

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

① N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 527 630

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②

N° 83 09006

⑤④ Enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, procédé pour sa préparation et agent thérapeutique la contenant.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 N 9/48; A 61 K 37/54.

②② Date de dépôt..... 31 mai 1983.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : JP, 31 mai 1982, n° PCT/JP 82/00213.

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 48 du 2-12-1983.

⑦① Déposant : Société dite : MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD. — JP.

⑦② Invention de : Ohnishi Haruo, Kosuzume Hiroshi, Suzuki Yasuo et Mochida Ei.

⑦③ Titulaire :

⑦④ Mandataire : Cabinet Lavoix,
2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

L'invention concerne une enzyme leucocytaire humaine, de type pepsique, un procédé pour la préparation de l'enzyme et un agent thérapeutique pour les troubles allergiques, les maladies avec immun-complexe et les tumeurs, ledit agent contenant l'enzyme en tant qu'ingrédient actif.

Les troubles allergiques sont dûs à une réaction allergique qui, par suite d'une réaction antigène-anticorps, produit une pathogénèse dans un organisme vivant. Le mécanisme de la pathogénèse des troubles allergiques serait le suivant. Lorsqu'il est exposé à un antigène pathogène, un organisme vivant produit des anticorps. La seconde attaque du même antigène entraîne une réaction antigène-anticorps qui se traduit par une libération de médiateurs chimiques à partir des cellules. Ces médiateurs endommagent les tissus et/ou les complexes antigène-anticorps formés se déposent sur les tissus, produisant des troubles allergiques ou des troubles auto-immuns. Parmi les divers antigènes pathogènes, on citera les antigènes xénogènes, tels que l'allergène inhalé, l'allergène alimentaire, des médicaments et l'allergène de contact, et les antigènes allogènes ou autologues qui proviennent de constituants autologues des tissus ou organes dénaturés pour une raison quelconque, et se comportant donc en substances étrangères.

Les troubles dits allergiques dûs à des antigènes xénogène, tels que l'asthme bronchique, l'allergie alimentaire ou l'urticaire, sont classés en quatre types selon leurs symptômes ou leurs causes. C'est-à-dire qu'ils sont classés en allergies de Type I (type anaphylactique), provenant d'anticorps se déposant sur les tissus et caractérisées par une augmentation de la perméabilité capillaire et une contraction des muscles lisses, les allergies de Type II (type cytotoxique) provenant de la présence de compléments et caractérisées par un endommagement des cellules, les allergies de Type III (type Arthus) résultant du dépôt de complexes antigène-anticorps sur les parois vasculaires et d'une participation ultérieure des compléments et des leucocytes polymorphonucléaires, et caractérisées

par des réactions inflammatoires, et enfin en allergies de type IV résultant d'une immunité à médiation cellulaire et caractérisées par l'apparition d'une hypersensibilité retardée telle que la réaction à la Tuberculine. Parmi les réactions allergiques, les allergies de type I, III et IV participent, par exemple, à l'asthme bronchique et chacune de ces réactions est considérée individuellement ou ensemble comme provoquant l'attaque asthmatique. Le mécanisme pathogène de ces troubles allergiques peut être considéré agir comme suit.

Un antigène qui envahit un organisme vivant, est traité par des macrophages et l'information immunologique sur l'antigène est transmise au système cellule T - cellule B. Les cellules B qui ont reçu l'information produisent de l'immunoglobuline (l'anticorps de type IgE est surtout produit dans les allergies de type I et l'anticorps de type IgG est surtout produit dans les allergies de type II et de type III) et l'anticorps de type IgE se fixe sur les basophiles dans le système circulatoire ou sur les mastocytes dans les tissus, établissant ainsi l'état de sensibilisation. Les mêmes antigènes qui envahissent l'organisme sensibilisé se fixent sur les anticorps fixés sur les cellules, leur permettant de libérer des médiateurs chimiques tels que l'histamine et des substances à réaction lente de l'anaphylaxie (SRS-A). Les médiateurs chimiques libérés induisent des symptômes allergiques tels que des érythèmes, des oedèmes ou une augmentation de la sécrétion glandulaire due à une contraction des muscles lisses ou une augmentation de la perméabilité capillaire. D'autre part, l'anticorps de type IgG se fixe sur les leucocytes polymorphonucléaires pour produire une sensibilisation et on suppose qu'il y a également une sécrétion ultérieure de SRS-A comme médiateur chimique.

Les agents anti-allergiques peuvent avoir un but thérapeutique en supprimant un stade quelconque dans ces processus.

On utilise de manière classique des dérivés de xanthine, des stimulants β -adrénergiques (β -stimulants) ou des cortico-

stéroïdes dans le traitement de l'asthme. Cependant, ces médicaments montrent souvent des réactions contraires indésirables. Par exemple, on a observé des palpitations, une tachycardie, etc. associées à l'utilisation de dérivés de xanthine et de β -stimulants. De plus, les corticostéroïdes peuvent provoquer des réactions néfastes telles que les ulcères peptiques et des complications d'infection bactérienne. En outre, les agents anti-histaminiques peuvent engendrer des difficultés d'expectoration des sécrétions de la trachée, plutôt que de se montrer efficaces contre une attaque d'asthme, de sorte qu'ils aggravent parfois l'état clinique de l'asthme.

