

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 83 03274

⑤4 Glycoprotéines à activité antitumorale, leur procédé de préparation de leur application thérapeutique.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl. ³). A 61 K 37/02; C 12 P 21/00.

⑫② Date de dépôt..... 28 février 1983.

⑫③ ⑫② ⑫① Priorité revendiquée : JP, 26 février 1982, n° 57-28992 et 57-28993; 24 mai 1982, n° 57-87674 et 57-87675 et le 23 juin 1982, n° 57-108046.

④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 35 du 2-9-1983.

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

⑦2 Invention de : Ohnishi Haruo, Yamaguchi Kazuo, Suzuki Yasuo, Mochida Ei et Mochida Nobuo.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

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

La présente invention est relative à de nouvelles glycoprotéines obtenues à partir d'un extrait ou liquide surnageant d'un milieu de culture de cellules réticulo-endothéliales, de lymphoblastes, de cellules leucémiques ou de fibroblastes d'animaux à sang chaud, à leur procédé de préparation ainsi qu'à des agents thérapeutiques pour tumeurs malignes qui contiennent, à titre de principe actif, une ou plusieurs de ces glycoprotéines.

On ne connaît pas de thérapeutique parfaite pour agir sur les tumeurs et malgré le fait que de nombreux agents thérapeutiques anti-tumoraux aient été mis au point à ce jour par un certain nombre de chercheurs dans le monde, de nombreuses tentatives ont été effectuées en clinique pour utiliser de nouveaux agents thérapeutiques et traitements à base d'associations de plusieurs agents.

Les agents thérapeutiques anti-tumoraux sont grossièrement classés en deux catégories: les agents chimiothérapeutiques et les agents immunothérapeutiques. Comme les agents chimiothérapeutiques, également connus comme substances cytotoxiques, manifestent leurs effets en supprimant non spécifiquement le développement cellulaire et, de ce fait, sont toxiques non seulement pour les cellules tumorales mais également pour les cellules normales, et provoquent de graves réactions nuisibles comme la leucopénie, la stérilité féminine, l'alopécie, le tératisme, les néoplasmes malins, etc.. il s'ensuit que la posologie est strictement limitée. D'autre part, comme les agents immunothérapeutiques manifestent leur effet thérapeutique en inhibant indirectement la croissance des tumeurs en agissant sur les fonctions biophylactiques et non en inhibant directement la croissance des cellules tumorales, ils présentent, par comparaison avec les agents chimiothérapeutiques, un bien moindre risque d'entraîner de graves réactions nuisibles. Toutefois, les malades présentant des tumeurs ne conservent souvent pas suffisamment de fonctions biophylactiques et, de ce fait, l'effet thérapeutique des agents immunothérapeutiques n'est pas toujours aussi satis-

faisant que celui des agents chimiothérapeutiques.

La Demanderesse a pensé que les cellules réticulo-endothéliales qui jouent un rôle important dans les fonctions biophylactiques produisent une substance efficace pour le traitement des tumeurs, et ont cherché cette substance.

Plusieurs facteurs considérés comme des agents thérapeutiques prometteurs pour les tumeurs, par exemple, la Lymphotoxine, le TNF (Tumor Necrosis Factor), l'Interféron, etc.. ont été obtenus à partir de cellules réticulo-endothéliales, comme rapporté par Granger, G.A. et al., Cellular Immunology, Vol. 38, 338-402 (1978), Carswell, E. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 72, 3666-33670 (1975), et Isaacs, A. et al., Proc. Roy. Soc. Ser. B., Vol. 147, 268 (1975), respectivement. En outre, la Demanderesse a récemment découvert un procédé simple pour isoler une quantité importante de "Carcino-Breaking Factor" (dit ci-après CBF) sous la forme d'un mélange contenant les agents précités: Lymphotoxine, TNF, etc., à partir d'une culture de lymphoblastes qu'on a fait croître chez des hamsters dont la réponse immune a été supprimée, et a rapporté que ce CBF est efficace sur les tumeurs expérimentales transplantées sur un animal (The Yomiuri, édition du matin, 22 Novembre 1981).

Au cours des recherches effectuées sur le CBF, la Demanderesse a découvert que des glycoprotéines qui diffèrent des facteurs cytotoxiques précités comme la Lymphotoxine, le TNF, le CBF, etc.. sont présentes dans un extrait ou liquide surnageant d'un milieu de culture de cellules réticulo-endothéliales, de lymphoblastes, de cellules leucémiques ou de fibroblastes d'animaux à sang chaud, et caractérisées par un effet cytotoxique très puissant et sélectif sur les cellules tumorales, et la Demanderesse a mis au point plusieurs modes opératoires permettant de produire ces glycoprotéines sans difficultés.

