

**EXEMPLAIRE
CERTIFIÉ CONFORME**

3e alinéa de l'article 67 du décret n° 19 822 du 19/9/1979



(11) N° de publication : **2 552 668**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **83 15883**

(51) Int Cl⁴ : A 61 K 39/02; C 12 P 1/04.

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(54) Procédé de fabrication d'un antigène microbien non sélectif, antigène non sélectif ainsi obtenu et composition pharmaceutique contenant cet antigène.

(22) Date de dépôt : 30 septembre 1983.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 14 du 5 avril 1985.

(45) Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : BOPI « Brevets » n° 12 du 21 mars 1986.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : *BAVENCOFFE Edgard.* — FR et *JASTRZEMSKI Kazimierz.* — PL.

(72) Inventeur(s) : *Edgard Bavencoffe, Kazimierz Jastrzemski, Jerzy Bucior et Hanna Gorczyca.*

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : *Edgard Bavencoffe.*

FR 2 552 668 - B1

L'invention se rapporte à un procédé de fabrication d'un antigène microbien non sélectif et à l'antigène non sélectif ainsi obtenu ainsi qu'à la composition pharmaceutique contenant cet antigène.

5 Un antigène est par définition un corps étranger qui, lorsqu'il est introduit dans l'organisme, provoque la production par cet organisme d'anticorps luttant contre cet antigène.

10 Il peut être utilisé comme composition pharmaceutique prescrite à titre curatif mais surtout préventif et donc comme vaccin.

15 Un vaccin comprend habituellement un principe actif caractéristique de la maladie contre laquelle on veut se prémunir pour que, lorsqu'il sera introduit dans l'organisme, il y diffuse alors un composé antigène spécifique de la maladie provoquant à son tour la création d'anticorps luttant essentiellement contre cet antigène spécifique et partant de là, contre la maladie correspondante.

20 Pour constituer le principe actif, on utilise alors des substances d'origine microbienne notamment des microbes tués ou atténués, et par exemple des bactéries gram positif (staphylocoque, stréptocoque ...) et gram négatif (aérobactéries, eschérichia coli ...) qui, inoculées telles
25 quelles, diffusent en très grande quantité un lipopolysaccharide (LPS) qui est spécifique de la bactérie inoculée, ce qui nécessite de disposer de vaccins propres à chaque microbe.

30 A ce principe actif, peuvent être adjoints des produits en facilitant l'administration tel "l'aqua pro injectione" et/ou en stimulant l'action tel le peptidoglycane qui est une forme de muréine.

35 On sait que cette muréine est un composant de la paroi des bactéries gram positif et gram négatif et qu'elle présente des propriétés antigènes (UMSCHAU-pages 223, 224 cahier 7-1972) mais les formes de muréine jusqu'alors isolées diffusant peu dans l'organisme et ayant un faible poids moléculaire, cette muréine n'est à ce jour utilisée qu'en qualité d'adjuvant d'un principe actif dont elle stimule

grandement l'action de diffusion d'antigènes spécifiques au principe actif (FR-A-2.273.067 et 2.320.106) mais n'assure alors aucune fonction antigène propre.

5 De plus dans les dites formes jusqu'alors isolées, les impuretés et notamment les traces de lipopolysaccharide présentées dans la muréine avaient des effets jugés nocifs et notamment pyrétogènes (UMSCHAU précité).

10 Un résultat que l'invention vise à obtenir est un procédé de fabrication d'un antigène microbien qui est non sélectif.

Est également un résultat de l'invention un tel antigène non sélectif et une composition pharmaceutique qui le contient qui soient peu onéreux, simples à préparer et ne présentent pas d'effets nocifs.

15 A cet effet, l'invention a pour objet un procédé de fabrication notamment caractérisé en ce qu'on isole la muréine pure de bactéries et en ce qu'avec cette muréine on réalise l'élément actif essentiel de l'antigène non sélectif.

20 Elle a également pour objet l'antigène ainsi obtenu et la composition pharmaceutique qui le contient.

L'invention sera bien comprise à l'aide de la description ci-après faite, à titre d'exemple non limitatif.

25 Le procédé de préparation de la muréine pure comprend, après élevage et isolation des bactéries, différentes phases de traitement pouvant être suivies d'opérations de contrôle de la pureté :

1°) Elevage de bactéries :

30 L'élevage s'opère de manière connue par exemple dans une "boîte de Pétri", en prévoyant une oxygénation dans le cas où on souhaite une production accélérée.