Les maladies avec immun-complexe ou les troubles auto-immuns dans lesquels l'anticorps pathogène est un auto-antigène, par exemple dans le rhumatisme articulaire, le lupus érythémateux systémique (SLE) et le lupus néphritique, comme impliqué dans les appellations, sont des troubles résultant de complexes d'antigènes et d'anticorps, c'est-à-dire des immun-complexes. Bien que le mécanisme pathogénétique des maladies avec immun-complexe soit compliqué et qu'il n'ait pas encore été expliqué sous bien des aspects, on suppose généralement qu'il est le suivant. Lorsque les tissus sont endommagés par des infections bactériennes ou virales, il y a production d'anticorps opposés aux auto-antigènes fraîchement produits ou aux cellules infectées par un virus et ces anticorps réagissent avec les antigènes correspondants en formant des immun-complexes. Etant donné que ces immun-complexes activent le système du complément et les plaquettes, des substances vaso-actives telles que l'histamine et la sérotonine sont libérées et la perméabilité des vaisseaux sanguins augmente. Les immun-complexes en circulation pénètrent dans les parois vasculaires dont la perméabilité est accrue et se déposent le long des membranes sous-endothéliales. Les leucocytes polymorphonucléaires se rassemblent sur les sites de dépôt des immun-complexes sous l'action des facteurs chimiotactiques leucocytaires produits par l'action du complément sur les immun-complexes déposés. Les

leucocytes polymorphocucloaires réagissent avec les immun-complexes, libèrent diverses substances endommageant les tissus, telles que les cathepsines D et E, la collagénase, l'élastase et des facteurs de perméabilité, et ces substances endommagent éventuellement le tissu. Le taux du complément dans le sérum d'un malade atteint d'une maladie avec immun-complexe telle que le SLE est généralement faible et une aggravation des conditions de la maladie est étroitement associée à la diminution du taux du complément. Cette diminution du taux du complément serait due à une consommation importante du complément sur le site de la réaction entre les antigènes et les anticorps, se trouvant notamment dans les reins et les vaisseaux sanguins. De plus, on considère que les immun-complexes sont également en rapport avec les systèmes de coagulation sanguine et on pense qu'ils conduisent à des états plus sérieux par divers mécanismes tels que l'accélération du dépôt de fibrinoïdes sur les tissus endommagés.

Pour le traitement des maladies avec immun-complexe, on utilise actuellement des agents anti-inflammatoires et des agents immunosuppresseurs comprenant des stéroïdes pour supprimer le système immunitaire hypersensibilisé et réduire les inflammations locales et la douleur, ou des anticoagulants et des agents anti-plaquettes pour améliorer les anomalies du système de coagulation-fibrinolyse dans les vaisseaux sanguins. Cependant, comme ces médicaments se montrent peu actifs et sont associés à de fortes réactions néfastes, on a activement cherché à développer des médicaments qui soient sûrs et très efficaces dans le traitement des maladies.

De plus, de nombreux médicaments ont été développés pour le traitement des tumeurs malignes. Les médicaments anti-tumeurs sont classés de manière grossière en les deux types ci-dessous. Le premier type comprend des "cytotoxines" qui suppriment directement le développement de la tumeur. Le second type comprend des médicaments qui agissent indirectement sur le développement des tumeurs en les reconnaissant comme des

substances étrangères par l'activation des fonctions immunologiquement protectrices de l'hôte. Cependant, les médicaments appartenant au premier type n'exercent pas une toxicité sélective suffisante vis-à-vis des cellules tumorales et se montrent également toxiques vis-à-vis des cellules normales de l'hôte. En conséquence, leur posologie totale est considérablement limitée. D'autre part, le dernier type, c'est-à-dire les immunopotentialisateurs, montre des réactions néfastes moins fréquentes que le premier, de sorte qu'ils sont généralement utilisés de manière sûre. Toutefois, ils posent un problème essentiel, car étant donné qu'une tumeur par elle-même provient de cellules normales d'un patient et peut ne pas être suffisamment reconnue comme substance étrangère par les fonctions immunologiques protectrices, certains immunopotentialisateurs ne montrent pas un effet anti-tumeur suffisant.

L'invention a pour but de fournir une enzyme leucocytaire humaine de type pepsique ayant une activité contre les troubles allergiques, contre les maladies avec immun-complexe et contre les tumeurs.

L'invention a encore pour but de fournir des procédés pour la production d'une enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

L'invention a également pour but de fournir un agent thérapeutique pour les troubles allergiques, les maladies avec immun-complexe et les tumeurs, qui contient une enzyme leucocytaire humaine de type pepsique comme ingrédient actif.

Aux dessins annexés donnés uniquement à titre d'exemples:

- la Fig. 1 est un diagramme illustrant les résultats de l'exemple expérimental 1.

- la Fig. 2 et la Fig. 3 sont des diagrammes illustrant les résultats de l'exemple expérimental 3.

- la Fig. 4 est un diagramme illustrant les résultats de la mesure de la protéine urinaire dans l'exemple expérimental 4 où on a déterminé la teneur en protéine urinaire d'après la coloration du papier d'essai et on l'a exprimée en termes de

moyenne des indices d'un groupe. Ce système d'indice comporte les nombres 0, 1, 2, 3 et 4 correspondant respectivement aux colorations (-), (+), (++) , (+++) , et (++++).

5 A la suite d'une recherche intense et prolongée pour
mettre au point un agent thérapeutique plus efficace contre
les troubles allergiques, les maladies avec immun-complexes
et les tumeurs, la Demanderesse a trouvé qu'une enzyme de type
pepsique présente dans les leucocytes humains (appelés ci-après
enzyme leucocytaire humaine de type pepsique) exerce un effet
10 anti-allergique prononcé et un remarquable effet supprimeur
vis-à-vis des diverses maladies avec immun-complexes, et en même
temps montre un excellent effet anti-tumeur. L'invention a
été trouvée dans le cadre des données ci-dessus.

