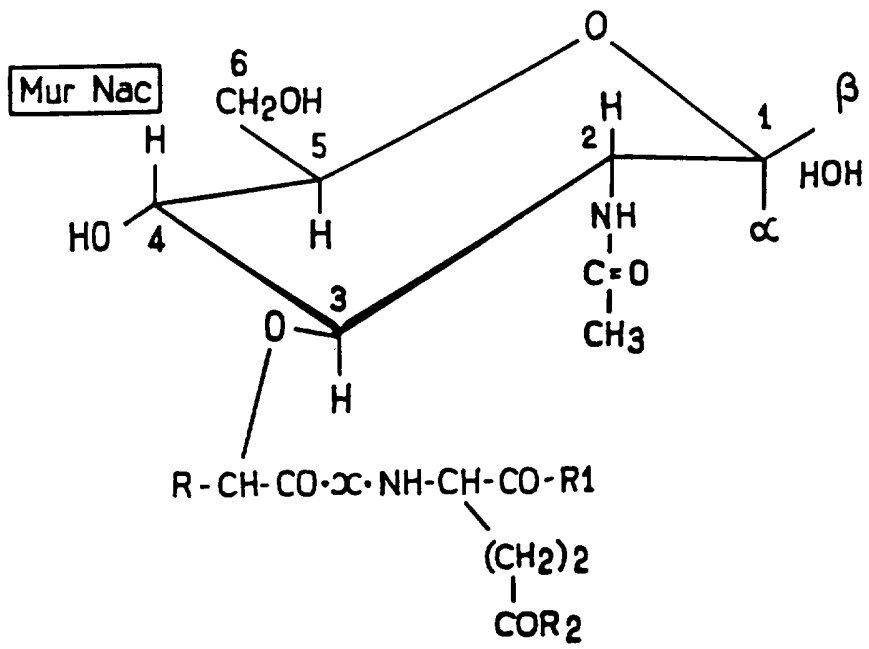
8. Vaccin selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'antigène est constitué de la région S et tout ou partie de la région pré-S de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B.

9. Vaccin selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le rapport poids d'alum par rapport au poids du dérivé de muramylpeptide est compris entre 0,15 et 35.

10. Vaccin selon la revendication 9 caractérisé en ce que le rapport poids d'alum par rapport au poids du dérivé, de muramylpeptide est compris entre 1 et 10.

11. Procédé de fabrication d'un vaccin présentant une immunogénicité accrue, ledit vaccin étant constitué d'antigènes absorbés sur alum ou formulés dans une composition contenant de l'alum, caractérisé en ce la composition contient en outre 2 à 120 µg par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose vaccinante :

- soit d'un muramyl peptide de formule (I)



(1)

- soit du MDP-Lys-GDP (II)

dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyl ; X est un résidu L-alanyle ou L-thréonyle, et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyles, amino, $O(CH2)_xH$ avec $_x$ = 1, 2, 3 ou 4, étant entendu que, lorsque X est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $O(CH2)_xH$ tel que précédemment défini.

12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que la dose vaccinante contient 6 à 60 µg par kg ou 0,3 à 3 mg par dose d'un composé de formule (I) ou (II).

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le muramyl peptide est l'un de ceux entrant dans la formule de la revendication dans laquelle :

- le groupe R est un groupe méthyl, et
- le groupe R_2 est un groupe NH_2

14. Procédé selon la revendication 11 à 13 caractérisé en ce que muramyl peptide est choisi parmi le murabutide, le muramétide, le muradimétide ou le MDP-thréonine.

15. Procédé selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisé en ce que le vaccin est choisi parmi :

- un vaccin anti-hépatite B,

- un vaccin mixte contenant au moins un antigène spécifique du virus de l'hépatite B,

- un vaccin mixte contenant au moins un haptène couplé ou non à une molécule porteuse.

16. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'antigène spécifique du virus de l'hépatite B est un antigène recombinant.

17. Utilisation de 2 à 120 par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose vaccinante d'un muramyl peptide de formule (I) ou (II) dans la fabrication d'un vaccin composé d'antigènes absorbés sur l'alum ou formulés dans une composition contenant de l'alum.

18. Utilisation de 2 à 120 par kg de poids corporel ou 0,1 à 6 mg par dose vaccinante d'un muramyl peptide de formule (I) ou (II) dans la fabrication d'un vaccin contenant au moins un haptène couplé ou non à une molécule porteuse absorbé sur alum ou formulé dans une composition contenant de l'alum.

19. Utilisation selon la revendication 18 caractérisée en ce que ledit vaccin contient au moins un haptène et antigène recombinant.

20. Utilisation selon les revendications 17 à 19 caractérisée en ce que le muramyl peptide est l'un de ceux entrant dans la formule (I) dans laquelle:

