



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: A 61 K

45/05

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑪

640 141

②① Numéro de la demande: 15587/77

⑦③ Titulaire(s):
Pierre Fabre S.A., Paris 16e (FR)②② Date de dépôt: 01.01.1978
Dates déterminantes pour le rang:
21.12.76; 19.12.77 (art. 144 al. 2 LBI)⑦② Inventeur(s):
Lucien Dussourd D'Hinterland, Castres (FR)
Gérard Normier, Castres (FR)
Anne-Marie Pinel, Castres (FR)
Jacques Durand, Castres (FR)

②④ Brevet délivré le: 30.12.1983

④⑤ Fascicule du brevet
publié le: 30.12.1983⑦④ Mandataire:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich⑤④ **Adjuvants d'immunité non spécifique, procédé de leur préparation et préparations immunothérapeutiques.**

⑤⑦ Les nouveaux adjuvants d'immunité non spécifique contiennent au moins une fraction choisie parmi les ribosomes et les acides ribonucléiques ARN ribosomaux d'au moins une bactérie choisie parmi:

- Corynebacterium acnei,
- Corynebacterium parvum,
- Corynebacterium granulosum,
- Corynebacterium flavidum,
- Mycobacterium smegmatis,
- Mycobacterium chelonae,
- Nocardia asteroides,
- Nocardia brasiliensis,
- Nocardia rhodocraus,
- Nocardia opaca,
- Nocardia rubra.

Ces adjuvants sont préparés par extraction d'un broyat de cellules bactériennes utiles, dans le cas des ribosomes, ou d'une suspension aqueuse des ribosomes correspondant aux ARN, dans le cas des acides ribonucléiques ribosomaux.

Les préparations immunothérapeutiques comprennent au moins un adjuvant d'immunité à titre de principe actif.

Ces préparations peuvent être utilisées aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

REVENDICATIONS

1. Adjuvant d'immunité non spécifique, caractérisé en ce qu'il contient au moins une fraction choisie parmi les ribosomes et les acides ribonucléiques (ARN) ribosomaux d'au moins une bactérie choisie parmi: *Corynebacterium acnei*, *Corynebacterium parvum*, *Corynebacterium granulosum*, *Corynebacterium flavidum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium chelonae*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia rhodococcus*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rubra*.

2. Procédé de préparation de l'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour la préparation de ribosomes bactériens utiles, on centrifuge à 30 000 g en milieu aqueux un broyat de cellules bactériennes correspondant aux ribosomes à extraire et que l'on prélève la phase aqueuse surnageante, et que l'on précipite les ribosomes de cette phase aqueuse.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on précipite les ribosomes de la phase aqueuse par de l'alcool éthylique.

4. Procédé de préparation de l'adjuvant selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour la préparation d'ARN ribosomaux bactériens utiles, l'on traite une suspension aqueuse de ribosomes correspondant aux ARN à extraire, préparée par le procédé selon la revendication 2, par du phénol et que l'on récupère la phase aqueuse pour en précipiter les ARN.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on précipite les ARN de la phase aqueuse par de l'alcool éthylique.

6. Préparation immunothérapique contenant à titre de principe actif l'adjuvant selon la revendication 1 avec un support acceptable.

7. Préparation immunothérapique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle contient de 0,1 à 1% en poids d'adjuvant d'immunité non spécifique par rapport à la composition.

8. Préparation immunothérapique selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de doses d'un poids compris entre 1 et 10 mg.