L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique existe
15 non seulement dans les leucocytes humains, mais également dans
des cellules telles que les promyélocytes leucémiques, de sou-
che HL-60, traitées avec une substance destinée à induire une
différenciation telle que l'actinomycine D, et peut être obte-
nue à partir du liquide surnageant résultant d'un homogénéisat
20 de ces cellules par une combinaison appropriée de procédés
usuels utilisés dans la purification des protéines, par exemple
le fractionnement par un sel, la chromatographie d'adsorption
sur un adsorbant inorganique, la chromatographie d'échange
d'ion sur une résine échangeuse d'ions et la chromatographie
25 sur gel avec un effet de tamis moléculaire. De plus, l'enzyme
peut être obtenue en grandes quantités à partir de cultures
de cellules préparées en réunissant des cellules tumorales
avec des cellules produisant une enzyme de type pepsique, tel-
les que des leucocytes humaine ou en appliquant une technique
30 de génie génétique, par exemple en préparant un ADM complémen-
taire à l'aide de la reverse transcriptase en utilisant comme
copie l'ARN messager pour l'enzyme leucocytaire humaine de ty-
pe pepsique, puis en intégrant cet ADN dans E.coli pour produi-
re l'enzyme.

35 On décrira maintenant à l'aide d'exemples expérimentaux

l'action pharmacologique et la toxicité de cette enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

Exemple expérimental 1

5 Effet supprimeur sur la production d'anticorps de type IgE anti-ovalbumine

On utilise des groupes de 10 rats mâles Wistar pesant chacun de 180 à 200 g. Par voie intra-péritonéale, on injecte 0,1 mg d'ovalbumine avec 20 mg d'un gel d'hydroxyde d'aluminium. A partir du lendemain, par voie intraveineuse, on injecte l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, une fois par jour pendant 14 jours. Les 7ème, 10ème et 14ème jours après l'administration d'ovalbumine, on prélève des échantillons de sang et on détermine le taux d'anticorps de type IgE anti-ovalbumine dans le sérum par la réaction PCA homologue chez un rat (anaphylaxie active cutanée) (H. Maruyama et al., Folia Pharmacologica Japonica 74, 179, 1978). Les résultats sont rapportés sur la figure 1.

La production d'anticorps de type IgE anti-ovalbumine est supprimée de manière significative par l'administration de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

Exemple expérimental 2

Effet supprimeur sur l'asthme bronchique

On utilise des groupes de 10 rats mâles Wistar pesant chacun de 180 à 200 g. Par voie intra-péritonéale, on injecte 0,1 mg d'ovalbumine avec 20 mg d'un gel d'hydroxyde d'aluminium et, à partir du lendemain, par voie intraveineuse on injecte l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique une fois par jour pendant 14 jours. Après ces 14 jours, on administre par voie intraveineuse 25 mg/kg d'ovalbumine pour induire un asthme bronchique et on mesure la contraction de la trachée selon la méthode de Konzett et Rössler (Arch. Exptl. Path. Pharmacol. 195, 71, (1940). On calcule le taux de contraction relatif de la trachée de chaque groupe en évaluant à 100 la contraction du groupe témoin. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 1.

Tableau 1

	<u>Dose</u>	<u>Taux de contraction de la trachée (%)</u>
	Témoin	100
5	Enzyme leucocytaire humaine de type pepsique	
	0,05 mg/kg	73
	0,5 mg/kg	49
	5 mg/kg	23

10 La contraction de la trachée est supprimée de manière significative par l'administration de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

Exemple expérimental 3

Effet supprimeur sur la néphrite de Masugi

15 Selon la méthode de Suzuki et al (Folia Pharmacologica Japonica 68, 572, 1972), par voie intraveineuse on administre un sérum de rein de lapin anti-rat à des groupes de 10 rats mâles Wistar, à une dose de 5 ml/kg pour induire une néphrite. Lorsque la néphrite s'est déclarée, on prélève régulièrement
20 des échantillons de sang et d'urine pour mesurer les taux d'immun-complexe sérique et de protéine urinaire. Par voie intraveineuse, on injecte l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique une fois par jour après l'administration de l'anti-corps de rein anti-rat et de la même manière on administre au
25 groupe témoin une enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, inactivée. Les résultats sont rapportés sur les figures 2 et 3.

Dans les groupes traités avec l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, on observe une diminution des taux de protéine urinaire et d'immun-complexe sanguin.

30 Exemple expérimental 4

Effet supprimeur sur les troubles rénaux spontanés

La détermination est faite selon la méthode de Abe et al (The Ryumachi 14, 43, 1974).

35 A des groupes de 16 souris femelles de 16 semaines (NZB x NZW) F₁, on injecte par voie intraveineuse l'enzyme leu-

cocytaire humaine de type pepsique à une dose de 10 mg/kg, une fois par jour. On administre de même une enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, inactivée, par voie intraveineuse à un groupe témoin. Toutes les 4 semaines, on détermine la protéine urinaire des souris au moyen d'un papier d'essai du commerce (Combisticks). Les résultats sont rapportés sur la figure 4. De plus, on sacrifie 6 souris de chaque groupe à l'âge de 32 semaines et on observe l'infiltration cellulaire dans les glomérules rénaux. Les autres 10 souris de chaque groupe continuent à recevoir chaque jour la même dose et on détermine le taux de survie à 50 semaines. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 2.