Toutes les bactéries conviennent. On choisit de ce fait la moins chère et la moins pathogène telle par exemple la "eschérichia coli" que l'on rencontre normalement dans l'intestin et qui est non pathogène à l'état normal.

35 2°) Isolation des bactéries :

Les bactéries ainsi produites sont ensuite isolées de leur milieu de culture par centrifugation par exemple dans des tubes à essai.

A ce stade, les bactéries obtenues sont évidemment complètes c'est à dire comprennent leur cytoplasme et la membrane qui l'entoure.

5 Cette membrane qui est elle-même structurée par de la muréine est par ailleurs formée de lipopolysaccharide, de couches superficielles lipoprotéiques et d'une lipoprotéine liée à la dite muréine.

Il faut donc traiter ces bactéries pour en isoler la muréine pure.

10 3°) Traitement des bactéries :

- première phase :

La première phase consiste en une isolation de la muréine et des peptides en liaison covalente avec la muréine dont les peptides de Braun.

15 Cette isolation s'opère par dissolution du reste des bactéries à l'aide d'un détergent et par exemple dans une solution à quatre pour cent de dodécylsulfate de sodium communément dite solution SDS.

20 Afin d'obtenir une dissolution complète, cette solution est maintenue à sa température d'ébullition pendant environ quarante minutes puis est laissée en repos pendant environ quinze heures, ce qui avantageusement peut être fait pendant une nuit.

- deuxième phase :

25 Ensuite une centrifugation à chaud, et plus précisément à une température comprise entre trente et quarante degrés celsius, permet le retrait complet du détergent et donc d'isoler la muréine, les peptides de Braun et les autres peptides liés à la muréine.

30 - troisième phase :

La muréine et les peptides ainsi isolés sont déposés dans une solution tampon dite "solution tampon A" maintenue à un pH de 7,8 et qui pour quatre litres de solution comprend 17,5 millilitres de 0,5 mole KH_2PO_4 et 128,2 millilitres de 0,5 mole Na_2HPO_4 .

35 Dans cete solution, on ajoute une peptidase, c'est à dire une enzyme protéolytique active sur les peptides et ce à raison de soixante douze milligrammes de peptidase pour vingt

à cinquante grammes de masse bactérienne.

La peptidase donnant le meilleur résultat est la pancréatine.

- quatrième phase :

5 Par dose, par exemple de deux cents millilitres chacune, l'ensemble obtenu est ensuite transféré dans un sac à dialyse qui plonge dans une solution dont le volume est environ dix fois supérieur à celui de la dose du susdit ensemble et par exemple de deux litres.

10 Cette solution est constituée par la même solution tampon que celle ci-dessus citée et dénommée "solution tampon A" mais dans laquelle, de préférence, aura été ajouté un peu de chloroforme.

15 Pour deux litres de solution, seront suffisantes quelques gouttes de chloroforme et par exemple cinq ou six gouttes.

20 Le sac à dialyse est laissé ainsi plongé dans la solution pendant quinze heures à une température de trente sept degrés celsius afin que la pancréatine et les peptides diffusent bien dans le tampon et que seul la muréine et peut être un peu de peptides restent dans le sac qui est alors sorti du dialyseur.

- cinquième phase :

25 Dans le sac contenant donc de la muréine et peut être un peu de peptides, on rajoute soixante douze milligrammes de peptidase et à nouveau de la "solution tampon A" puis on replonge le sac dans de la "solution tampon A" dans les mêmes proportions de un à dix que ci-dessus et on laisse poser le tout pendant vingt heures à trente sept degrés celsius avant
30 de ressortir le sac.

- sixième phase :

35 Le contenu du sac est alors passé dans une centrifugeuse où il subit une accélération de vingt mille g pendant cinquante minutes à une température de quatre degrés celsius environ.

- septième phase :

La matière lourde ainsi isolée par la dernière centrifugation citée est alors mise en suspension dans un mélange

dans un rapport un pour un d'une part, d'une nouvelle solution tampon dite "solution tampon B" et d'autre part d'eau additionnée de pronase (strept. Griseus).

5 Pour la masse de matière qui aurait été obtenue à ce stade si lors de la première dialyse citée avait été traitée une dosé de deux cents millilitres, le mélange comprendrait cinquante deux millilitres de "solution tampon B" et cinquante deux millilitres d'eau additionnée de pronase.