9. Préparation immunothérapique selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que sa composition est choisie parmi:

a) ARN ribosomal de <i>Corynebacterium parvum</i>	30 µg
Mannitol	5 mg
b) Ribosomes de <i>Corynebacterium acnei</i>	50 µg
Mannitol	5 mg
Tampon pH 7	$\left\{ \begin{array}{l} \text{tris-HCl } 0,01\text{M} \\ \text{MgCl}_2 \quad 0,01\text{M} \\ \text{NaCl} \quad 0,15\text{M} \end{array} \right\} \quad 0,5 \text{ ml lyophilisé}$
c) ARN de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	30 µg
Glycopeptides membranaires de <i>Serratia marcescens</i>	75 µg
Mannitol	5 mg

10. Préparation immunothérapique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un vaccin.

11. Préparation immunothérapique selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle contient entre 10 et 100% en poids d'adjuvant d'immunité non spécifique par rapport au poids du vaccin.

12. Préparation immunothérapique selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisée en ce que sa composition est choisie parmi:

a) ARN de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	30 µg
Vaccin broncho-ORL	24 µg
Mannitol	5 mg
b) Ribosomes de <i>Corynebacterium parvum</i>	10 µg
Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg
c) ARN ribosomal de <i>Corynebacterium parvum</i>	7 µg
Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg

d) ARN ribosomal de <i>Corynebacterium parvum</i>	10 µg
Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg

L'invention, réalisée au Centre d'immunologie et de biologie Pierre-Fabre, concerne des adjuvants d'immunité non spécifique, leur préparation et des préparations immunothérapiques comprenant à titre de principe actif au moins un adjuvant d'immunité non spécifique selon l'invention avec un support acceptable. Ces préparations immunothérapiques peuvent être utilisées par voie parentérale, orale, rectale ou locale.

La présente invention repose sur l'observation que les ribosomes et l'acide ribonucléique (ARN) ribosomal de certaines bactéries possèdent, en plus de leur pouvoir immunogénique spécifique, des propriétés immunostimulantes non spécifiques susceptibles de renforcer et de stimuler de façon générale les défenses immunitaires de l'organisme, par stimulation du système réticuloendothélial.

Le pouvoir immunogénique non spécifique peut être utilisé de deux façons, soit pour renforcer les défenses générales de l'organisme à l'égard des maladies infectieuses bactériennes, dans ce cas les adjuvants d'immunité sont utilisés à titre de principe actif principal dans la préparation pharmaceutique utilisée, soit pour potentialiser l'action d'un vaccin spécifique.

La présente invention concerne donc tout d'abord un adjuvant d'immunité non spécifique, caractérisé en ce qu'il est constitué par les ribosomes ou l'ARN ribosomal d'au moins une bactérie choisie parmi: *Corynebacterium acnei*, *Corynebacterium parvum*, *Corynebacterium granulosum*, *Corynebacterium flavidum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium chelonae*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia rhodococcus*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rubra*. Ces adjuvants d'immunité non spécifique se présentent, de préférence, sous forme lyophilisée.

Dans le cas où les adjuvants d'immunité non spécifique constituent le principe actif unique des préparations immunothérapiques selon l'invention, ces compositions sont de préférence sous forme injectable et comprennent de préférence de 0,1 à 1% en poids d'adjuvants d'immunité non spécifique, chaque dose unitaire de composition pharmaceutique étant comprise de préférence entre 1 et 10 mg.

Le support thérapeutiquement acceptable de ces préparations peut être quelconque mais sera de préférence le mannitol, éventuellement dans un tampon, comme un tampon phosphate.

On donne ci-après des exemples de formulation de telles préparations.

Formule type I

ARN ribosomal de <i>Corynebacterium parvum</i>	30 µg
Mannitol	5 mg

Formule type II

Ribosomes de <i>Corynebacterium acnei</i>	50 µg
Mannitol	5 mg

Tampon pH 7	$\left\{ \begin{array}{l} \text{tris-HCl } 0,01\text{M} \\ \text{MgCl}_2 \quad 0,01\text{M} \\ \text{NaCl} \quad 0,15\text{M} \end{array} \right\} \quad 0,5 \text{ ml lyophilisé}$
-------------	---

Formule type III

ARN de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	30 µg
Glycopeptides membranaires de <i>Serratia marcescens</i>	75 µg
Mannitol	5 mg

Il est à remarquer que lorsque l'on utilise des ARN à titre d'adjuvants d'immunité non spécifique, la quantité en poids par dose de la préparation peut être plus faible que lorsque l'on utilise la fraction ribosomale correspondante.