- le groupe R est un groupe méthyl, et

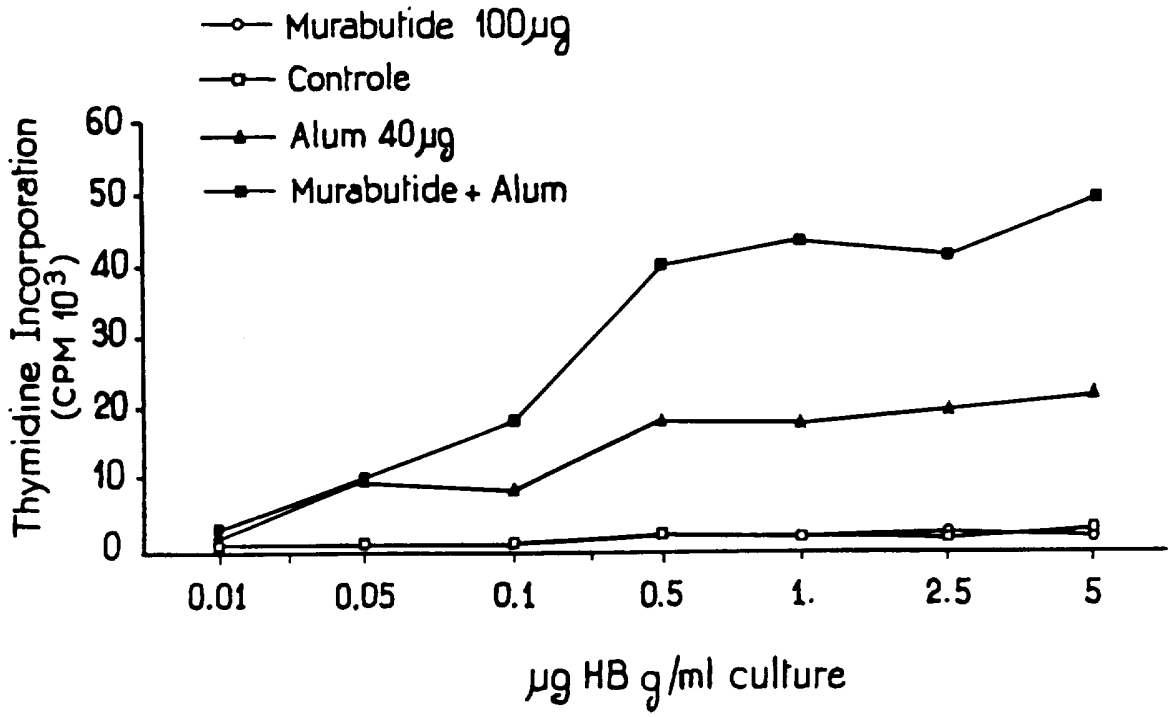
- le groupe R_2 est un groupe NH_2

21. Utilisation selon l'une des revendications ~~16~~ 17 ~~ou~~ à ~~17~~ 20 caractériséee en ce que le muramyl peptide est choisi parmi le muramétide, le murabutide, le muradimétide ou le MDP-Thréonine.

22. Utilisation selon l'une des revendications 17 à 20 caractérisé en ce que le vaccin permet une prophylaxie d'une hépatite chez les patients non répondeurs ou mauvais répondeurs aux vaccins usuels, notamment chez les hémodyalisés ou les transplantés rénaux.

23. Utilisation selon l'une des revendications 17 à 20 caractérisé en ce que le vaccin permet une prophylaxie après une ou deux administrations au lieu de trois chez des répondeurs normaux.

FIG_1


Murabutide 100µg
Controle
Alum 40µg
Murabutide + Alum
Thymidine Incorporation (CPM 10³)
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.05
0.1
0.5
1.
2.5
5
µg HB g/ml culture

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In' tional Application No
PCT/FR 95/01697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/39 A61K39/29

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 6 A61K

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	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE., vol. 295, no. 10, MONTREUIL FR, pages 611-614, XP002000421 AUDIBERT F. ET AL.: "Renforcement de l'activité d'un vaccin contre l'hépatite virale de type B par association avec le murabutide" see the whole document ---	1-23
X	FR,A,2 533 827 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR)) 6 April 1984 see the whole document ---	1-23
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
12 April 1996	23. 04. 96

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
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	Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/FR 95/01697

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 672 495 (VACSYN FRANCE) 14 August 1992 see the whole document ---	1-23
X	INFECT. IMMUN. (1984), 45(1), 261-6, XP002000422 AUDIBERT, FRANCOISE M. ET AL: "Enhancement by murabutide of the immune response to natural and synthetic hepatitis B surface antigens" see the whole document ---	1-23
P,X	WO,A,95 19777 (VACSYN) 27 July 1995 see the whole document -----	1,17-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter onal Application No
PCI/FR 95/01697

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2533827	06-04-84	NONE	
FR-A-2672495	14-08-92	NONE	
WO-A-9519777	27-07-95	FR-A- 2715305 AU-B- 1580995	28-07-95 08-08-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No
PCT/FR 95/01697

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/39 A61K39/29

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 6 A61K

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 cela est 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	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES SERIE III: SCIENCES DE LA VIE., vol. 295, no. 10, MONTREUIL FR, pages 611-614, XP002000421 AUDIBERT F. ET AL.: "Renforcement de l'activité d'un vaccin contre l'hépatite virale de type B par association avec le murabutide" voir le document en entier ---	1-23
X	FR,A,2 533 827 (AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR)) 6 Avril 1984 voir le document en entier --- -/--	1-23

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] 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	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
12 Avril 1996	23. 04. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
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	Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01697

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR,A,2 672 495 (VACSYN FRANCE) 14 Août 1992 voir le document en entier ---	1-23
X	INFECT. IMMUN. (1984), 45(1), 261-6, XP002000422 AUDIBERT, FRANCOISE M. ET AL: "Enhancement by murabutide of the immune response to natural and synthetic hepatitis B surface antigens" voir le document en entier ---	1-23
P,X	WO,A,95 19777 (VACSYN) 27 Juillet 1995 voir le document en entier -----	1,17-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D· ıde Internationale No
PCT/FR 95/01697

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2533827	06-04-84	AUCUN	
FR-A-2672495	14-08-92	AUCUN	
WO-A-9519777	27-07-95	FR-A- 2715305 AU-B- 1580995	28-07-95 08-08-95