La présente invention a pour buts:

- de fournir de nouvelles glycoprotéines ayant une

activité antitumorale;

- de fournir des glycoprotéines ayant une activité anti-tumorale, qui sont récoltées à partir d'un extrait ou liquide surnageant d'un milieu de culture de cellules réticulo-endothéliales, de lymphoblastes, de cellules leucémiques ou de fibroblastes d'animaux à sang chaud;

- de fournir un procédé de préparation de glycoprotéines anti-tumorales, à partir d'un extrait ou liquide surnageant d'un milieu de culture de cellules réticulo-endothéliales, de lymphoblastes, de cellules leucémiques ou de fibroblastes d'animaux à sang chaud;

- de fournir des agents thérapeutiques pour tumeurs, qui contiennent, à titre de principe actif, une ou plusieurs de ces glycoprotéines anti-tumorales.

Il s'ensuit que l'invention est relative à une glycoprotéine ayant les propriétés suivantes:

a) masse moléculaire: de 7.000 à 90.000 par électrophorèse sur gel SDS ou filtration sur gel Sephadex;

b) réactions colorées: présente une couleur indiquant des protéines dans la réaction de Lowry; présente une couleur indiquant des liaisons peptide et des aminoacides dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et présente une couleur indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et dans la réaction tryptophane-acide sulfurique;

c) aspect et solubilité: poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et le tampon phosphate et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme;

d) la teneur en sucres est de 8 à 45%, teneur dans laquelle de 6 à 28% des sucres totaux sont des hexoses, de 1 à 11% sont des hexosamines et de 1 à 6% sont des acides sialiques;

e) stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus; et

f) elle endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

la Fig. 1 est un spectre IR de CB_X mesuré dans l'exemple 10 ;

la Fig. 2 est un spectre IR de CB_{X1} mesuré dans l'exemple 15 ;

5 la Fig. 3 est un spectre IR de CB_{X2} mesuré dans l'exemple 21 ;

la Fig. 4 est un spectre IR de CB_{X3} mesuré dans l'exemple 29.

Comme les glycoprotéines suivant l'invention peuvent
10 être divisées en quatre fractions présentant des différences de masse moléculaire et de teneur en sucre, ces glycoprotéines sont classées d'après la différence de masse moléculaire, dans toute la présente description; une fraction ayant une masse moléculaire de 12.000 à 17.000 est
15 dite Carcino-Breaker X (ci-après désignée CB_X), une fraction ayant une masse moléculaire de 70.000 à 90.000 est dite CB_{X1} , une fraction ayant une masse moléculaire de 40.000 à 50.000 est dite CB_{X2} et une fraction ayant une masse moléculaire de 7.000 à 9.000 est dite CB_{X3} . Lorsqu'on
20 considère l'ensemble des fractions CB_X , CB_{X1} , CB_{X2} et CB_{X3} on désigne l'ensemble d'une façon générale par "CB".

Les propriétés physiques, chimiques et biologiques des glycoprotéines suivant l'invention sont décrites ci-dessous de façon plus détaillée.

25 CB_X

a) Masse moléculaire: Lorsqu'elle est mesurée par filtration sur gel en utilisant Sephadex G-100 (Pharmacia Co.) et un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2) comme solvant, la masse moléculaire est de 12.000 à 17.000

30 b) Réactions colorées: Les résultats des tests effectués sur solution aqueuse de CB_X , pour les réactions colorées, sont indiqués au tableau 1-1. La réaction de Lowry et la réaction à la ninhydrine sont effectuées suivant les modes opératoires décrits dans Seikagaku Jikken Koza, Vol.
35 1, Quantitative Method of Proteins, 1971. La réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction naphthol-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide

sulfurique sont effectuées suivant les modes opératoires décrits dans Seikagaku Jikken Koza, Vol.4, Quantitative Method of Sugars, 1971. Et la réaction de Holff est effectuée suivant le mode opératoire décrit dans Seikagaku Jikken Kofza, Vol.3, Quantitative Method of Lipids, 1971.