10 La "solution tampon B" qui est maintenue à un pH de 7,4 comprend pour un litre 29,2 millilitres de 0,5 mole KH_2PO_4 et 124 millilitres de 0,5 mole Na_2HPO_4 .

Pour cinquante deux millilitres d'eau additionnée de pronase, celle-ci comprendrait trois milligrammes de pronase.

15 La matière ainsi mise en suspension est alors enfermée hermétiquement puis laissée pour incubation pendant quinze heures à cinquante huit degrés celsius environ.

- huitième phase :

20 Après incubation, l'ensemble est passé dans une centrifugeuse où il subit une accélération de vingt cinq mille g pendant une heure et demie à quatre degrés celsius.

Cette opération est répétée trois fois.

- neuvième phase :

25 La matière lourde isolée est mise en suspension dans la quantité maximale d'une solution de deux pour cent d'un détergent, tel le SDS, dans de l'eau, laquelle solution est portée à une température d'ébullition pendant dix minutes puis est laissée en repos douze heures dans la solution à trente sept degrés celsius.

- dixième phase :

30 Après ce repos, l'ensemble est passé par deux fois dans la centrifugeuse dans laquelle il est traité à chaud et plus précisément à une température comprise entre trente et quarante degrés celsius.

- onzième et dernière phase :

35 Un lavage par passage d'une très grande quantité d'eau à quatre degrés celsius permet alors d'obtenir de la muréine pure sous forme liquide mais qui peut être lyophilisée.

4°) Contrôle de pureté de la muréine :

Le contrôle de la pureté peut s'opérer de manière classique par soumission d'un échantillon de muréine à l'hydrolyse de 4 moles Hcl à cent cinq degrés celsius pendant douze heures avec une élimination des vapeurs d'acide chlorhydrique à l'aide d'une pompe à vide.

5 Au terme de cette opération le reste est passé au chromatographe en fine couche.

On voit alors que ne subsistent que cinq éléments dont deux sucres et trois amino-acides : Ala, Glu, Méso DAP (diaminopimélique).

10 5°) Préparation de l'antigène non sélectif :

L'antigène non sélectif est constitué exclusivement de cette muréine pure sauf à y adjoindre une "aqua pro injectione".

15 L'administration de cet antigène peut se faire par tout moyen connu tel que voie buccale (ampoule ou aérosol) ou piqure intra-veineuse mais de préférence elle se fera par piqure intra-musculaire.

20 Le dosage est sans grande importance, les essais in vivo ayant montré que des doses importantes ne sont pas nocives et que tout au plus il y a rejet.

Pour des raisons économiques, on se rapprochera de la dose jugée suffisante pour assurer une immunité non spécifique pendant une première année, laquelle dose est de dix milligrammes pour un adulte et de six à sept milligrammes pour un enfant de vingt kilos.

25 Ensuite, un rappel pourra être fait avec une dose encore plus faible.

30 Ce nouvel antigène est utilisable en thérapeutique humaine ou vétérinaire pour faciliter la résistance aux infections d'origine virale ou bactérienne.

Il trouve de nombreuses applications thérapeutiques comme en témoignent les expériences suivantes et, à ce titre, il entre dans la réalisation de composition pharmaceutique isolément ou en présence de tout excipient ou adjuvant compatible.

35 a) Expériences vétérinaires

- sur les renards :

Dans un élevage de renards, trois cent neuf animaux avaient une infection du tube digestif : une colibactériose. Une centaine de bêtes a reçu le traitement traditionnel par antibiotique qui n'a donné aucun résultat et les bêtes sont
5 mortes. Pour les autres renards, après une injection intramusculaire de muréine, tous ont été sauvés sauf un qui était beaucoup trop atteint.

Ensuite, certains ayant été abattus pour leur fourrure on a pratiqué des autopsies. Celles-ci ont démontré une
10 absence totale de bactéries pathogènes et l'existence d'une flore bactérienne normale. Les autres renards qui ont été conservés pour la reproduction ont eu une grossesse normale et des descendants normaux.

Il est à noter que l'effet de la muréine a été immé-
15 diat car dix jours après l'injection, tous les renards avaient retrouvé un grand appétit.

