

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

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

**2 532 850**

②1 N° d'enregistrement national :

**82 15616**

⑤1 Int Cl<sup>3</sup> : A 61 K 39/385.

①2

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15 septembre 1982.

③0 Priorité

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 11 du 16 mars 1984.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR*. — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Pierre Tiollais, Pierre Rivaille, Patrice Bo-  
quet, Eliane Sobczak née Valette et Odile Siffert.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Plasseraud.

⑤4 Conjugués immunogènes entre un haptène et une molécule porteuse dérivée d'une toxine, les vaccins les  
composant et procédé pour leur obtention.

⑤7 L'invention a pour objet un conjugué moléculaire, son  
procédé de fabrication et son application en tant que principe  
actif de compositions immunogènes. Le conjugué moléculaire  
selon l'invention est détoxifié, présente des propriétés immu-  
nogènes, de préférence vaccinales, à l'égard d'un principe  
pathogène déterminé et comporte un ou plusieurs haptènes  
portant au moins un déterminant antigénique caractéristique  
dudit principe pathogène et fixés sur une molécule porteuse,  
ce conjugué étant plus particulièrement caractérisé en ce que  
la molécule porteuse est dérivée d'une toxine ou d'un fragment  
de toxine et que les haptènes sont fixés sur des résidus  
amino-acyles entrant dans la constitution de ladite toxine,  
autres que l'un ou l'autre des résidus aminoacyles terminaux de  
la molécule porteuse.

FR 2 532 850 - A1

CONJUGUES IMMUNOGENES ENTRE UN HAPTENE ET UNE MOLECULE  
PORTEUSE DERIVEE D'UNE TOXINE, LES VACCINS LES COMPOSANT  
ET PROCEDE POUR LEUR OBTENTION

L'invention est relative à un nouveau principe  
5 immunogène, de préférence doté de propriétés vaccinan-  
tes à l'égard d'un principe pathogène, et comprenant un  
conjugué moléculaire formé par couplage entre un haptène  
comportant lui-même un déterminant antigénique dudit  
10 principe pathogène, une molécule porteuse, des composi-  
tions de vaccin les contenant, en vue de leur application  
à la vaccination humaine et animale, et un procédé pour  
leur fabrication.

On sait que le couplage entre un haptène, plus  
particulièrement de faible poids moléculaire, et une  
15 molécule porteuse, en vue d'obtenir un conjugué doué de  
propriétés immunogènes et de propriétés vaccinales à  
l'égard de principes pathogènes, ayant notamment un élé-  
ment de structure commun avec l'haptène, constitue une  
voie de recherche de vaccins nouveaux très explorée à  
20 l'heure actuelle. Ces recherches visent essentiellement  
à produire des vaccins bénéficiant des qualités d'immu-  
nogénicité des vaccins traditionnels atténués, en s'af-  
franchissant cependant des effets secondaires souvent  
importants qui les accompagnent. S'agissant de vaccins  
25 devant protéger l'homme ou l'animal contre des principes  
pathogènes constitués par des micro-organismes tels que  
bactéries et virus, il est encore à ce jour souvent dif-  
ficile d'atteindre à un niveau de purification suffisant  
des principes actifs retenus pour qu'ils puissent être  
30 utilisés sans risques secondaires, même après les trai-  
tements classiques d'atténuation, de détoxification ou  
autres traitements analogues. Les inconvénients peuvent  
prendre un tour encore plus sérieux lorsque l'on ne peut  
disposer comme source de vaccins, comme dans le cas de  
35 ceux contre l'hépatite virale B, que des fragments ou  
enveloppes de virus obtenus à partir de personnes ayant  
déjà été exposées à l'agent pathogène.

Dans la mesure où la partie des principes actifs naturels qui peut être tenue comme responsable de l'effet vaccinant peut être identifiée, il est alors tentant de la produire par synthèse chimique par exemple, de la coupler de façon covalente à une molécule porteuse

5 de poids moléculaire suffisamment élevé pour conférer à l'ensemble des propriétés immunogènes permettant d'envisager son utilisation en lieu et place des vaccins naturels détoxifiés ou atténués.

10 C'est ainsi par exemple que l'on a déjà conjugué, à des érythrocytes humains, des peptides contenant une séquence déterminée d'acides aminés et supposée comporter un déterminant antigénique de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (HBs Ag).

15 Le conjugué obtenu a provoqué la formation d'anticorps vis-à-vis de l'HBs Ag (Proc. Nat. Acad. Sci., USA, vol. 79, 1982, p. 579-582, A. M. PRINCE, H. IKRAM et al.).

20 D'autres couplages par l'intermédiaire des résidus cystéyle de séquences synthétiques peptidiques supposées contenir un déterminant antigénique de HBs Ag avec KLH (abréviation de l'expression "keyhole limpet hemocyanin") ont été effectués et certains des conjugués obtenus ont présenté des propriétés immunogènes vis-à-vis de

25 l'HBs Ag (Proc. Nat. Acad. Sci., USA, vol. 78, n°6, 1981, p. 3 403-3 407, LERNER et al.).

30 Les exemples qui précèdent ainsi que de nombreux autres, tels qu'ils sont révélés par la littérature scientifique, apportent certes la preuve que la fixation de séquences peptidiques de poids moléculaires réduits et contenant un déterminant antigénique déterminé peut avoir pour effet la restitution à l'ensemble de propriétés immunogéniques susceptibles d'être mises en oeuvre dans des applications thérapeutiques. Ceci étant, les molécules

35 porteuses utilisées jusqu'à ce jour dans les expérimentations connues, ne présentent pas toujours toutes les garanties voulues de non-toxicité, ou ne contribuent pas

à l'induction d'une immunogénicité suffisante pour fournir un vaccin réellement actif, même lorsqu'utilisé en combinaison avec des adjuvants immunologiques visant à induire une amplification de l'effet immunogène au niveau de l'organisme vivant vacciné, ou encore ne permettent pas la fixation contrôlée de l'haptène mis en oeuvre. Il en est particulièrement ainsi des anatoxines, telles que l'anatoxine tétanique, dont l'utilisation a déjà été envisagée dans ce type d'expérimentations.

10 L'invention a pour but de remédier à ces difficultés au moins en partie, plus particulièrement de fournir des conjugués résultant du couplage entre un haptène et une molécule porteuse aisément reconnue par l'organisme de l'être vivant auquel le vaccin est destiné, et susceptible de permettre la retenue par couplage de l'haptène utilisé, dans des proportions relatives vis-à-vis de la molécule porteuse, réglables à des valeurs voulues au moins à l'intérieur de certains intervalles de valeurs possibles.

20 L'invention a aussi plus particulièrement pour objet un procédé de préparation d'un principe immunogène du type sus-indiqué.