La formule type III désigne une préparation dans laquelle les adjuvants d'immunité non spécifique selon la présente invention ont été associés à d'autres adjuvants d'immunité, en l'occurrence des glycopeptides membranaires. On peut également utiliser d'autres adjuvants d'immunité tels que des glycopeptides extraits de parois ou membranes bactériennes, des glycoprotéines extraites des membranes bactériennes ou des corps bactériens entiers, des polysaccharides de membranes externes et capsulaires de bactéries Gram négatif.

Dans le cas où les adjuvants d'immunité non spécifique sont utilisés pour potentialiser l'action de vaccins, la quantité en poids d'adjuvants d'immunité non spécifique sera comprise entre 10 et 100% du poids de la partie active du vaccin.

On donne ci-après certaines formulations à titre d'exemple.

Formule type IV

ARN de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	30 µg
Vaccin broncho-ORL	24 µg
Mannitol	5 mg

Formule type V

Ribosomes de <i>Corynebacterium parvum</i>	10 µg
Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg

Formule type VI

ARN ribosomal de <i>Corynebacterium parvum</i>	7 µg
Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg

Formule type VII

ARN ribosomal de <i>Corynebacterium parvum</i>	10 µg
Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg

Formule de comparaison

Vaccin broncho-ORL	25 µg
Mannitol	5 mg

Le vaccin broncho-ORL utilisé dans ces préparations est constitué par:

Fractions ribosomales (lyophilisat correspondant à 0,005 µg de ribosomes titrés à 70% d'ARN)	0,010 µg
obtenues par extraction à partir de cultures microbiennes et associées dans les proportions suivantes:	
Ribosomes de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35 parties
Ribosomes de <i>Diplococcus pneumoniae</i>	30 parties
Ribosomes de <i>Streptococcus pyogenes</i> Groupe A.	30 parties
Ribosomes de <i>Hemophilus influenzae</i>	5 parties
Fractions membranaires de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (lyophilisat correspondant à 0,008 µg de glycoprotéines et contenant 0,0012 µg de mercurothiolate de sodium maximal)	0,015 µg

Ce vaccin peut être préparé notamment par le procédé décrit dans le brevet français N° 73.43957.

Les préparations immunothérapeutiques selon la présente invention peuvent être utilisées aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

Les ribosomes et les ARN ribosomaux peuvent être préparés par des procédés connus, par exemple par les procédés décrits dans les brevets français N°s 73.43957 et 75.10252.

En particulier, on prépare les ribosomes bactériens utiles comme adjuvants d'immunité non spécifique selon la présente invention par centrifugation à 30 000 g d'un broyat de cellules bactériennes en solution aqueuse, prélèvement de la phase surnageante et précipitation des ribosomes contenus dans la phase surnageante prélevée; de préférence la précipitation est réalisée au moyen d'alcool éthylique.

Le précipité de ribosomes ainsi obtenu peut, si cela est nécessaire, être purifié par exemple par traitement au dodécylsulfate de sodium.

Le broyat peut être obtenu par n'importe quel procédé connu, par exemple par traitement d'une culture bactérienne par un homogénéiseur.

Les ARN ribosomaux sont préparés à partir des ribosomes en phase aqueuse par extraction au phénol, les ARN se trouvant en fin d'extraction dans la phase aqueuse. Ils peuvent être récupérés à partir de la phase aqueuse par précipitation à l'alcool éthylique.

Ils peuvent en outre être purifiés, si cela est nécessaire.

On donne ci-après, à titre d'exemple, un mode de préparation des ribosomes et des ARN qui ont été utilisés dans les formules précédentes.