TABLEAU 1-1

Réaction colorée	Coloration	Indication
Lowry	Bleu	Liaisons peptide
Ninhydrine	Bleu pourpre	Aminoacides
Phénol-acide sulfurique	Marron	Sucres
Anthrone-acide sulfurique	Bleu verdâtre	Sucres
α -Naphтол-acide sulfurique	Pourpre	Sucres
Indole-acide sulfurique	Marron	Sucres
Tryptophane-acide sulfurique	Marron pourpre	Sucres
Holff	Incolore	Pas de lipides

Comme le montre le tableau 1-1, CB_X présente des colorations indiquant des protéines et des sucres, mais ne présente pas de coloration indiquant des lipides.

c) Aspect et solubilité: Poudre blanche, soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme.

d) Teneur en sucre: Suivant le protocole opératoire de Spiro (Spiro, H.A., Methods in Enzymology, Vol. 8, 3-26 (1966)), la teneur en sucre de CB_X est de 27 à 33% se décomposant en 17 à 20% d'hexoses, de 5 à 7% d'hexosamines et 5 à 6% d'acides sialiques.

e) Point isoélectrique: Lorsqu'il est mesuré par électrofocalisation sur Ampholine, son point isoélectrique est de 4,2 à 7,3.

f) Adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2).

g) Stable du point de vue masse moléculaire par filtration sur gel et du point de vue activité cytotoxique sur cellules tumorales dans une solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et dans une solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus.

h) Il endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

On a mesuré la cytotoxicité de CB_X en cultivant 10^5 cellules tumorales ou normales dans 0,2 ml d'un milieu en présence de cette substance à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air, et en comptant le nombre de cellules viables non colorées par le Trypan Blue, la cytotoxicité étant exprimée par la concentration à laquelle l'augmentation du nombre des cellules est inhibée à 50%. Une unité CB est définie comme étant la quantité de la substance à laquelle la croissance de 10^5 cellules KB est inhibée de 50%.

i) Il induit une différenciation des cellules tumorales, c'est-à-dire qu'il permet d'obtenir le rapport de cellules tumorales à cellules normales dans un test effectué suivant le protocole opératoire de Hozumi et al (Hozumi, et al., Cancer Research, Vol. 40, 2919-2924 (1980)) utilisant des cellules de leucémie myélogène M-1.

CB_{X1}

a) Masse moléculaire: Lorsqu'elle est mesurée par filtration sur gel en utilisant Sephadex G-100 et un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2) comme solvant, la masse moléculaire est de 70.000 à 90.000

b) Réactions colorées: Les résultats des tests effectués sur solution aqueuse de CB_{X1} pour les réactions colorées sont rapportés au tableau 1-2.

TABLEAU 1-2

Réactions colorées	Coloration	Indication
Lowry	Bleu	Liaisons peptide
Ninhydrine	Bleu pourpre	Aminoacides
Phénol-acide sulfurique	Marron	Sucres
Anthrone-acide sulfurique	Bleu verdâtre	Sucres
α -Naphтол-acide sulfurique	Pourpre	Sucres
Indole-acide sulfurique	Marron	Sucres
Tryptophane-acide sulfurique	Marron pourpre	Sucres
Holff	Incolore	Pas de lipides

Comme le montre le tableau ci-dessus, CB_{X1} présente des colorations indiquant la présence de protéines et de sucres, mais ne présente pas de coloration indiquant la présence de lipides.

5 c) Aspect et solubilité: Poudre blanche, soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme.

10 d) Teneur en sucre: Suivant le mode opératoire de Spiro, la teneur en sucres de CB_{X1} est de 35 à 45%, répartis en 23 à 28% d'hexoses, 8 à 11% d'hexosamines et 4 à 6% d'acides sialiques.

e) Point isoélectrique: Lorsqu'il est mesuré par isoélectrofocalisation sur Ampholine, son point isoélectrique est de 4,3 à 6,2.

15 f) Adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2).

20 g) Stable du point de vue masse moléculaire par filtration sur gel, et du point de vue activité cytotoxique sur cellules tumorales dans une solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et dans une solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus.

25 h) Il endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales. La cytotoxicité de CB_{X1} a été mesurée en faisant appel aux modes opératoires décrits à propos de CB_X .

CB_{X2}

30 a) Masse moléculaire: Lorsqu'elle est mesurée par filtration sur gel en utilisant Sephadex G-100 et un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2) comme solvant, la masse moléculaire est de 40.000 à 50.000.

b) Réactions colorées: Les résultats des tests effectués sur CB_{X2} en solution aqueuse pour les réactions colorées sont rapportés au tableau 1-3.

TABLEAU 1-3

Réactions colorées	Colorations	Indications
Lowry	Bleu	Liaisons peptide
Ninhydrine	Bleu pourpre	Aminoacides
5 Phénol-acide sulfurique	Marron	Sucres
Anthrone-acide sulfurique	Bleu verdâtre	Sucres
α -Naphтол-acide sulfurique	Pourpre	Sucres
Indole-acide sulfurique	Marron	Sucres
Tryptophane-acide sulfurique	Marron pourpre	Sucres
10 Holff	Incolore	Pas de lipides

Comme le montre le tableau ci-dessus, CB_{X2} présente des colorations indiquant la présence de protéines et de sucres, mais ne présente pas de coloration indiquant la présence de lipides.