On observe que grâce à l'administration de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, l'augmentation de la protéine urinaire est supprimée de manière significative, l'infiltration cellulaire après 32 semaines est légère et le taux de survie à 50 semaines est plus élevé dans les groupes traités avec l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique. Ces résultats indiquent que les troubles spontanés du rein chez les souris sont supprimés par l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

Tableau 2

	<u>Groupe témoin</u>	<u>Groupe traité avec l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique</u>
25 Infiltration cellulaire	Forte infiltration dans les microlymphocytes et les plasmocytes	Légère infiltration autour des parois vasculaires
30 Taux de survie	20 %	80%*

* $p < 0,05$

Exemple expérimental 5

Effet supprimeur sur la thyroïdite

35 On effectue cette expérience selon la méthode de Kotani et al. (Clinical Immunology 9, (8), 635 (1977)). On soumet cha-

que groupe de 10 rats mâles BUF/HDK (âgés de 6 semaines) à une thymectomie et on les expose ensuite à des irradiations aux rayons X de 200 rads chacune, répétées 4 fois toutes les 2 semaines. 14 semaines après la thymectomie, on sacrifie les rats pour une exsanguination. On isole les glandes thyroïdes et on les enrobe dans un bloc de paraffine, puis on colore avec de l'hématoxyline-éosine ou de l'azan. On évalue la sévérité de la thyroïdite avec une note de 0 à 4 en fonction de l'infiltration des cellules mononucléaires, de la destruction du réticulum endoplasmique et de la fibrose glandulaire. Par voie intraveineuse on a administré aux animaux de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique une fois par jour et on a administré de même au groupe témoin de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, inactivée. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 3.

Par rapport au groupe témoin, dans les groupes traités avec l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique l'apparition et la sévérité de la thyroïdite diminuent en fonction de la dose.

20

Tableau 3

	<u>Présence (%)</u>	<u>Sévérité</u>
Témoin	90	3,5 ± 0,4
Enzyme leucocytaire humaine de type pepsique		
25 1 mg/kg	80	3,0 ± 0,5
3 mg/kg	60	1,9 ± 0,2*
10 mg/kg	40*	1,3 ± 0,1**

* p < 0,05 ** p < 0,01

Exemple expérimental 630 Hydrolyse d'un immun-complexe humain

On recueille du sérum de malades atteints de rhumatisme articulaire, de lupus érythémateux systémique et d'hépatite, lesquels maladies s'avèrent avoir un immun-complexe dans leur sérum. A 1 ml de sérum, on ajoute l'enzyme leucocytaire humaine

de type pepsique en une quantité de 10, 30 ou 100 µg et on incube le sérum à 37 °C pendant 60 minutes. Après la réaction, on détermine la quantité d'immun-complexe dans le sérum par la réaction hémolytique d'érythrocytes de mouton en présence de complément de cobaye selon la méthode de Fust et al. (Athérosclérosis 29, 181, 1978), en utilisant de l'IgG humaine en agrégats comme substance de référence. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 4.

Tableau 4

10	Maladies	Sérum n°	Quantité d'enzyme leucocytaire hu- maine de type pep- sique ajoutés (µg/ml)	Taux d'im- mun-com- plexe (µg/ml)
15	Rhumatisme articulaire	1	0	78
			10	65
			30	53
			100	below 50
		2	0	234
20			10	180
			30	150
			100	123
	Lupus érythémateux systémique (SLE)	1	0	420
			10	352
25			30	211
			100	124
		2	0	125
			10	70
			30	56
30			100	below 50

Tableau 4 (suite)

5	Hépatite	1	0	65
			10	58
			30	below 50
			100	below 50
5	Hépatite	2	0	70
			10	66
			30	55
			100	51

10 L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique réduit la quantité d'immun-complexe dans le sérum des malades atteints de rhumatisme chronique, de lupus érythémateux systémique et d'hépatite, en fonction de la dose.

Exemple expérimental 7

15 Effet sur le développement de cellules MX-1 de cancer du sein humain, et de cellules leucémiques L1210 de la souris, cultivées.

Dans un milieu d'Eagle contenant 10 % de sérum de veau et les substances d'essai, on met respectivement en suspension
 20 des cellules MX-1 de cancer du sein humain et des cellules leucémiques L1210 de la souris, à une concentration cellulaire de 10^5 /ml. On cultive les cellules à 37 °C sous 5 % de CO₂ pendant 48 heures. Puis on compte le nombre de cellules viables après coloration avec du Bleu Tripan. On calcule le taux
 25 d'inhibition du développement selon l'équation suivante, les résultats sont rapportés dans le Tableau 5.

$$\text{Taux d'inhibition du développement} = \left(1 - \frac{\text{Nombre de cellules viables dans le groupe traité}}{\text{Nombre de cellules viables dans le groupe témoin}} \right) \times 100$$

Tableau 5

	Concentration ajoutée (µg/ml)	Taux d'inhibition du développement (%)	
		MX-1	Li210
5 Enzyme leucocytaire humaine de type pepsique	30	16	7
	100	32	22
	300	55	29
Mitomycine C	100	48	61

L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique inhibe le développement des cellules cancéreuses même à une faible concentration.