La souche de *Corynebacterium parvum* est entretenue en gélose profonde viande-foie et repiquée tous les deux mois. Un tube de gélose est utilisé pour ensemercer le milieu de préculture. La préculture est réalisée dans 300 ml de milieu réducteur (thioglycolate/cystéine) en culture statique en étuve, à 37°C pendant 24 h.

La culture proprement dite est réalisée dans un fermenteur de 20 l contenant 15 l d'un milieu (extrait de viande, extrait de levure, tryptone, glucose, NaCl et thioglycolate de sodium). Le flacon de préculture est transvasé dans le fermenteur au moyen d'une surpression d'air stérile et la croissance est faite à 37°C sous agitation lente, avec une aération faible, le pH étant réglé à 7 par addition automatique de soude. Le temps de croissance est de 48 à 72 h et le contrôle est effectué par mesure, à intervalles réguliers, de la densité optique.

A la fin de la phase exponentielle de croissance, les cellules sont recueillies par centrifugation continue sur Sharples, le fermenteur étant raccordé stérilement au séparateur, et en surpression d'air stérile. Le milieu de culture est éliminé après décontamination et la biomasse lavée à +4°C, par centrifugation avec un tampon stérile (tris-HCl 0,01M, pH 7 contenant MgCl₂ 0,01M et NaCl 0,15M). Le concentrat bactérien final est immédiatement congelé en attendant d'être utilisé. Un contrôle bactériologique à ce stade est réalisé pour identifier la souche et déterminer le nombre de germes revivifiables, ainsi que l'absence de contaminants.

Pour l'obtention de biomasses plus importantes, le fermenteur de 20 l est utilisé comme préfermenteur pour un fermenteur de 600 l, la culture et la récolte des cellules étant conduites dans les mêmes conditions.

Préparation de la fraction ribosomale

La biomasse est mise en suspension dans le tampon tris-HCl, MgCl₂, pH 7 pour avoir environ 1 g en cellules sèches dans 20 ml de suspension. Après une homogénéisation rapide à l'Ultra-turrax, la suspension est désintégrée par passage 3 fois de suite dans un homogénéiseur APV équipé de clapets de désintégration, à la pression maximale, soit 560 kg/cm². La suspension est réfrigérée en continu par passage dans un échangeur à plaques.

Après broyage, la suspension est clarifiée par passage sur Sharples à 10 000 g pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant est recueilli et soumis à une centrifugation de 45 min à 30 000 g et à 4°C afin d'éliminer les parois, membranes et autres fractions de haut poids moléculaire.

Le surnageant contenant les ribosomes est conservé et la fraction ribosomale brute est précipitée par addition de 0,8 volume d'alcool éthylique 96% préalablement refroidi à -20°C. On laisse au repos 30 min à 4°C et le précipité est recueilli sur Sharples; le surnageant est éliminé.

Le précipité de ribosomes bruts est remis en suspension dans 1 volume du tampon tris-HCl, MgCl₂, NaCl, pH 7 à 15°C par agitation pendant 1 h et on ajoute alors du sodium dodécylsulfate (SDS) pour avoir une concentration finale de 0,5% (agitation vive pendant 1 h à température ambiante).

Les ribosomes lavés sont à nouveau précipités par addition de 0,7 volume d'alcool éthylique à -20°C. Repos pendant 30 min à température ambiante.

Le précipité de ribosomes lavés est recueilli sur Sharples à 10 000 g et le surnageant est éliminé.

Le précipité est repris dans le même tampon (0,4 volume du volume initial de suspension), par agitation douce, une nuit, à 0°C.

La reprise est clarifiée par une centrifugation de 60 min à 30 000 g et à 0°C, le surnageant contenant les ribosomes est conservé

soit congelé soit lyophilisé après stérilisation sur membrane (porosité 0,22 μ).

Extraction de l'ARN ribosomal

L'ARN est extrait de la préparation ribosomale précédente par le phénol, dans les conditions suivantes.