15 c) Aspect et solubilité: Poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme.

d) Teneur en sucres: Suivant le protocole opératoire de Spiro, la teneur en sucres de CB_{X2} est de 30 à 37%, répartis en 20 à 23% d'hexoses, 6 à 8% d'hexosamines et 4 à 6% d'acides sialiques.

20 e) Point isoélectrique: Lorsqu'il est mesuré par isoélectrofocalisation sur Ampholine, son point isoélectrique est de 4,2 à 7,3.

25 f) Adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2).

g) Stable du point de vue masse moléculaire par filtration sur gel et du point de vue activité cytotoxique sur cellules tumorales en solution aqueuse à pH 2,0, 30 pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus.

h) Il endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales. La cytotoxicité de CB_{X2} a été mesurée en faisant appel aux mo-

des opératoires décrits à propos de CB_X .

CB_{X3}

5 a) Masse moléculaire: Lorsqu'elle est mesurée par électrophorèse sur gel SDS, la masse moléculaire est de 7.000 à 9.000.

b) Réactions colorées: Les résultats des tests de réactions colorées sur CB_{X3} en solution aqueuse sont rapportés au tableau 1-4.

TABLEAU 1-4

10	Réactions colorées	Colorations	Indications
	Lowry	Bleu	Liaisons peptide
	Ninhydrine	Bleu pourpre	Aminoacides
	Phénol-acide sulfurique	Marron	Sucres
	Anthrone-acide sulfurique	Bleu verdâtre	Sucres
15	α -Naphthol-acide sulfurique	Pourpre	Sucres
	Indole-acide sulfurique	Marron	Sucres
	Tryptophane-acide sulfurique	Marron pourpre	Sucres
	Holff	Incolore	Pas de lipides

20 Comme le montre le tableau ci-dessus, CB_{X3} présente des colorations indiquant la présence de protéines et de sucres, mais ne présente pas de coloration indiquant la présence de lipides.

25 c) Aspect et solubilité: Poudre blanche, soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme.

d) Teneur en sucres: Suivant le protocole opératoire de Spiro, la teneur en sucres de CB_{X3} est de 8 à 15%, répartis en 6 à 10% d'hexoses, 1 à 2% d'hexosamines et 1 à 3% d'acides sialiques.

30 e) Adsorbable sur carboxyméthylcellulose dans une chromatographie d'échange d'ions dans un tampon phosphate 0,05% (pH 6,4) en utilisant de la carboxyméthylcellulose.

f) Stable du point de vue masse moléculaire par filtration sur gel et du point de vue activité cytotoxique

sur les cellules tumorales dans une solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11 à 4°C pendant 24 heures ou plus et dans une solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus.

5 g) Il endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales. La cytotoxicité de CB_{X3} a été mesurée en faisant appel aux protocoles opératoires décrits à propos de CB_X.

10 h) La séquence aminoacide de l'azote terminal de la portion protéinique est Alanine-Alanine-.

Les glycoprotéines suivant l'invention ont des caractéristiques communes en ce qui concerne leurs réactions colorées, leur aspect, leur solubilité, leur stabilité, leur effet sur les cellules tumorales, etc., mais elles diffèrent les unes des autres des points de vue de leur masse moléculaire et leur teneur en sucres, et c'est pourquoi les substances respectives peuvent être distinguées les unes des autres.

Les glycoprotéines suivant l'invention se distinguent nettement de la Lymphotoxine, du TNF, leurs mélanges, c'est-à-dire CBF, ou Interféron (substances qui sont toutes obtenues à partir de cellules réticulo-endothéliales, de lymphoblastes, de cellules leucémiques ou de fibroblastes) en ce qui concerne les caractéristiques suivantes et, ainsi, sont de toute évidence des substances différentes.

Plus particulièrement, on sait que la Lymphotoxine existe sous la forme de trois types différents, suivant sa masse moléculaire, c'est-à-dire: α -Lymphotoxine ayant une masse moléculaire de 70.000 à 90.000, β -Lymphotoxine ayant une masse moléculaire de 35.000 à 50.000, et γ -Lymphotoxine ayant une masse moléculaire de 10.000 à 20.000 (Eds., Cohen et al., Biology of the Lymphokine, Academic Press, 1979). Du point de vue masse moléculaire, CB_X ressemble à la γ -Lymphotoxine, CB_{X1} à la α -Lymphotoxine et CB_{X2} à la β -Lymphotoxine. Toutefois, comme rapporté par Lucas et al (Lucas, Z.J. et al., J. Immunology, Vol. 109,1233 (1972), la Lymphotoxine est peu sélective du point de vue cytotoxicité