Le produit selon l'invention consiste en un conjugué moléculaire détoxifié ayant des propriétés immunogènes et de préférence vaccinales à l'égard d'un principe pathogène déterminé et comportant un ou plusieurs haptènes portant au moins un déterminant antigénique caractéristique dudit principe pathogène et fixés sur une molécule porteuse, ce conjugué étant plus particulièrement caractérisé en ce que la molécule porteuse est dérivée d'une toxine ou d'un fragment de toxine et que les haptènes sont fixés, de préférence par l'intermédiaire d'une liaison -NH-CO- ou -CO-NH- sur des résidus amino-acyle entrant dans la constitution de ladite toxine, autres que l'un ou l'autre des groupes amino-acyles terminaux de la molécule porteuse.

L'invention concerne aussi un procédé de

préparation d'un principe immunogène doté de propriétés vaccinales à l'égard d'un principe pathogène déterminé, comprenant la réalisation d'un couplage entre un haptène comportant un déterminant antigénique caractéristique dudit principe pathogène déterminé et une molécule porteuse, ladite réaction de couplage ayant lieu entre les fonctions carboxyle et amine respectivement dudit haptène et de ladite molécule porteuse ou vice-versa. Le procédé selon l'invention est plus particulièrement caractérisé en ce que la molécule porteuse mise en oeuvre dans la réaction de couplage covalente avec l'haptène, est constituée par une toxine ou un fragment de cette toxine, et en ce que le produit de couplage est détoxifié postérieurement à la réaction de couplage.

L'expression "principe pathogène" désigne tout antigène à l'égard duquel une vaccination est recherchée. On mentionnera, à titre d'exemple non limitatif des antigènes pathogènes en question, les principes actifs constitués ou produits par des micro-organismes infectieux (bactéries, virus, rickettsies, parasites, etc.).

Dans le cadre de l'invention, on donne au terme "haptène" un sens très large. Il signifie tout haptène ou fragment hapténique de faible poids moléculaire, quel que soit son mode d'obtention, qu'il s'agisse de fractionnement, de dépolymérisation, de synthèse ou de recombinaison génétique.

L'expression "déterminant antigénique", telle qu'elle est utilisée dans le présent texte, signifie toute configuration, notamment de surface, de l'haptène susceptible d'être reconnue par un anticorps préalablement formé à l'égard d'un antigène ayant un site en commun avec cet haptène. L'haptène dont la conformation peut être modifiée par la conjugaison à la toxine et détoxification ultérieure, conformément à l'invention, induit in vivo des anticorps ou une réaction spécifique à médiation cellulaire, non seulement contre lui-même, mais en outre - dans le cas où l'haptène a un élément de

structure en commun avec un antigène natif- contre l'antigène natif lui-même. Par exemple, un haptène consistant en une séquence comprenant un nombre réduit d'acides aminés est, quand il est couplé à une toxine dans les conditions sus-indiquées, capable d'induire in vivo la formation d'anticorps actifs contre le polypeptide ou la protéine antigénique ayant en commun avec l'haptène la même séquence d'acides aminés.

Il en est naturellement de même en ce qui concerne des haptènes non exclusivement peptidiques. A cet égard, l'haptène consiste par exemple en une structure osidique de poids moléculaire réduit, pouvant être constituée d'un monosaccharide ou de plusieurs monosaccharides liés entre eux par une liaison de type glycosidique.

Plus particulièrement, les haptènes susceptibles d'être mis en oeuvre dans le cadre de l'invention peuvent avoir en commun des éléments de structure avec des constituants de ces agents pathogènes (tels que bactéries, virus, parasites, rickettsies, protozoaires, etc.).

A titre d'exemple, on mentionnera les haptènes ayant des éléments de structure en commun avec des protéines antigéniques appartenant aux enveloppes des virus de la grippe, des virus herpétiques, ou encore des protéines de parois bactériennes, par exemple streptococciques, etc.

De préférence, les haptènes mis en jeu sont constitués par des peptides obtenus par synthèse chimique. Les haptènes ayant des éléments de structure en commun avec les protéines portant l'immunogénicité de l'antigène HBs Ag du virus de l'hépatite virale B constituent des haptènes tout particulièrement préférés.

Par "toxine", on entend toute substance à la fois toxique et antigénique, élaborée par des micro-organismes pathogènes, et susceptible d'induire dans un organisme des anticorps neutralisant non seulement la toxine elle-même, mais également les micro-organismes producteurs. De préférence, il s'agit de toxines ou de fragments de toxines ayant conservé l'immunogénicité

propre à ces toxines, contre lesquels une partie importante de la population humaine ou animale est immunisée. La capacité de l'organisme de produire des anticorps à l'égard de cette toxine permettra une exaltation de l'immunogénicité acquise par les conjugués formés selon le procédé selon l'invention à l'égard de l'antigène natif ayant des éléments de structure en commun avec les hap-

5 tènes couplés entrant dans la constitution des conjugués selon l'invention.

10 Une classe préférée de toxines ou de fragments de toxines entrant dans la mise en oeuvre de l'invention est constituée par la toxine diphtérique, la toxine tétanique, la cytotoxine de Shigella ou des fragments de cytotoxine de Shigella comportant des déterminants anti-

15 géniques essentiels de la toxine de Shigella, la toxine du choléra ou des fragments de toxine du choléra comportant des déterminants antigéniques essentiels de la toxine du choléra.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la réaction de couplage met en jeu :

20

- soit des fonctions amine libres portées par des résidus lysyle ou ornithyle entrant dans la constitution de ladite toxine ou dudit fragment de toxine et des fonctions carboxyle terminales de l'haptène ;

25 - soit des fonctions carboxyliques portées par des résidus aspartyle ou glutamyle et des résidus aminés terminaux de l'haptène.

Dans des modes de mise en oeuvre préférés du procédé selon l'invention, la réaction de couplage entre les groupes amino de l'haptène et les groupes carboxyle de la molécule porteuse ou vice-versa, peut être effectuée par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde.

30

On peut aussi avoir recours à des agents de couplage constitués par des carbodiimides tels que le 1-éthyl-3,3'-diméthylaminopropylcarbodiimide (CDI), utilisé de préférence en combinaison avec le s-hydroxybenzotriazole pour catalyser la réaction.