Une solution de phénol à 80% est préparée avec du tampon tris-HCl 0,001M, pH 7 contenant EDTA 0,001M et 0,5% de SDS. Cette solution est thermostatée à 65°C.

L'extraction est faite volume/volume pendant 10 min à 65°C sous agitation. Le mélange est ensuite refroidi rapidement à +4°C et la phase aqueuse est recueillie par passage sur Sharples équipé d'un bol séparateur. La phase phénol est écartée.

La phase aqueuse est réextraite deux fois dans les mêmes conditions par 1/2 volume de phénol. La phase aqueuse finale est recueillie et extraite par trois fois 1 volume d'éther pour éliminer le phénol résiduel. L'éther subsistant dans la phase aqueuse est chassé par barbotage d'azote.

On ajoute alors du chlorure de sodium à la phase aqueuse pour avoir une molarité de 0,1M. L'ARN est alors précipité par addition de 2 volumes d'alcool éthylique pendant 4 h à -20°C.

Le précipité est recueilli par centrifugation à 10 000 g et à 0°C sur Sharples et repris dans du tampon tris-HCl 0,025M, pH 8,1 contenant NaCl 0,025M à +2°C pour avoir environ 2 mg d'ARN par ml de solution.

Purification de l'ARN ribosomal

A ce stade, l'ARN ribosomal peut être encore contaminé par des traces de carbohydrates qui peuvent être éliminées de la façon suivante.

A la solution d'ARN précédente, on ajoute 1 volume d'une solution 2,5M de phosphate dipotassique et 1 volume de 2-méthoxy-éthanol. Agitation énergique pendant 2 à 3 min puis centrifugation pendant 5 min à 10 000 g et à +4°C. Le surnageant clair est recueilli avec précaution et mélangé à 1 volume d'acétate de sodium 0,2M.

On précipite alors l'ARN par addition lente de 0,5 volume d'une solution aqueuse à 1% de bromure de cétyltriméthylammonium. On laisse reposer 5 min à 4°C puis le précipité est recueilli par centrifugation pendant 5 min à 4°C. Le précipité est lavé deux fois par un excès d'alcool à 70% contenant CH_3COONa 0,1M et remis en solution dans du tampon tris-HCl 0,01M, pH 7 et dialysé une nuit à +2°C contre 20 volumes de ce tampon.

Le dialysat est finalement lyophilisé.

Afin de mettre en évidence l'activité de l'adjuvant d'immunité non spécifique selon l'invention, on a étudié l'activité immunologique des formules type V, VI, VII et du vaccin ORL seul. Chaque formule est étudiée sur 10 souris.

Chaque animal reçoit une demi-dose de préparation à chaque injection, par voie sous-cutanée, au rythme de 5 injections en 15 d.

Après 10 d de repos, l'animal est ponctionné par les sinus rétro-orbitaires.

Les sérums sont étudiés en immunodiffusion (Ouchterlony) et en immunoelectrodifffusion (Laurell) contre les antigènes bactériens complets dont on a extrait les ribosomes.

Ici, le vaccin ORL contient des ribosomes de *Klebsiella pneumoniae*.

En immunoelectrodifffusion la hauteur des Rockets est proportionnelle à la concentration en anticorps spécifique de l'antigène (ici *Klebsiella pneumoniae* 600 μ l).

On observe que les Rockets correspondant aux préparations immunothérapeutiques selon la présente invention, c'est-à-dire comportant des adjuvants d'immunité non spécifique, sont nettement plus importants que la Rocket correspondant au vaccin ORL seul et qu'en conséquence on observe une nette augmentation du pouvoir immunologique des vaccins selon l'invention par rapport au vaccin ORL seul.

Les préparations immunothérapeutiques selon la présente invention peuvent être utilisées pour la prévention en général des maladies d'origine bactérienne, ou pour prévenir des maladies particulières dans le cas où elles contiennent un vaccin.