et endommage aussi bien les cellules normales que les cellules tumorales. Au contraire, ~~l'effet~~ cytotoxique des glycoprotéines suivant l'invention est sélectif vis-à-vis des cellules tumorales, ce qui les distingue nettement de la Lymphotoxine. En outre, les glycoprotéines suivant l'invention diffèrent de la Lymphotoxine des points de vue adsorbabilité et stabilité. Plus particulièrement, alors que la Lymphotoxine préparée suivant le procédé de Granger et al (Granger, G.A. et al., Cellular Immunology, Vol. 38, 388-402 (1978)) n'est pas ou peu adsorbée sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01M les glycoprotéines suivant l'invention sont adsorbées sur cette substance. Qui plus est, les glycoprotéines suivant l'invention sont stables en solutions aqueuses à pH 2,0, pH 7,0 et pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et sont également stables à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus. Au contraire, la Lymphotoxine perd 60% ou plus de son activité au bout de 4 heures à 56°C.

Le Tumor Necrosis Factor (TNF) présente un effet cytotoxique sélectif sur les cellules tumorales et a une masse moléculaire de 33.000 à 63.000 et une teneur en sucre de 0% (Carswell, E.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. Vol. 72, 3666-3670 (1975)) ou a une masse moléculaire de 39.000 et une teneur en sucres de 40% (The Nippon Keizai Shimbun, édition de la matinée, 23 août 1981), et les deux diffèrent de CB_X, CB_{X1} et CB_{X3} du point de vue masse moléculaire, et de CB_{X2} du point de vue teneur en sucres.

En outre, CBF, qui contient ces facteurs cytotoxiques en combinaison, a une masse moléculaire d'environ 35.000 (The Nippon Keizai Shimbun, édition de la matinée, 22 novembre 1981) et diffère des glycoprotéines suivant l'invention du point de vue masse moléculaire.

Enfin, les glycoprotéines suivant l'invention diffèrent de l'Interféron en ce que les premières n'ont pas d'activité antivirale.

On décrira maintenant les cellules utilisées pour préparer les glycoprotéines suivant l'invention.

Les cellules provenant d'animaux à sang chaud (homme, ou autres) utilisables suivant l'invention peuvent être choisies parmi les cellules réticulo-endothéliales, les lymphoblastes, les cellules leucémiques et les fibroblastes, et peuvent être utilisées soit sous forme de culture primaire, soit sous forme d'une lignée cellulaire établie. Il est préférable et plus sûr d'utiliser des cellules d'origine humaine, car elles provoquent moins de réactions induites par l'antigénicité et autres réactions nuisibles du point de vue de l'utilisation de CB dans le traitement de maladies chez l'homme. Comme cellules de ce type, on peut choisir n'importe quelles cellules parmi, par exemple, les cellules BALL-1, les cellules TALL-1 et les cellules NALL-1 rapportées par Miyoshi (Miyoshi, I., Nature, Vol. 267, 843-844 (1977)), les cellules Namalwa décrites dans Journal of Clinical Microbiology (J. Clin. Microbiol., Vol. 1, 116-117 (1975)), les cellules M-7002 et les cellules B-7101 décrites dans Journal of Immunology (Vol. 113, 1334-1345 (1974)), les cellules Flow 7000 (Flow Co.), les cellules JBL, les cellules EBV-Sa, les cellules EBV-Wa et les cellules EBV-HO décrites dans "The tissue Culture" (Vol. 6, 527-546, (1980)), des lignées cellulaires établies comme les cellules BALM 2, les cellules CCRF-SB (ATCC CCL 120) etc.. ainsi que les lymphocytes et macrophages humains, et que les cellules d'une lignée cellulaire établie provenant de lymphocytes et macrophages humains traitées à l'aide de divers virus, médicaments, rayonnements, etc..

En ce qui concerne les cellules provenant d'animaux à sang chaud autres que l'homme, on peut choisir n'importe quelles cellules parmi, par exemple, les cellules de souris BALB/C 3T3 (Flow Co.), les cellules leucémiques de souris comme les cellules L1210 (J. Natl. Cancer. Inst., Vol. 13, 1328 (1953)) et les cellules P388 (Scientific Proceedings, Pathologists & Bacteriologists, Vol. 33, 603 (1957)), les clones M3 du mélanome de la souris (Flow Co.), les cellules tumorales de rat LLC-WRC 256 (Flow Co.), les cellules RPMI 1846 du mélanome du hamster (Flow Co.), et les lymphocytes,

macrophages, etc.. Il est bien entendu que les cellules utilisables suivant l'invention ne sont pas limitées à celles décrites ci-dessus.