35

Pour effectuer le couplage, on peut également utiliser tout agent de couplage dans la mesure où il peut former des liaisons entre les groupes carboxy libres de l'haptène et les groupes amino de la molécule porteuse ou vice-versa. On pourra utiliser comme agent de couplage, les composés suivants cités à titre non limitatif : chloroformiate d'éthyle, diisocyanate, bis-diazobenzidine, di- et trichloro-s-triazine, benzaquinone, ainsi que les agents de couplage mentionnés dans Scand. J. Immunol., 10 1978, vol. 8, p. 7-23 (AVRAMEAS, TERNYNCK, GUESDON):

De préférence encore, la détoxification postérieure met en jeu un aldéhyde tel que le glutaraldéhyde ou de préférence le formol. Mais d'une façon générale, tout procédé de modification des groupes  $\text{NH}_2$  libres, non 15 engagés dans une liaison peptidique, tels que des groupes lysyle, portés par des groupes amino-acyle inclus dans la toxine, par exemple par une réaction de succinylation, ces modifications devant naturellement s'accompagner d'une réduction de la toxicité de la toxine naturelle. 20

Il résulte de ce qui précède que le procédé selon l'invention permet du moins en théorie de fixer sur la toxine jouant le rôle de molécule porteuse un nombre de groupes haptène pouvant atteindre jusqu'au nombre des 25 groupes amino-acyle portant soit un groupe carboxyle, soit un groupe aminé non engagé dans les liaisons intrapeptidiques de la toxine. Bien entendu, il s'agit d'un nombre essentiellement théorique puisque l'on peut penser que seules les fonctions carboxyle ou amine en cause, 30 qui se trouvent exposées à la surface de la protéine, pourront intervenir dans la réaction de couplage. Ceci étant, la réalisation de la détoxification seulement après la réaction de couplage conduit à un produit susceptible de contenir une proportion beaucoup plus 35 élevée de groupes haptène rapportés à chaque molécule de toxine que ne le permettent les procédés devenus classiques de couplage des haptènes sur des toxines

8

détoxifiées au préalable (anatoxines).

Le procédé selon l'invention est d'un intérêt tout particulier lorsque les déterminants antigéniques ou sites antigéniques des haptènes fixés sur la toxine ne comportent pas eux-mêmes de groupes susceptibles d'être affectés par l'opération de détoxification postérieure, par exemple par le formol, le glutaraldéhyde ou autres réactifs appropriés. Lorsque l'haptène est constitué par un peptide et que, par exemple, le déterminant antigénique porté par ce peptide est constitué par une séquence d'amino-acyles dépourvue de résidus lysyle ou le cas échéant encore arginyle, cystyle ou ornithyle, on conçoit que les effets de la détoxification ultérieure seront limités à ceux de la toxine jouant le rôle de molécule porteuse, les déterminants antigéniques eux-mêmes restant sensiblement non touchés. Réciproquement, il en sera de même lorsque la réaction de détoxification interviendra au niveau des groupes amino-acyle intrapeptidiques portant des groupes carboxyle libres.

Une catégorie préférée de conjugués selon l'invention sont donc ceux dans lesquels la molécule porteuse est dérivée d'une toxine ou d'un fragment de toxine et dans lesquels les liaisons entre la toxine et l'haptène interviennent au niveau d'un amino-acyle intrapeptidique initialement porteur d'une fonction amine libre (par exemple lysyle) et dans lesquels les groupes haptène ne comportent pas eux-mêmes d'amino-acyle intrapeptidiques porteurs d'un groupe  $\text{NH}_2$  libre, plus particulièrement le groupe lysyle. Parmi les conjugués préférés de l'invention entrent cependant également ceux dans lesquels les groupes haptènes portent de tels amino-acyles à groupes amine libres, par exemple des lysyles, dans des régions extérieures à celles formant le déterminant antigénique, l'immunogénicité acquise n'étant alors pas modifiée par la modification chimique appliquée auxdits amino-acyles, notamment lysyle, à l'occasion de la réaction de détoxification ultérieure.

D'une façon générale, on a recours pour la réalisation de l'invention à des toxines ou fragments de toxines ayant un poids moléculaire au moins égal à 2 000 et à des haptènes constitués par des peptides contenant de 5 à 40 résidus amino-acyle.

Comme cela a été indiqué plus haut, les haptènes préférés sont ceux qui possèdent des éléments de structure en commun avec la séquence peptidique définissant l'antigène HBs Ag. L'invention peut naturellement tenir compte, pour ce qui est du choix des résidus amino-acyle à enchaîner, des variations de structure qui peuvent être observées dans l'antigène naturel, par exemple tel qu'évoqué dans l'article de Pierre TIOLLAIS et al., intitulé "Biology and hepatitis B virus", Science (1981), vol. 213, 406-411. Ces variations au niveau des résidus amino-acyle s'observent en effet lorsque l'on passe d'un sous-type à un autre sous-type du virus de l'hépatite B.

Parmi les séquences peptidiques préférées, on retiendra les suivantes :

Ala-Gln-Gly-Thr-Ser  
 Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser  
 Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser

Comme haptènes préférés, on peut citer les fragments peptidiques ayant des séquences de résidus (amino-acyle) communs avec les principaux peptides constitutifs de l'antigène HBs Ag, notamment ceux dont les amino-acyles correspondent à ceux qui dans la séquence de HBs Ag occupent les positions suivantes :

48-81 : H<sub>2</sub>N-Cys-Leu-Gly-Glu-Asn-Ser-Glu-Ser-Pro-Thr-Ser-Asn-His-Ser-Pro-Thr-Ser-Cys-Pro-Pro-Thr-Cys-Pro-Gly-Tyr-Arg-Trp-Met-Cys-Leu-Arg-Arg-Phe-Ile-COOH  
 2-16 : H<sub>2</sub>N-Glu-Asn-Ile-Thr-Ser-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Leu-Val-Leu-Gln-COOH  
 22-35 : H<sub>2</sub>N-Leu-Thr-Arg-Ile-Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-Ser-Leu-Asp-Ser-Trp-COOH

95-109 : H<sub>2</sub>N-Leu-Val-Leu-Leu-Asp-Tyr-Gln-Gly-Met-Leu-Pro-Val-Cys-Pro-Leu-COOH

117-137 : H<sub>2</sub>N-Ser-Thr-Gly-Pro-Cys-Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser-Met-Tyr-Pro-Ser-Cys-COOH

5 117-135 : H<sub>2</sub>N-Ser-Thr-Gly-Pro-Cys-Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser-Met-Tyr-Pro-COOH

(selon la structure donnée par PASEK et al. et reproduite dans l'article de LERNER, GREEN et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, vol. 78, n° 6, p. 3 403-3 407, 1981).

10 Le fragment 122-137 de formule suivante :

H<sub>2</sub>N-Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser-Met-Tyr-Pro-Ser-Cys-COOH

est particulièrement avantageux.

15 Comme haptènes susceptibles d'être mis en oeuvre dans le procédé conforme à l'invention, on peut également citer les polypeptides, notamment les dimères correspondant aux peptides particuliers envisagés ci-dessus.