- sur les chiens :

Six chiens étaient infectés par des staphylocoques et des streptocoques. Ils avaient du pus dans les oreilles, sur
20 les lèvres et entre les doigts. Ils ont été traités par une injection intramusculaire de cinq milligrammes de muréine. Les trois plus petits (basset d'artois, pékinois, braque) ont été guéris dans les quinze jours qui ont suivi. Par contre, les trois autres (dogue) sont morts, probablement parce que
25 la dose était trop faible.

b) Expériences humaines (cas désespérés, essais avec accord du corps médical et des patients)

- infection de l'appareil génital féminin :

Tro is femmes étaient atteintes d'une infection puru-
30 lente permanente des trompes, des ovaires et des annexes. Elles avaient en outre de très fréquentes angines chroniques purulentes. Après une injection intra-musculaire de dix milligrammes de muréine, les patientes ont guéri dans les quinze jours. Même les angines sont disparues.

35 - furonculose

Cinq personnes des deux sexes étaient atteintes de furonculose sur les fesses et l'appareil génital. Il y a eu guérison totale dans les quinze jours d'une injection

intra-musculaire de dix milligrammes de muréine.

- infections rénales :

5 Une injection de dix milligrammes sur un sujet atteint d'une infection des sacs de Bowman. Quinze jours après l'injection, la fièvre était tombée et les urines ne contenaient plus de trace d'infection.

- infection de la vessie (bactérie Proteus SP) :

10 Le sujet était paralysé et avait en outre une infection de la vessie. Il était soigné sans résultat avec une composition de treize antibiotiques. Après une injection de dix milligrammes de muréine, la fièvre est tombée, les urines exemptes d'infection et les douleurs ont disparu.

Informations générales :

15 Le traitement se fait par administration d'une seule dose de muréine (environ dix milligrammes par personne) sous forme de piqûres intra-musculaires (ce qui est plus efficace) ou sous-cutanées, ou intra-veineuses. L'administration par "spray" est possible mais la dose doit être augmentée.

20 L'effet "vaccin" obtenu persiste pendant un an, ultérieurement des rappels sont nécessaires mais des doses plus faibles suffisent.

Les expériences in vitro ont donné un résultat positif sur toutes les bactéries traitées (gram positif et gram négatif).

25 Il est à noter que beaucoup de laboratoires développent un produit proche de la muréine (bi-peptide de muramyle) mais que ce produit est un adjuvant et n'a donc qu'une action stimulante alors que la muréine à cause de son poids moléculaire important, est elle même antigène.

30 Elle réagit pendant la division des bactéries.

Avantageusement, elle peut être utilisée dans la lutte contre le cancer.

35 Sans que l'on soit certain de l'explication du phénomène, on constate trois cas de guérison d'êtres humains atteints d'un cancer du poumon au niveau du cœur (inopérable).

De même, la muréine guérit le cancer de Bomirski (cancer mélanoma) : on a infecté quarante hamsters dont vingt

ont été vaccinés et vingt gardés comme sujets témoins.

Tous les témoins sont morts alors que les sujets vaccinés n'ont pas été atteints.

5 Il semble notamment que la muréine favorise la reconstitution des membranes dont la défaillance avait permis le développement anarchique des cellules cancéreuses et interdit ainsi toute prolifération.

10 Pour les personnes qui ne peuvent fabriquer d'anticorps (opération coeur ouvert, ...) l'injection peut se faire dans du sérum.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un antigène microbien non sélectif CARACTERISE en ce qu'on isole la muréine pure de bactéries et en ce qu'avec cette muréine pure on réalise l'élément actif essentiel de l'antigène non sélectif.

5 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'en vue d'isoler la muréine pure, après élevage et isolation des bactéries, il comprend différentes phases de traitement dont principalement :

10 - une isolation de la muréine et des peptides en liaison covalente avec la muréine par dissolution à l'aide d'un détergent suivie d'une centrifugation à chaud,

- préparation d'une solution tampon dite "solution tampon A" maintenue à un pH de 7,8 et qui pour quatre litres de solution comprend 17,5 millilitres de 0,5 mole KH_2PO_4 et 128,2
15 millilitres de 0,5 mole Na_2HPO_4 ,

- dépôt des matières isolées dans cette "solution tampon A" dans laquelle on ajoute une peptidase à raison d'environ soixante douze milligrammes pour une masse bactérienne comprise entre vingt et cinquante grammes et transfert par dose
20 successive dans un sac à dialyse qu'on plonge dans une "solution tampon A" dix fois supérieure en volume à celui de la dose transférée dans le sac qui est laissé pendant environ quinze heures dans la solution portée à trente sept degrés celsius avant d'être sorti du dialyseur,