5 On décrira maintenant le procédé de préparation des glycoprotéines (CB) suivant l'invention.

Le procédé de préparation de CB faisant appel à des cellules provenant de l'homme ou animaux à sang chaud autres que l'homme peut être choisi parmi les modes opératoires connus pour la préparation de substances actives
10 à l'aide de cellules, et le produit peut être récolté soit directement à partir des cellules, soit après culture des cellules, ou, si on souhaite obtenir une quantité importante de CB, ces cellules peuvent être exposées à un ou plusieurs inducteurs. Par exemple, les cellules provenant d'animaux
15 à sang chaud comme l'homme ou autres que l'homme peuvent être mises en suspension dans un milieu approprié, directement exposé à un inducteur, pour obtenir CB qu'on peut ensuite récolter à partir du milieu.

Comme inducteur pour CB, on peut, d'une façon générale,
20 le, choisir une ou plusieurs substances parmi les suivantes: les lectines comme la photohémagglutinine, la concanavaleine A, le mitogène du phylolaque (pokeweed), les lyopolysaccharides, les polysaccharides comme le phosphomannane, le phosphate de dextrane, les endotoxines, les
25 constituants de cellules microbiennes, les bactéries, les virus, les acides nucléiques, les polynucléotides, etc.. En outre, pour les cellules sensibilisées par un antigène, l'antigène correspondant sert également d'inducteur pour CB.

30 Le CB ainsi obtenu peut aisément être isolé par des modes de purification connus, par exemple par relargage, filtration, centrifugation, concentration, lyophilisation, etc.. Si on souhaite une purification plus poussée, on peut procéder par adsorption et élution sur une résine échangeuse d'ions, filtration sur gel, électrophorèse ou chromatographie d'affinité en utilisant par exemple du Sephadex
35 associé à un anticorps ou à Ulex europeus agglutinine.

Si on veut obtenir CB en grosse quantité, on peut faire croître les cellules de la lignée cellulaire établie dans l'organisme d'animaux à sang chaud, comme on va maintenant l'expliquer.

5 Les lignées cellulaires établies provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres que l'homme, peuvent être n'importe quelles cellules choisies parmi les cellules réticulo-endothéliales, les lymphoblastes, les cellules leucémiques et les fibroblastes, et, de préférence, les
10 lignées cellulaires d'origine humaine sont souhaitables et sûres car elles provoquent moins de réactions induites par antigénicité et autres réactions nuisibles du point de vue de l'utilisation de CB dans le traitement des maladies de l'homme. Comme lignées cellulaires de ce type, on peut
15 utiliser n'importe quelles lignées cellulaires, comme précédemment indiqué, par exemple: des cellules BALL-1, des cellules TALL-1, des cellules NALL-1, des cellules Namalwa, des cellules M-7002, des cellules B-7101, des cellules Flow 7000, des cellules BALB/C 3T3, des cellules L1210,
20 des cellules P388, des lymphocytes, des macrophages, etc..

Lorsqu'on veut faire croître ces cellules dans un organisme d'animal à sang chaud, on peut effectuer la transplantation de ces cellules directement ou, comme décrit ci-dessous, indirectement en inoculant une chambre
25 à l'aide de ces cellules et en plaçant la chambre dans l'organisme. Les animaux à sang chaud chez lesquels ces cellules sont transplantées peuvent être d'espèce identique ou différente, tant que la lignée cellulaire établie, provenant de l'homme ou autres animaux à sang chaud peut s'y
30 développer. Par exemple, on peut utiliser des volatiles comme les poulets, les pigeons, et des mammifères comme les chiens, les chats, les singes, les chèvres, les porcs, les chevaux, les bovins, les lapins, les cobayes, les rats, les hamsters, les souris ordinaires, les souris dénudées,

35 Lorsqu'on transplante sur un de ces animaux des cellules cultivées provenant d'un animal d'espèce différente, il peut se produire des réactions immunologiques indésirables.

C'est pourquoi il est souhaitable, afin de minimiser la possibilité de voir se produire des réactions immunologiques, d'utiliser des animaux à l'état le plus immature possible, par exemple sous forme d'oeufs, de foetus, d'embryons, ou d'onatals, ou d'animaux nouveaux-nés. En outre, les réactions immunologiques peuvent également être supprimées par des traitements préalables, par exemple en exposant ces animaux à des rayons X de 200 à 600 REM, ou en leur injectant des agents immunosuppresseurs.