20 Un principe immunogène et vaccinant préféré contre l'hépatite B met en jeu une molécule porteuse dérivée de la toxine diphtérique et un haptène constitué par un peptide consistant en la séquence 122-137 de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B ou la contenant, ce peptide étant éventuellement oligomérisé, notamment dimérisé. Ce peptide est éventuellement encore constitué par la séquence 121-137 de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, dans laquelle les résidus cystéyle sont protégés par des groupes protecteurs tels que l'acétamidométhyle, afin d'éviter la formation de ponts disulfures. Le conjugué moléculaire, notamment selon ce mode de réalisation préféré de l'invention, peut contenir de 1 à environ 10 molécules d'haptène par molécule porteuse, notamment de l'ordre de 4 molécules d'haptènes par molécule porteuse.

35 A titre d'exemple d'autres haptènes préférés mis en oeuvre dans la fabrication des principes immunogènes selon l'invention, dont l'utilisation peut être envisagée

cette fois-ci dans la vaccination contre les diarrhées chez l'homme et l'animal, on mentionnera un peptide  $(P)_n$ , comportant au plus  $18n$  amino-acides et au moins  $4n$  amino-acides, P étant contenu dans l'enchaînement peptidique suivant :

5 Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-Cys-Cys-A-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-T(I)  
(N-ter) (C-ter)

dans lequel :

- soit A représente Asn et T représente Tyr,
- 10 - soit A représente Tyr et T représente Asn, et dans lequel  $n = 1$  ou  $2$ ,  $n$  ne pouvant être égal à  $1$  que dans le cas où P ne contient pas de cystéyle, et dans lequel encore
- lorsque  $n = 1$ , les groupes thiol des éventuels résidus cystéyle présents dans la molécule ont été protégés
- 15 par des groupements stables dans les conditions biologiques, l'un au plus des groupes thiols pouvant être sous forme de groupe SH libre ou pouvant être protégé par un groupe non stable dans les conditions biologiques ;
- 20 - et dans lesquels lorsque  $n$  vaut  $2$ , la séquence peptidique P-P est constituée par deux séquences peptidiques P identiques comportant chacune au plus  $18$  acides aminés et au moins  $4$  acides aminés, contenues dans l'enchaînement peptidique de formule (I) ci-dessus indiquée, les
- 25 deux séquences peptidiques P étant reliées entre elles par l'intermédiaire d'une liaison disulfure établie entre l'atome de soufre de l'un quelconque des résidus cystéyle de l'une des deux séquences et l'atome de soufre de l'un quelconque des résidus cystéyle de l'autre
- 30 séquence, et caractérisée en ce que les autres groupes thiols, éventuellement présents, non engagés dans la liaison disulfure des éventuels résidus cystéyle, sont protégés par un groupement protecteur stable dans les conditions biologiques.

35 Ces peptides seront dans la suite désignés par "entérotoxines synthétiques ST".

Parmi ces entérotoxines synthétiques ST, une

autre classe avantageuse d'haptènes entrant dans la constitution des principes immunogènes selon l'invention est constituée par les peptides P, qui contiennent l'une des séquences suivantes, ou bien qui répondent à la formule suivante :

- 5 -Asn-Thr-Phe-Tyr-  
 -Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-  
 -Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-  
 -Cys-Cys-Tyr-Pro-Ala-Cys-  
 10 -Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-  
 -Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Glu-Leu-  
 -Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-  
 -Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Tyr-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-  
 15 Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-  
 Ala-Gly-Cys-Tyr (1)

Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Tyr-Pro-Ala-Cys-  
 Ala-Gly-Cys-Asn (2)

20

Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Gly-Gly-Gly

Parmi les entérotoxines ST, une autre classe préférée d'haptènes est constituée par les polypeptides, notamment dimères P-P dans lesquels P contient ou représente les séquences peptidiques indiquées ci-dessus.

25

Parmi les entérotoxines synthétiques ST, les polypeptides particulièrement préférés ont pour formule :

Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys  
 |  
 Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys

30

Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys  
 |  
 Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys

Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr  
 Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr

35

Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Tyr-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Asn  
 Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-Gly-Leu-Cys-Cys-Tyr-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Asn

Dans la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, lorsque l'haptène est constitué par l'un des peptides ci-dessus désignés par "entérotoxines synthétiques ST", il sera avantageux de choisir comme molécule porteuse une toxine différente de la toxine tétanique et de la toxine de Shigella.

L'exemple suivant, relatif au procédé de préparation d'un principe immunogène, doté de propriétés vaccinales vis-à-vis de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, permettra de mieux comprendre l'invention, sans en limiter la portée.

Plus particulièrement, les deux exemples qui suivent, concernent la synthèse d'haptènes.

#### EXEMPLE 1

Dans cet exemple, l'haptène est constitué par la séquence Ala<sup>\*</sup>-122-137 ou le dimère correspondant, comportant l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (Ala<sup>\*</sup> correspondant au fait que le C de l'alanine porteur des fonctions acide et amine est du carbone 14).

La présence du résidu Ala<sup>\*</sup>, à l'une des extrémités de la séquence, permet de contrôler la purification.

Pour préparer la séquence Ala<sup>\*</sup> 122-137, on peut avoir recours au procédé classique de synthèse peptidique en phase solide tel que celui proposé par R. B. MERRIFIELD dans l'article intitulé "Solid phase peptide synthesis" J. Am. Chem. Soc., 45, 2 149-2 154, 1963.

Pour pouvoir éventuellement obtenir le dimère correspondant à ce monomère, on protège de façon différente les fonctions thiols des résidus de cystéine 124 et 137.

Pour préparer le peptide Ala<sup>\*</sup> 122-137, on a recours à la synthèse peptidique mentionnée ci-dessus et on procède comme suit ou de façon équivalente.

Les abréviations utilisées dans le cadre de cette synthèse ont la signification suivante :

T-BOC : t-butyl-oxy-carbonyle

Arg : arginine  
Cys : cystéine  
Thr : thréonine  
Ala : alanine  
5 Glu : acide glutamique  
Gln : glutamine  
Gly : glycine  
Met : méthionine  
Ser : sérine  
10 Pro : proline  
Tyr : tyrosine.

On utilise comme amino-acides des L-alpha amino-acides protégés uniquement avec le groupe t-butyloxycarbonylesur l'alpha amino.

15 Les groupes fonctionnels latéraux sont protégés comme suit :

- le groupe guanidyle de l'arginine 122 est protégé par un groupe nitro ;
- le groupe thiol de la cystéine 124 est protégé par le méthoxybenzyle ;
- 20 - le groupe thiol de la cystéine 137 est protégé par l'acétamidométhyle ;
- le groupe hydroxyle des thréonine 123, 126, 127, 131 et des sérine 132, 136 sont protégés par l'o-benzyléther.
- 25

Il est avantageux d'utiliser un support de résine constitué par un copolymère chlorométhylé de styrène et de divinylbenzène à 1 % (commercialisé par les laboratoires BIORAD) et contenant 1,2 meq de chlore par gramme de résine.