Exemple expérimental 8

Effet sur des souris porteuses de cellules leucémiques P388

On transplante 10^5 cellules leucémiques P388 par voie intrapéritonéale à un groupe de 5 souris mâles BDF₁. On injecte l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique aux souris par voie intraveineuse, deux fois par jour en commençant le lendemain, jusqu'à la mort des animaux. On calcule la durée de vie moyenne et on l'exprime en pourcentage du témoin. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 6.

$$\text{Durée de vie moyenne (\%)} = \frac{\text{Nombre moyen de jours de survie du groupe traité}}{\text{Nombre moyen de jours de survie du groupe témoin}} \times 100$$

Tableau 6

	Dose (mg/kg)	Durée de vie moyenne (%)
25 Témoin		100 ± 5
Enzyme leucocytaire humaine de type pepsique	0,3	109 ± 5
	1,0	120 ± 5
	3,0	124 ± 8*
30 Mitomycine C	0,5	135 ± 16

* p < 0,05

L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique augmente nettement la durée de vie moyenne.

Exemple expérimental 9

Effet sur le cancer du sein humain, MX-1, transplanté chez
5 une souris dénudée.

Des fragments de 2 mm² de cancer du sein humain MX-1 qui
ont été sous-cultivés sur des souris dénudées (BALB/C, nu/nu),
sont transplantés par voie souscutanée sur le dos d'animaux
dans des groupes de 5 souris dénudées de la même souche. Deux
10 semaines plus tard, on administre l'enzyme leucocytaire humaine
de type pepsique par voie intraveineuse deux fois par jour
pendant 18 jours. 18 jours après la première administration
de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique, on isole
les tumeurs et on pèse. Les résultats sont montrés dans le Ta-
15 bleau 7.

Tableau 7

	<u>Dose (mg/kg)</u>	<u>Poids de la tumeur (g)</u>
Témoin		1,34 ± 0,10
Enzyme leucocytaire		
20 humaine de type pepsique	0,3	0,76 ± 0,12*
	3,0	0,66 ± 0,13*

*p < 0,05

L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique montre un effet anti-tumeur significatif même à la plus faible dose.

Exemple expérimental 10

25 Toxicité aiguë

A des groupes de 10 souris ddY pesant 20 ± 1 g, on administre par voie intraveineuse ou intrapéritonéale 2 g/kg de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique dissoute dans une solution saline physiologique. Puis, on met les souris en
30 observation journalière pour réceler tout symptôme de toxicité pendant une semaine. Pendant cette période, on n'observe aucun signe de toxicité;

Tel que décrit dans les exemples expérimentaux, l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique qui est un ingrédient actif de l'agent pharmaceutique de l'invention supprime nettement la production d'anticorps de type IgE et montre un effet thérapeutique évident contre l'asthme expérimental. De plus, l'enzyme supprime clairement l'établissement et le développement de plusieurs maladies qu'on pense être induites par des immun-complexes, par exemple la thyroïdite et la néphrite. Et également, cette enzyme leucocytaire humaine de type pepsique montre un effet anti-tumeur prononcé.

D'après les résultats de l'étude de la toxicité aiguë, la dose requise pour obtenir ces effets est dans une gamme de sécurité suffisante. On pense qu'étant donné que cette enzyme leucocytaire humaine de type pepsique est une protéine d'origine humaine, elle a peu de risque d'induire des réactions néfastes sérieuses dues à une antigénicité, telles qu'un choc anaphylactique. Elle peut donc fournir un agent thérapeutique très utile contre divers troubles allergiques comprenant l'asthme bronchique, l'urticaire, le rhume des foins, la dermatite de contact, l'allergie alimentaire, l'allergie aux médicaments, la rhinite allergique, la pneumonite par hypersensibilité, différentes maladies avec immun-complexe telles que le lupus érythémateux systémique, le glomérulonéphrite avec immun-complexe, la périartérite noueuse, le rhumatisme articulaire, l'hépatite avec immun-complexe, la thyroïdite, la maladie du sérum, la myasthénie grave et différentes tumeurs telles que le cancer de l'estomac, le cancer du poumon, le cancer du foie, le cancer du colon, le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer de l'utérus, le cancer de la vessie, la leucémie, le cancer de l'oesophage, le lymphome.

L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique peut être préparée comme suit. On fait passer le produit surnageant d'un homogénéisat de leucocytes humains sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée avec une solution de tampon à l'acétate 0,1 M (pH de 5,3) pour adsorber l'enzyme. On élue l'enzyme avec

la même solution tampon contenant 0,5 M de chlorure de sodium. On peut concentrer l'éluat et le purifier ensuite par chromatographie sur gel sur une colonne de Sephadex G-100 gonflé avec une solution saline physiologique à 0,9 %. L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique s'avère avoir une masse moléculaire de 35 000 à 41 000 par chromatographie sur gel sur Sephadex G-100 ; un point isoélectrique dans la gamme de pH de 2,5 à 3,5 par concentration isoélectrique sur Ampholine ; une adsorption maximale à 278 nm ; elle montre en outre une réaction positive à la ninhydrine et est facilement soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther et le chloroforme. De plus, l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique montre une forte activité hydrolytique vis-à-vis de l'hémoglobine dans une gamme acide de pH inférieur à 7,0 et son pH optimal est compris entre 2,0 et 3,5.

L'agent de l'invention est généralement préparé sous la forme d'une solution injectable et est injecté par voie intraveineuse, souscutanée, intramusculaire ou intra-articulaire ou sur le site local d'une tumeur elle-même. Mais il peut également être utilisé sous la forme d'un agent oral, d'un agent à inhaler ou d'un suppositoire rectal. La dose journalière de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique est de 1 à 1 000 mg, de préférence de 50 à 500 mg, mais elle peut être augmentée ou diminuée de manière appropriée, selon l'âge, les symptômes et le mode d'application.

L'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique peut être formulée en un agent pharmacologique par un procédé classique avec tout véhicule ou excipient pharmaceutique classique.