25 - dans le sac à dialyse ainsi sorti, aux matières retenues par l'opération précédente, on ajoute environ la même masse que ci-dessus d'une peptidase et de la "solution tampon A" puis on replonge le sac dans de la "solution tampon A" dans les mêmes proportions de un à dix par rapport à la poche, dans laquelle
30 solution, qui est portée à trente sept degrés celsius, le sac est laissé environ vingt heures avant d'en être ressorti et que son contenu soit passé dans une centrifugeuse où il subit une accélération de l'ordre de vingt mille g pendant environ cinquante minutes à une température de quatre degrés celsius,

35 - préparation d'une solution tampon dite "solution tampon B" qui est maintenue à un pH de 7,4 qui comprend pour un litre

29,2 millilitres de 0,5 mole KH_2PO_4 et 124 millilitres de 0,5 mole Na_2HPO_4 .

5 - la matière lourde isolée par la dernière centrifugation citée est mise en suspension dans un mélange constitué à égalité en volume d'une part de la "solution tampon B" et d'autre part d'eau additionnée de pronase à raison de trois grammes de pronase pour cinquante deux millilitres d'eau additionnée et cette suspension est enfermée hermétiquement et laissée pour 10 incubation pendant environ quinze heures à une température de l'ordre de cinquante huit degrés celsius,

- on passe la matière incubée dans une centrifugeuse où elle subit une accélération de l'ordre de vingt cinq mille g et ce environ pendant une heure et demie et à quatre degrés celsius et on répète cette opération trois fois,

15 - on met la matière lourde ainsi isolée en suspension dans une quantité maximale d'une solution de deux pour cent de détergent dans de l'eau que l'on porte à ébullition pendant environ dix minutes puis qu'on laisse reposer environ douze heures à trente sept degrés celsius après quoi l'ensemble est passé par 20 deux fois dans une centrifugeuse à chaud,

- enfin on lave les matières lourdes isolées par passage d'une grande quantité d'eau à quatre degrés celsius.

3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le détergent utilisé est du dodécylsulfate de sodium (SDS).

25 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3 caractérisé en ce que la centrifugation à chaud s'opère à une température comprise entre trente et quarante degrés celsius environ.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4 caractérisé en ce que la peptidase est de la pancréatine.

30 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5 caractérisé en ce que, pendant au moins la première phase de dialyse, dans la "solution tampon A" dans laquelle plonge le sac à dialyse, est ajouté un peu de chloroforme.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que 35 le chloroforme est apporté à raison d'environ cinq à six gouttes pour deux litres de "solution tampon A".

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 7 caractérisé en ce que, lorsque lors de la première phase de

dialyse la dose mise dans le sac est de deux cents millilitres, la solution de suspension utilisée pour la phase incubation comprend proportionnellement cinquante deux milligrammes de "solution tampon B" et cinquante deux milligrammes d'eau additionnée de pronase.

5

9. Antigène microbien non sélectif CARACTERISE en ce qu'il est obtenu selon le procédé d'au moins l'une des revendications 1 à 8.

10. Composition pharmaceutique CARACTERISEE en ce qu'elle contient un antigène selon la revendication 9.

10

AVIS DOCUMENTAIRE

2552668

N° E. N. : 83 15 883

Avis établi

sur la base des pièces suivantes précédées du signe

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> rapport de recherche | <input type="checkbox"/> rapport de recherche complémentaire |
| <input type="checkbox"/> observations du demandeur | <input type="checkbox"/> observations des tiers |
| <input type="checkbox"/> revendications initiales (déposées avant la recherche) | |
| <input type="checkbox"/> revendications remplaçant les revendications initiales | <input type="checkbox"/> la description étant modifiée |

Conformément à l'article 19 de la loi n° 68-1 du 2 janvier 1968 modifiée, l'avis documentaire cite les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention au regard des exigences de nouveauté et d'activité inventive.

AUCUNE ANTERIORITE N'A ETE RELEVÉE

DOCUMENTS CITÉS DANS LE RAPPORT DE RECHERCHE

CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 76, 1972, page 251, résumé 123941j, COLUMBUS, OHIO (US); & *Umschau* 1972, 72(6), 188-9; SCHLEIFER.