Lorsque l'animal à utiliser comme hôte est une souris dénudée de la même espèce que celle des cellules à transplanter, les réactions immunologiques sont faibles et c'est pourquoi ces cellules peuvent être transplantées chez l'hôte et croître rapidement sans aucun traitement préalable, et il s'ensuit que l'utilisation de ces cellules convient tout particulièrement.

On peut également assurer une croissance constante des cellules et accroître la quantité de CB produite à partir de celles-ci, en transplantant des cellules d'un animal à sang chaud sur un autre animal à sang chaud, par exemple en transplantant des cellules provenant de sujets humains ou d'animaux à sang chaud autres que l'homme sur des hamsters afin d'assurer leur croissance, puis en retransplantant ces cellules sur des souris dénudées. Dans ces cas, la transplantation peut être effectuée entre une même classe ou division ainsi qu'entre une même espèce ou un même genre.

Le site sur lequel les cellules d'homme ou d'animaux à sang chaud autres que l'homme doivent être transplantées peut être n'importe quel site sur lequel les cellules transplantées peuvent croître comme, par exemple, la cavité allantoïque, les veines, la cavité abdominale, le tissu sous-cutané.

Au lieu de directement transplanter et de faire croître des lignées cellulaires établies, provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres que l'homme, dans l'organisme d'animaux à sang chaud, n'importe lesquelles des

lignées cellulaires établies précitées peuvent être inoculées et croître dans une chambre de diffusion classique de forme et dimensions variables qui est placée, par exemple, dans la cavité péritonéale de l'organisme d'animaux à sang
5 chaud. La chambre de diffusion est conçue de façon à permettre la croissance desdites cellules en facilitant l'absorption des fluides organiques de l'animal comme éléments nutritifs, la chambre étant également pourvue de membranes filtrantes poreuses, par exemple une membrane filtrante
10 dont les pores ont une dimension d'environ 10^{-7} à 10^{-3} m, un dispositif d'ultrafiltration ou des fibres creuses, qui empêche la migration des cellules hors de la chambre et permet aux humeurs de l'organisme, servant d'éléments nutritifs, de pénétrer dans la chambre.

15 Si nécessaire, la chambre de diffusion peut être conçue et placée, par exemple, sur la surface du corps de l'animal, de façon à faire communiquer le fluide nutritif de la chambre avec les humeurs organiques de l'animal et les faire circuler, de telle sorte que la croissance des
20 cellules inoculées dans ladite chambre puisse être observée par une fenêtre d'observation. La chambre de diffusion peut également être conçue de façon à pouvoir être débranchée de l'organisme de l'animal et, ainsi, permettre de faire croître des cellules pendant toute la durée de vie
25 de l'animal, accroissant par là le rendement en cellules par animal.

La méthode faisant appel à l'utilisation de ces chambres de diffusion a d'autres avantages; c'est-à-dire que, comme les cellules des lignées cellulaires établies provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres ne sont
30 pas mises en contact direct avec les cellules animales, ces cellules peuvent aisément être récoltées et, du fait de la moindre possibilité de provoquer des réactions immunologiques indésirables, divers animaux à sang chaud peuvent être
35 utilisés sans qu'il soit nécessaire de traiter préalablement les animaux afin de supprimer les réactions immunologiques.

Les animaux chez lesquels les cellules ont été transplantées peuvent être nourris entretenus de la façon habituelle pour l'animal, aucune précaution spéciale n'étant nécessaire même après la transplantation, ce qui est également commode.

Le laps de temps nécessaire à la croissance des cellules des lignées cellulaires établies provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres animaux est, d'une façon générale, de 1 à 10 semaines. Le nombre de cellules ainsi obtenu s'est avéré être d'environ 10^7 à 10^{12} cellules ou plus par animal.

En d'autres termes, le procédé suivant l'invention pour la préparation de CB est extrêmement avantageux, car les lignées cellulaires établies provenant d'animaux à sang chaud sont multipliées par d'environ 10^2 à 10^7 ou plus par rapport au nombre de cellules directement inoculées à l'animal, ou d'environ 10 à 10^8 fois ou plus de la multiplication obtenue lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu nutritif.

La production de CB à partir des cellules qu'on a fait croître à partir d'une lignée cellulaire établie, provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres, peut être effectuée de diverses manières. On peut également les récolter directement à partir de l'organisme dans lequel on a fait croître ces cellules. Par exemple, on peut récolter CB directement à partir des cellules obtenues en faisant croître les cellules transplantées, provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres, en suspension dans de l'ascite, ou en les faisant croître dans le tissu sous-cutané.