30

La fixation du premier acide aminé sur la chaîne est effectuée par la méthode de GISIN (Helv. Chem. Acta, 56, 5, 1 476, 1973) au sel de cesium dans le diméthylformamide à 50°, une nuit. Les chlores qui n'ont pas été substitués par la cystéine le sont par un acétyle grâce à un traitement semblable par l'acétate de cesium.

35

La substitution calculée par la méthode de

GISIN (Analyt. Chem. Acta, 58, 248, 1972) est de 0,46 mM de cystéine par gramme de résine.

Après fixation du premier amino-acide sur la chaîne, les autres acides aminés sont fixés les uns après les autres, sur la chaîne peptidique déjà formée.

Après la fixation de chaque acide aminé, on traite la peptidyle résine par de l'acide trifluoroacétique à 30 % dans le chlorure de méthylène, ce qui élimine le t-BOC. Dès que l'on a introduit la méthionine 133, on ajoute au mélange acide 1 % de 1,2-éthane-dithiol, pour éviter l'oxydation de la méthionine en méthionine sulfoxyde puis sulfone.

Pour fixer chacun des acides aminés à la chaîne peptidique déjà formée, on a recours à un excès d'acide aminé protégé dont la fonction acide est activée par le dicyclohexylcarbodiimide auquel du 1-hydroxybenzotriazole est ajouté en quantité équimoléculaire pour minimiser les réactions secondaires de racémisation (A. ARENDT, A. M. KOLODZIEJZKYK, 1978, Tetrahedron Letters, 40, 3 867), (S. MOJSOV, A. R. MITCHELL, 1980, J. Org. Chem. 45, 555) et surtout KONIG et R. GEIGER, Chem. Bet., 103, 788-798, 1970.

De façon pratique, on prépare extemporanément un mélange équimolaire de dicyclohexylcarbodiimide et de 1-hydroxybenzotriazole et on l'ajoute en quantité équimolaire à une solution de l'acide aminé dans un mélange équivolumique de diméthylformamide et de chlorure de méthylène.

Les quantités utilisées dans l'exemple sont les suivantes :

- dicyclohexylcarbodiimide : 1,5 mM
- H OBt : 1,5 mM
- acide aminé protégé : 1,5 mM pour 1 g de résine.

Après chaque étape d'addition d'un acide aminé, un test qualitatif à la ninhydrine permet de contrôler le couplage sur la chaîne peptidique (E. KAISER,

R. L. COLESCOTT et al., 1976, Anal. Biochem., 34, 595).

Chaque acide aminé est couplé systématiquement deux fois, même si le test révèle un couplage total.

A la fin de la synthèse, par un traitement à l'acide fluorhydrique liquide, on élimine tous les groupes protecteurs fixés (sauf le groupe acétamidométhyl fixé sur le groupe sulfhydrile de la cystéine 137, le groupe acétamidométhyle étant stable vis-à-vis de ce réactif (VEBER et al., 1972, J. Am. Chem. Soc., 94, 5 456) sur le peptide porté par la résine. En même temps, le peptide est détaché de la résine à l'aide de 10 ml d'Hf par gramme de résine en présence d'anisol, 1 ml/g. On ajoute au milieu réactionnel 50 mg de méthionine pour éviter l'oxydation des résidus méthionyle de la séquence peptidique obtenue et 50 mg de tyrosine, pour éviter la refixation du groupe o-benzyléther sur les résidus tyrosyle de la séquence peptidique. Le détachement du peptide se fait en environ 1 heure à 0°C. Après élimination de l'acide fluorhydrique, le mélange réactionnel est lavé à l'éther et le peptide est récupéré par extraction à l'aide d'acide acétique 1M (6 x 20 ml).

Les extraits sont dilués à l'eau et lyophilisés.

Le peptide brut est dissous à raison d'environ 400 mg dans environ 3 ml d'acide acétique 1M et après élimination des produits insolubles par centrifugation, on purifie le peptide à 4°C par chromatographie sur une colonne du type de celle contenant un tamis moléculaire, désignée par BIOGEL P6, et commercialisée par BIORAD.

Des fractions de 6 ml sont collectées à raison de 10 fractions par heure.

La détection des effluents s'effectue à 254 et 280 nm, et par mesure de la radio-activité dans chacune des fractions. Les fractions 105 à 200 sont collectées et lyophilisées.

On rappelle qu'à la fin de la synthèse, le groupe sulfhydrile de la cystéine 124 a été libéré, tandis que le groupe sulfhydrile de la cystéine 137, est

toujours protégé par l'acétamidométhyle, pour permettre par une oxydation ultérieure la formation d'un pont disulfure entre les Cys 124.

Pour former le pont disulfure, après lyophilisation, on dissout environ 150 mg du peptide dans 5 ml de tampon carbonate d'ammonium à pH 8 et on laisse sous agitation à température ambiante pendant une nuit.

La réaction d'ELLMANN, qui correspond à la mise en évidence des fonctions thiols libres (réf. Articles de G. L. ELLMAN publiés dans Archives Biochemistry Biophysica, vol. 74, p. 443 (1958) et vol. 82, p. 70 (1959) est alors négative, ce qui prouve qu'il y a eu formation de liaisons disulfures entre les groupes thiols des résidus cystéyle non protégés, et le peptide est recueilli après lyophilisation.

On dissout ensuite 150 mg de peptide dans une solution d'acétate d'ammonium à 1 millisiemens amenée à pH 4 avec de l'acide acétique. Ils sont appliqués sur une colonne de 3 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre, comportant une résine de type carboxyméthyl cellulose. Ils sont élués à l'aide d'un gradient de conductivité de 1 à 18 millisiemens et de pH à 4,5. Des fractions de 12 ml sont recueillies à raison de 5 par heure. La détection du peptide s'opère à 280 et 254 nm et par mesure de la radioactivité. Les fractions 13 à 23 qui s'éluent à 4,3 ms, sont recueillies et lyophilisées.

On effectue ensuite le dessalage sur une colonne du type de celle contenant un tamis moléculaire commercialisée par BIORAD, sous la désignation BIOGEL P2 avec pour éluant de l'acide acétique 1M. Des fractions de 3 ml sont collectées en 6 minutes.

Les fractions 20 à 40 sont recueillies et lyophilisées. Le rendement est de 40 mg, soit 5 % par rapport à la substitution initiale.

Le peptide est ensuite identifié. Il est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %, à

pH 8 où il se révèle en tache unique au bleu de coomassie.