Des préparations pour injection peuvent inclure des préparations lyophilisées qui sont dissoutes au moment de l'administration et des préparations liquides ; on préfère également des préparations à libération commandée pour maintenir une concentration efficace prolongée.

Les préparations orales peuvent se présenter sous la forme de gélules de comprimés, de granules, de poudres ou de pré-

parations orales liquides ; elles sont de préférence sous la forme de corps d'inclusion de liposomes dans le but de promouvoir l'absorption.

Les agents à inhaler sont de préférence sous la forme de préparations lyophilisées ; pour une administration rectale, on préfère la forme de suppositoires.

L'invention est illustrée par les exemples suivants.

Exemple 1

On met des cellules leucémiques HL-60 (10^{11} cellules) préalablement traitées avec de l'Actinomycine D en suspension dans un litre de solution saline physiologique à 0,9 % et on les détruit dans un homogénéiseur. On concentre le liquide surnageant obtenu par centrifugation (10 000 tours/minute, 30 minutes) et on dessale en utilisant un ultra-concentrateur (Millipore, Diaflow Modèle 202). On verse la solution concentrée sur une colonne de DEAE-cellulose (10 x 50 cm) équilibrée avec une solution de tampon de phosphate 0,01 M (de pH 7,0). On lave la colonne avec 4 litres de la même solution tampon contenant 0,1 M de NaCl et on élue une fraction active avec la même solution tampon contenant 0,4 M de NaCl. Puis on verse la fraction active sur une colonne de Sephadex G-100 (10 x 90 cm) équilibrée avec une solution saline physiologique à 0,9 %, apyrogène, et on soumet à une filtration sur gel pour obtenir 50 mg de l'enzyme de type pepsique. L'activité spécifique de l'enzyme de type pepsique est de 1930 U/mg, mesurée selon la méthode d'Anson (J. Gen. Physiol. 22, 79, 1938) en utilisant de la pepsine de Swine comme substance de référence et de l'hémoglobine dénaturée comme substrat.

Exemple 2

On met des leucocytes humains (10^{10} cellules en suspension dans une solution 20mM de tampon Tris-HCl (de pH 7,4) contenant 1 % de Triton X-100, 10 mM d'un complexe de vanadyle, 3 mM d'acétate de magnésium, 10 mM de NaCl et 5 % de saccharose et on détruit les cellules dans un homogénéiseur en Teflon. On recueille la fraction polysomale par centrifugation

de l'homogénéisat et on extrait le m-ARN avec du phénol à partir de la fraction polysomale, avant de précipiter avec de l'éthanol. A ce précipité, on ajoute une solution 0,2 M de tampon Tris-HCl (de pH 9,0) contenant 0,5 % de SDS, 0,01 M d'EDTA et 50 mM de NaCl et on incube le mélange à 70 °C pendant 3 minutes. On adsorbe cette solution de m-ARN sur une colonne d'oligo(dT) cellulose. On lave la colonne et on élue avec une solution 10 mM de tampon Tris-HCl (de pH 7,4) contenant 0,5 % de SDS et 1 mM d'EDTA pour obtenir une fraction de m-ARN contenant le Poly A. On fractionne ensuite cet m-ARN par un gradient de densité de saccharose à une concentration de 5 à 25 %. On analyse les fractions quant à l'activité en m-ARN correspondant à l'enzyme de type pepsique dans le système de synthèse de la protéine des ovocytes de *Xenopus*, et on obtient une fraction active. On ajoute 5 µg du m-ARN de l'enzyme de type pepsique ainsi préparé à 100 µl d'une solution 40 mM de tampon Tris-HCl (pH de 7,5) contenant 1 µg d'oligo (DT)₁₀, 5 mM de mercapto-éthanol, 0,5 mM de désoxy-adénine triphosphate (dATP), désoxy-thymine triphosphate (dTTP), désoxy-guanidine triphosphate (dGTP) et désoxy-cytosine triphosphate (dCTP) et 10 unités de reverse transcriptase (AMV-RT) et on incube à 42 °C pendant 90 minutes. Lorsque l'incubation est terminée, on sépare l'ARN par déprotéination et un traitement alcalin pour obtenir l'ADN complémentaire. On incube alors cet ADN dans le même milieu que celui utilisé dans la préparation de l'ADN complémentaire ci-dessus (à condition qu'il n'y ait pas d'oligo (dT)₁₀) pour obtenir un ADN complémentaire bicaténaire. Après un traitement avec 0,25 unité de nucléase SI, on ajoute l'ADN complémentaire bicaténaire à 30 µl d'une solution d'acide cacodylique 140 mM (de pH 7,6) contenant 5 unités de terminal transférase, 1 mM de dATP, 0,1 mM de dithiothréitol, 30 mM de trihydroxylamine et 1 mM de chlorure de cobalt et on incube à 37 °C pendant 15 minutes pour effectuer l'addition des chaînes de désoxyadénine.

D'autre part, on traite 3 µg d'ADN plasmique pBR 322 de E.coli avec 0,25 unité de EcoRI à 37 °C pendant 20 heures et on incube ensuite avec 17,5 unités d'une exonucléase à 0 °C pendant 90 minutes. Lorsque l'incubation est terminée, on obtient un ADN plasmique à chaîne de désoxythymidine de la même manière que dans la préparation de l'ADN à chaîne de désoxyadénine (à condition d'utiliser du dTTP au lieu de dATP).

l'ADN plasmique à chaîne de désoxythymidine ainsi produit et l'ADN à chaîne de désoxyadénine ci-dessus sont associés par traitement à 65 °C pendant 2 minutes, à 46 °C pendant 120 minutes, à 37 °C pendant 60 minutes et à 23 °C pendant 60 minutes dans une solution tampon 50 mM de Tris-HCl (de pH 7,5) contenant 5 mM d'EDTA et 0,1 M de NaCl.

Puis on transforme E. coli NIHJ C-2 en utilisant l'ADN plasmique recombiné et on clone à partir d'une souche 5 000 résistant à l'ampicilline. On introduit l'ADN cloné dans E. coli en reliant au site promoteur du tryptophane opéron selon la méthode de Goeddel et al (Nature, 287, 411, 1980). Dans un milieu LB contenant 20 mg/l d'ampicilline, on cultive une souche (E-931) qui montre une production de l'enzyme de type pepsique à des concentrations élevées. A partir du liquide surnageant résultant de l'homogénéisation de 17 kg de cellules cultivées, on obtient 3,5 g de l'enzyme de type pepsique de la même manière que dans l'exemple 1.

25 Exemple 3

On dissout 1 gramme d'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique dans 100 ml de solution saline physiologique et on filtre dans des conditions aseptiques sur un filtre à membrane. On place des portions d'un ml de filtrat dans des récipients en verre stérilisés et on scelle après lyophilisation pour obtenir des préparations en poudre lyophilisées.

Exemple 4

On pèse 1 gramme de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsine, 7 g de lactose et 3 g de stéarate de magnésium et on mélange uniformément. Puis, on incorpore des portions de 200 mg

de ce mélange dans des gélules de gélatine n°2 et on applique un revêtement entérique pour obtenir des gélules entériques.

Exemple 5

On mélange de la lécithine de jaune d'oeuf, du cholestérol et du phosphate de diacétyle dans un rapport molaire de 7:2:1 et on dissout 100 mg du mélange dans 12,5 ml de chloroforme. A partir de cette solution, on forme un mince film sur la paroi d'une fiole. On prépare une dispersion en mélangeant ce film avec 25 ml de solution de tampon de phosphate contenant 100 mg de l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsine. Après un traitement aux ultrasons, on centrifuge la dispersion à 110 000 g. On met le précipité résultant en suspension dans 3 ml d'une solution saline physiologique et on stérilise pour obtenir une préparation pour liposome contenant l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

RE V E N D I C A T I O N S

1 - Enzyme leucocytaire humaine de type pepsique ayant les propriétés suivantes :

- 5 a) une masse moléculaire de 35 000 à 41 000,
- b) un point iosélectrique de pH 2,5 à 3,5,
- c) une absorption maximale à 278 nm,
- d) une réaction positive à la ninhydrine,
- e) elle est facilement soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther et le chloroforme,
- 10 f) un aspect pulvérulent blanc, et
- g) une activité anti-allergique, contre les maladies avec immun-complexe et contre les tumeurs, sous une forme pratiquement purifiée.

2 - Procédé de préparation d'une enzyme de type pepsique à partir de leucocyte humain.

3 - Procédé de préparation d'une enzyme de type pepsique par un procédé génétique.

4 - Composition thérapeutique pour le traitement des troubles allergiques, des maladies avec immun-complexe et des tumeurs, caractérisée en ce qu'elle comprend une enzyme leucocytaire humaine de type pepsique sous une forme pratiquement purifiée, en tant qu'ingrédient actif.

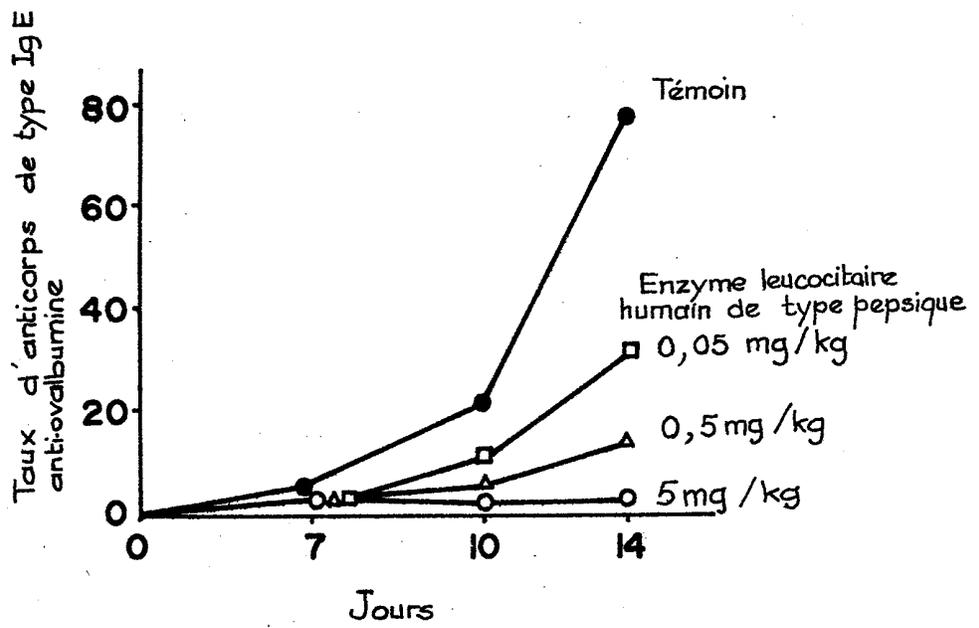
5 - Composition thérapeutique selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique a les propriétés suivantes :

- 30 a) une masse moléculaire de 35 000 à 41 000,
- b) un point isoélectrique de pH 2,5 à 3,5,
- c) une absorption maximale à 278 nm,
- d) une réaction positive à la ninhydrine,
- e) elle est facilement soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther et le chloroforme,
- f) un aspect pulvérulent blanc, et
- g) une activité anti-allergique, contre les maladies, avec immun-complexe et contre les tumeurs.