La composition en acides aminés après hydrolyse acide (HCl 5,5 N + 0,5 % mercaptoéthanol, 24 h, 110°C) est la suivante :

5 Ala (2) : 2,24 ; Arg (1) : 1,03 ; Cys : non déterminée ;  
 Glu (1) : 1,09 ; Gly (1) : 0,95 ; Met (2) : 1,83 ; Pro  
 (1) : 1,01 ; Ser (2) : 1,6 ; Thr (4) : 3,5 ; Tyr (1) : 0,91.

Le produit obtenu a la structure suivante :

H<sub>2</sub>N-Ala<sup>\*</sup>-Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser-Met-Tyr-Pro-Ser-Cys-COOH  
 10 H<sub>2</sub>N-Ala<sup>\*</sup>-Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser-Met-Tyr-Pro-Ser-Cys-COOH

EXEMPLE 2

Dans cet exemple, l'haptène est constitué par la séquence suivante :

	121		130		137
15	Cys-Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln-Gly-Thr-Ser-Met-Tyr-Pro-Ser-Cys				
	Acm		Acm		Acm

dans laquelle les résidus cystéyle 121, 124 et 137 sont protégés par l'acétamidométhyle (Acm), afin d'éviter la cyclisation due à la formation de ponts disulfures.

20 La synthèse finale de cet heptacosapeptide a été effectuée en phase liquide par la condensation de deux segments, eux-mêmes synthétisés, pas à pas, selon la méthode REMA (BEYERMAN H. C., Chemistry of Peptides, 1972, Meienhofer S. ed., p. 351-357, Ann. Arbor Scientific  
 25 Publ. Michigan) : activation de l'acide aminé ou du peptide N-protégé par la formation de l'anhydride non symétrique avec le chloroformiate d'isobutyle en présence de N-méthyl-morpholine, dans le diméthylformamide comme solvant. Le rendement moyen des condensations est de 65 %.

30 Le groupement t-BOC (t-butyloxycarbonyle) est utilisé comme protection temporaire de la fonction aminée, tandis que les groupements Acm (acétamidométhyl), NO<sub>2</sub> (nitro) et Bzl (benzyl) sont utilisés comme protection permanente des fonctions latérales.

35 Le t-BOC est enlevé par acidolyse (acide formique HCl 0,12 N), rendement 85 % et les autres groupements y compris la fonction ester C-terminale sont libérés,

en fin de synthèse, par action du HF (acide fluorhydrique) excepté le groupement AcM que l'on garde.

a) Segment 121-130

5 Au cours de la synthèse de ce décapeptide, pour mettre au point les conditions opératoires, il faut tenir compte d'une part de la forte solubilité dans l'eau des di- et tripeptides 129-130 et 128-130, et d'autre part, de l'insolubilité dans les solvants usuels (chlorure de méthylène, acétate d'éthyle) du peptide dès l'introduction de la première thréonine 127 et ceci jusqu'à la fin de la synthèse. A chaque étape, les produits intermédiaires sont caractérisés par leur Rf, leur point de fusion et leur analyse en CHN. La composition finale du peptide est confirmée par l'analyse en acides aminés.

15 b) Segment 131-137

La synthèse de cet heptapeptide, faite selon une méthode est semblable à celle utilisée pour la synthèse du segment 121-130.

20 c) Condensation des deux segments 121-130 et 131-137

On peut coupler ces deux segments par l'intermédiaire de l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxy-tris(diméthylamino)phosphonium (BOP) (CASTRO B. et al., Tetrahedron Letters, 1975, 14, p. 1 219), mais cette méthode nécessitant que la fonction carboxyle du peptide subissant l'aminolyse soit libre, implique la saponification préalablement de l'ester.

On a de préférence recours à la méthode à l'azide (HONZ J. et al., Coll. Czech. Chem. Commun., 1961, 26, p. 2 333) qui permet de partir de l'ester. Cependant, cette méthode est délicate à réaliser. Le segment 121-130, sous forme d'hydrazide réagit à très basse température (-50°C) avec le nitrite d'isoamyle pour donner le dérivé nitroso qui, par déshydratation, conduit à l'azide correspondant ; ce dernier réagit avec la fonction N-terminale, libérée du segment 131-137, pour donner le peptide final.

Après douze heures, à  $-30^{\circ}\text{C}$ , 48 heures à la température ambiante, le mélange réactionnel, amené à sec, est soumis à l'action de l'acide fluorhydrique à  $0^{\circ}$ , purifié par passage sur colonne du type de celle commercialisée sous le nom P6. L'élution est effectuée avec l'acide acétique 1M. La pureté et la composition du produit final sont vérifiées par chromatographie électrophorèse aux pH 6,4 et 3,7. Le tampon est le butanol-acide acétique-eau-pyridine (BWAP). Les tests de Sakaguchi pour mettre en évidence les résidus arginyle déprotégés (décrits par E. BUJARD vgl G. PATAKI, "Dünnschichtchromatographie in der Aminosauer und Peptid Chemie", page 109, W. de Gruyter und Co. Berlin 66) et de Pauli pour mettre en évidence les résidus tyrosyle déprotégés (décrits par E. von ARX et R. NEHER, J. Chromatog., 12, 329, 1963) sont positifs.

La pureté est également vérifiée par analyse en acides aminés. Ce peptide est obtenu pur avec un rendement final de 5 %.

### 20 EXEMPLE 3

L'exemple suivant est relatif à la préparation d'un conjugué moléculaire dans lequel l'haptène est constitué par le dimère obtenu par dimérisation de la séquence Ala<sup>\*</sup>122-137 de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B (voir exemple 1) et la molécule porteuse est constituée par la toxine diphtérique. Le couplage entre l'haptène et la molécule porteuse est effectué en utilisant comme agent de couplage une carbodiimide soluble. On a avantageusement recours à une carbodiimide du type de la 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide, désignée ci-après par EDAC, commercialisée par BIORAD Laboratories, Richmond, Cal., USA.

On procède ensuite comme suit ou de façon équivalente :

35 4 mg de peptide et 8 mg de toxine diphtérique en solution dans 2 ml de solution saline de tampon phosphate de sodium à pH 7,6, ci-après désignée PBS, sont

mélangés avec 3 ml de NaCl 0,15 % contenant 100 mg d'EDAC. Après homogénéisation, cette solution est laissée dans l'obscurité et à la température de laboratoire pendant 18 heures. La solution est ensuite dialysée contre un tampon phosphate 0,067 M, pH 7,8, pendant 48 heures.

On ajoute ensuite 0,2 % (concentration finale) de formol et on laisse incuber à la température du laboratoire et à l'obscurité pendant 15 jours.