6 - Composition thérapeutique selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'un ou de plusieurs excipients et/ou adjuvants avec l'enzyme leucocytaire humaine de type pepsique.

5 7 - Composition thérapeutique selon la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce que la composition est sous la forme d'une préparation pour injection, d'une préparation pour administration orale d'un suppositoire ou d'une préparation à inhaler.

FIG. 1



2/3

FIG. 2

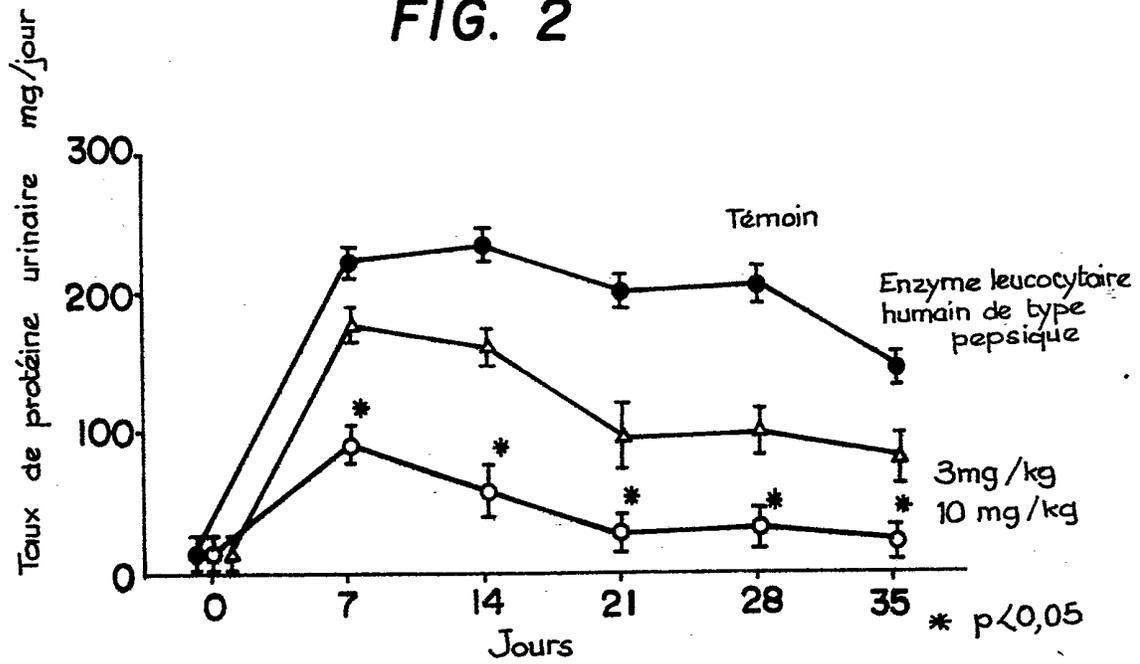


FIG. 3

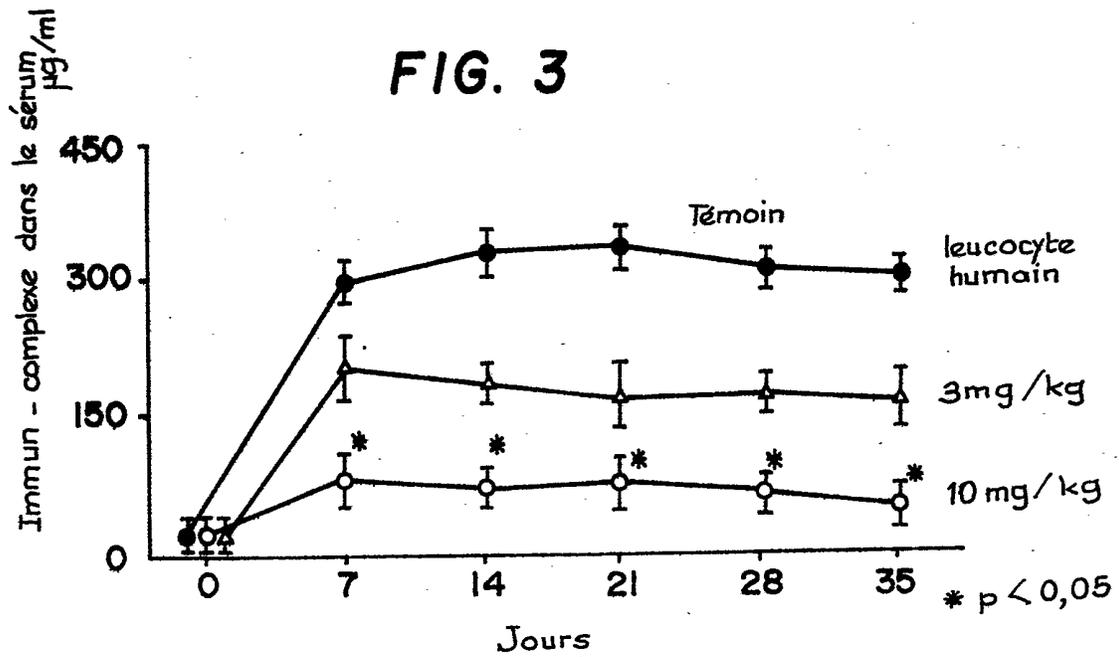


FIG. 4