Etant donné que le peptide 122-137 est radio-actif ( $^{14}\text{C}$ ) et que sa radio-activité spécifique est de 6 000 CPM/mg), il est facile de calculer le rendement de couplage. En effet, la radio-activité restant associée avec la toxine après le couplage est de 4 950 CPM, soit 825  $\mu\text{g}$  de peptide représentant  $3 \times 10^{17}$  molécules. Le nombre de molécules de toxine diphtérique contenues dans 8 mg étant de  $7,7 \times 10^{16}$ . On a donc :

$$\frac{3 \times 10^{17}}{7,7 \times 10^6} \approx 4 \text{ molécules de peptide par molécule de toxine diphtérique}$$

ETUDE DES PROPRIETES DES CONJUGUES MOLECULAIRES SELON

## 20 L'INVENTION

1° Etude du dimère (obtenu à partir de la séquence Ala<sup>\*</sup>122-137 libre)

Cinq souris Balbc femelles, de trois semaines, ont été immunisées avec le dimère obtenu à l'exemple 1, non couplé, de la façon suivante :

- au jour 1, chaque souris a reçu intrapéritonéalement 10  $\mu\text{g}$  du peptide dans 50  $\mu\text{l}$  de PBS, émulsifiés avec 50  $\mu\text{l}$  d'adjuvant complet de Freund ;

- au jour 15, chaque souris a reçu en injection sous-cutanée la même dose de rappel émulsifiée avec 50  $\mu\text{l}$  d'adjuvant incomplet de Freund ;

- aux jours 30, 45, 60, 75, on a effectué des saignées d'essai. Le titrage des sera est fait avec le kit AUSAB (kit commercialisé par ABBOTT permettant de doser les anticorps anti-HBs) en utilisant comme référence des immunoglobulines humaines anti-HBs Ag titrées à 1 UI/ml, fournies par le CENTRE NATIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE (CNTS).

Les résultats exprimés en UI/ml sont rassemblés dans le tableau ci-après.

Souris	Journal 30	Journal 45	Journal 60	Journal 75
S1	0	0	0	0
S2	0	6	-	7
S3	0	0	4	0
S4	0	0	0	0
S5	0	7	6	8

2° Etude du conjugué moléculaire constitué par le dimère obtenu à partir de la séquence Ala\* 122-137 couplé à la toxine diphtérique selon le procédé de l'invention

Cinq souris Balbc femelles, de trois semaines, ont été immunisées avec le dimère obtenu à l'exemple 1, couplé à la toxine diphtérique, le rapport de 3,89 moles de peptide par mole de toxine, de la façon suivante :

- au jour 1, chaque souris a reçu intrapéritonéalement du peptide couplé à la toxine dans 55 µl du tampon couplage émulsifiés avec 55 µl d'adjuvant complet de Freund ;

- au jour 15, même dose de rappel sous-cutanée émulsifiée avec de l'adjuvant incomplet de Freund ;

- aux jours 30, 45, 60, 75, saignées d'essai titrage dans les mêmes conditions.

Les résultats exprimés en UI/ml sont rassemblés dans le tableau ci-après.

Souris	Jour 30	Jour 45	Jour 60	Jour 75
5 S6	0	4	7	9
S7	34	40	78	57
S8	0	14	17	24
S9	0	12	7	9
10 S10	0	0	0	0

L'immunisation des souris montre qu'au jour 75, après l'injection du conjugué moléculaire constitué par le dimère Ala<sup>\*</sup>122-137-toxine diphtérique, on obtient 15 des titres d'anticorps plus élevés qu'avec le dimère seul.

Des résultats analogues à ceux-ci sont obtenus avec le peptide de l'exemple 2.

Les résultats obtenus sont très significatifs de l'activité immunogène que possèdent les conjugués selon l'invention, et ce dans des conditions loin d'être aussi favorables que celles qui sont susceptibles de prévaloir chez l'homme, puisque chez celui-ci, on peut s'attendre à un effet potentialisateur de l'effet immunogène des haptènes supportés par le conjugué, dû à la capacité d'une population généralement vaccinée contre la diphtérie de produire plus rapidement des anticorps à l'encontre d'un conjugué comportant une molécule porteuse assimilable à l'anatoxine diphtérique. Il va de soi que les mêmes conditions prévaudront à l'égard d'autres conjugués selon l'invention, notamment de tous ceux qui comprendront une molécule porteuse assimilable à une anatoxine, déjà susceptible d'être reconnue par une population vaccinée contre le micro-organisme sécrèteur de la toxine correspondante.

Les conjugués moléculaires selon l'invention n'induisent aucune activité toxique, susceptible de se

manifester sous la forme de symptômes consistant en paralysie des membres postérieurs, troubles cardiaques du type des fibrillations, lorsqu'ils sont administrés à la souris à une dose atteignant 20 µg/g de souris.

5 L'invention concerne naturellement également les compositions préparées sous forme de vaccins contenant le conjugué selon l'invention, en association avec un véhicule approprié à l'administration desdits vaccins à l'homme ou à l'animal.

10 Des compositions pharmaceutiques avantageuses sont constituées par des solutions, suspensions ou liposomes injectables, contenant une dose efficace d'au moins un conjugué selon l'invention. De préférence, ces solutions, suspensions ou formes liposomes sont réalisées  
15 dans une phase aqueuse stérilisée isotonique, de préférence saline ou glucosée.

L'invention concerne plus particulièrement de telles suspensions, solutions ou formes liposomes qui sont aptes à être administrées par injections intradermiques,  
20 intramusculaires ou sous-cutanées, ou encore par scarifications.

Elle concerne également des compositions pharmaceutiques administrables par d'autres voies, notamment par voie orale ou rectale, ou encore sous forme d'aérosols  
25 destinés à venir en contact avec des muqueuses, notamment les muqueuses oculaires, nasales, pulmonaires ou vaginales.

Ces compositions pourront, le cas échéant également, comporter un adjuvant immunologique, tel que la  
30 N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine ou l'un de ses nombreux dérivés et homologues qui ont déjà été décrits dans la littérature antérieure scientifique et technique.

Comme il va de soi, l'invention étend également ses effets à tous les équivalents et variantes de l'invention  
35 que la présente description rend accessibles à l'homme de l'art.

Il est en particulier entendu que tous principes

vaccinants ayant une structure moléculaire du même type que les conjugués définis dans les revendications qui possèdent la même constitution et les mêmes propriétés physiques, chimiques et biologiques constituent des équivalents des produits revendiqués et comme tels, entrent dans le domaine de protection des revendications annexées à la présente description, quels que soient les procédés ayant servi à leur fabrication.

En ce qui concerne d'autres exemples d'haptènes susceptibles d'être utilisés, on pourra encore se reporter avec avantage au titre des différents types d'haptènes susceptibles d'être mis en jeu dans le couplage selon l'invention, aux séquences peptidiques décrites par T. P. HOPP et al. dans Proc. Nat. Acad. Sci., USA, vol. 78, n° 6, p. 3 824-3 828.

Bien entendu, les différents peptides et autres types d'haptènes visés dans la littérature et qui, à ce titre, peuvent être utilisés pour constituer des agents immunogènes tels que définis dans la présente demande de brevet, ne constituent que des exemples des nombreux haptènes qui peuvent être mis en oeuvre. Il va de soi que des haptènes répondant aux conditions de l'invention et correspondant à un antigène déterminé ne sont pas toujours immédiatement disponibles. Lorsque la constitution de l'antigène est ou peut être connue, notamment lorsque celui-ci consiste en un polypeptide dont la séquence est connue ou peut être déterminée, il appartiendra au spécialiste de rechercher ceux des éléments de la structure de cet antigène qui seraient susceptibles de porter un site immunogénique dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus. Plusieurs approches à l'égard de cette question ont déjà fait l'objet de publications antérieures. Pour mémoire, on citera par exemple les articles de LERNER et HOPP sus-mentionnés, dans lesquels sont proposées des méthodes d'investigation permettant un repérage des séquences contenues dans un antigène de structure peptidique et susceptible de porter un site immunogénique.

REVENDICATIONS

1. Conjugué moléculaire détourné ayant des propriétés immunogènes et de préférence vaccinales à l'égard d'un principe pathogène déterminé et comportant un ou plusieurs haptènes portant au moins un déterminant antigénique caractéristique dudit principe pathogène et fixés sur une molécule porteuse, ce conjugué étant plus particulièrement caractérisé en ce que la molécule porteuse est dérivée d'une toxine ou d'un fragment de toxine et que les haptènes sont fixés sur des résidus amino-acyle entrant dans la constitution de ladite toxine, autres que l'un ou l'autre des résidus amino-acyle terminaux de la molécule porteuse.

2. Conjugué moléculaire selon la revendication 1, caractérisé en ce que les haptènes sont fixés par l'intermédiaire d'une liaison -NH-CO- ou -CO-NH- sur des résidus amino-acyle entrant dans la constitution de la toxine, autres que l'un ou l'autre des résidus amino-acyle terminaux de la molécule porteuse.

3. Conjugué moléculaire selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il résulte de la réaction de couplage mettant en jeu :

- soit des fonctions amine libres portées par des résidus lysyle ou ornithyle, entrant dans la constitution de ladite toxine ou dudit fragment de toxine et des fonctions carboxyle terminales de l'haptène ;

- soit des fonctions carboxyliques portées par des résidus aspartyle ou glutamyle et des résidus aminés terminaux de l'haptène.

4. Conjugué moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la molécule porteuse est dérivée d'une toxine ou d'un fragment de toxine et les liaisons entre la toxine et l'haptène interviennent au niveau d'un amino-acyle intrapeptidique initialement porteur d'une fonction amine libre et dans lesquels les groupes haptène ne comportent pas eux-mêmes d'acyle intrapeptidiques porteurs d'un groupe NH<sub>2</sub> libre.

5 5. Conjugué moléculaire selon la revendication 4, caractérisé en ce que la molécule porteuse est dérivée d'une toxine ou d'un fragment de toxine et les liaisons entre la toxine et l'haptène interviennent au niveau de résidus lysyle ou ornithyle intrapeptidiques initialement porteurs d'une fonction amine libre et dans lesquels les groupes haptène ne comportent pas eux-mêmes de résidus lysyle ou ornithyle intrapeptidiques.

10 6. Conjugué moléculaire selon les revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les haptènes ont des éléments de structure en commun avec les protéines portant l'immunogénicité de l'antigène HBs Ag du virus de l'hépatite virale B.

15 7. Conjugué moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on a recours à une toxine ou un fragment de toxine ayant un poids moléculaire au moins égal à 2 000 et à des haptènes constitués par des peptides contenant de 5 à 40 résidus amino-acyle.

20 8. Conjugué moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte de 1 à environ 10, de préférence 4 molécules d'haptène par molécule porteuse.

25 9. Conjugué moléculaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'haptène est constitué par un peptide consistant en la séquence 122-137 de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, ou la contenant, ce peptide étant éventuellement oligomérisé, notamment dimérisé, ou par la séquence 121-137 de l'antigène de surface du virus de l'hépatite B dans laquelle les résidus cystéyle sont protégés par des groupes protecteurs, tels que l'acétamidométhyle.

30 10. Conjugué moléculaire selon les revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la toxine ou les fragments de toxine mis en oeuvre sont constitués par la toxine diphtérique, la toxine tétanique, la cytotoxine de Shigella ou des fragments de cytotoxine de Shigella comportant des déterminants antigéniques essentiels de

la toxine de Shigella, la toxine du choléra ou des fragments de toxine du choléra comportant des déterminants antigéniques essentiels de la toxine du choléra.

11. Conjugué moléculaire selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'haptène est constitué par la séquence 122-137 ou le dimère correspondant, et la toxine est constituée par la toxine diphtérique.

12. Procédé de préparation d'un conjugué moléculaire immunogène par couplage entre un haptène comportant un déterminant antigénique caractéristique d'un principe pathogène déterminé et une molécule porteuse dérivée d'une toxine déterminée détoxifiable, ladite réaction de couplage ayant lieu entre des fonctions réactives libres, notamment carboxyle et amine, respectivement dudit haptène et de ladite molécule porteuse ou vice-versa, et dans lequel la molécule porteuse mise en oeuvre dans la réaction de couplage covalent avec l'haptène, est constituée par la susdite toxine déterminée ou un fragment de cette toxine, et en ce que le produit de couplage est détoxifié postérieurement à la réaction de couplage.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la réaction de couplage entre les groupes amino de l'haptène et les groupes carboxyle de la molécule porteuse ou vice-versa, peut être effectuée par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde ou par des réactions de couplage peptidique, notamment en présence de carbodiimides.

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce que la réaction de couplage met en jeu :

- soit des fonctions amine libres portées par des résidus lysyle ou ornithyle entrant dans la constitution de ladite toxine ou dudit fragment de toxine et des fonctions carboxyle terminales de l'haptène ;
- soit des fonctions carboxyliques portées par des résidus aspartyle ou glutamyle et des résidus aminés terminaux de l'haptène.

15. Composition immunogène, de préférence dotée de propriétés vaccinales à l'égard d'un principe pathogène, caractérisée en ce qu'elle comporte, comme substance active, au moins l'un des conjugués moléculaires selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, en association avec un véhicule pharmaceutique physiologiquement acceptable.