On peut également procéder à la préparation de CB en utilisant un inducteur après avoir fait croître les lignées cellulaires établies, provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres, dans l'organisme d'un animal, en utilisant l'inducteur soit directement in vivo soit in vitro après avoir retiré les cellules de l'organisme. Par exemple, les cellules d'une lignée cellulaire établie provenant d'animaux

à sang chaud comme l'homme ou autres, qu'on a fait croître dans de l'ascite à partir de laquelle elles ont été récoltées, ou les cellules isolées et dissociées d'une tumeur sous-cutanée comprenant les cellules d'une lignée cellulaire établie provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres, peuvent être mises en suspension dans un milieu nutritif maintenu à une température d'environ 20 à 40°C, de façon à obtenir une concentration cellulaire d'environ 10^5 à 10^8 cellules par ml, puis exposées à un inducteur de CB, induisant ainsi la production de CB qu'on peut ensuite récolter.

En outre, lorsqu'on fait croître dans une chambre de diffusion les cellules d'une lignée cellulaire établie provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres, les cellules peuvent être directement récoltées à partir de la chambre, ou peuvent être récoltées une fois qu'elles ont été retirées de la chambre, soit directement, soit même après exposition à un ou plusieurs inducteurs.

De plus, le rendement en CB par animal peut être encore amélioré en faisant appel, par exemple, à un procédé suivant lequel les cellules d'une lignée cellulaire établie provenant d'animaux à sang chaud comme l'homme ou autres, qu'on a fait croître dans l'organisme d'un autre animal, sont exposées à un inducteur afin d'induire la production de CB in situ, puis les cellules obtenues, qui ont été récoltées sur un site particulier ou dans la totalité du même organisme animal, sont exposées à un inducteur afin d'induire la production de CB; un procédé suivant lequel les cellules utilisées sont à nouveau exposées à un inducteur afin d'induire la production de CB; un procédé suivant lequel une chambre de diffusion placée dans ou communiquant avec l'organisme animal est remplacée par une nouvelle chambre afin d'accroître le nombre des cellules obtenues; etc..

Pour induire la production de CB, on peut utiliser n'importe quel inducteur pour CB décrit ci-dessus, et le CB ainsi obtenu peut être fractionné respectivement en CB_x,

CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3} ayant les masses moléculaires précisées, en faisant appel aux modes de séparation et de purification connus décrits ci-dessus.

5 On décrira maintenant l'efficacité, la toxicité, le mode d'utilisation et la posologie du CB ainsi obtenu.

Essai 1

Sélectivité de l'effet cytotoxique

10 On utilise des séries de 10⁵ cellules désignées cellulaires tumorales suivantes: cellules KB (cancer du nasopharynx), cellules MX-1 (cancer du sein, fournies par Dr. Shigeru Tsukagoshi, Cancer Institute), cellules HEP-2 (cancer de la gorge) et cellules HEL (hépatome, Flow Co.) ainsi que des lignées cellulaires normales suivantes: cellules intestinales 407, cellules cardiaques de Girardi, 15 cellules hépatiques Chang, cellules Vero (rein de singe) et cellules MDCK (rein de chien) (Flow Co.) qui ont toutes été respectivement précultivées pendant 24 heures, et ainsi que des séries de 10⁵ cellules de cellules P388 et 20 L1210 (leucémie, fournies par Dr. Shigeru Tsukagoshi, Cancer Institute), qui ont été utilisées immédiatement, et on cultive chaque série dans 1 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et chaque substance à tester à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Puis on compte le nombre de cellules 25 viables non colorées par le Bleu Trypan, sous un microscope optique, et on calcule la concentration de la substance testée à laquelle 50% des cellules sont tuées, par rapport au témoin auquel on attribue la valeur 100. On utilise comme substances à tester CB_X obtenu à l'exemple 30 10, CB_{X1} obtenu à l'exemple 16, CB_{X2} obtenu à l'exemple 20, CB_{X3} obtenu à l'exemple 26 ou 29, un mélange de CB_X et de CB_{X1}, un mélange de CB_X, CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3}, un mélange de CB_{X2} et de CB_{X3}, les α-, β- et γ-Lymphotoxines obtenues par un procédé connu (Granger et al., Cellular Immunology, Vol. 38, 388-402 (1978)), CBF séparé de 35 CB_X à l'exemple 1 et la Mitomycine C. Une unité des Lymphotoxines et de CBF est exprimée par un indice classique basé sur la cytotoxicité sur cellules L de souris (Eds. Bloom, B.R. & Grade, P.R. "In Vitro Methods

in Cell-mediated Immunity", Academic Press, 1979). Les résultats obtenus sont rapportés aux tableaux 2-1 à 2-4.

TABLEAU 2-1

5	Nom des cellules	Espèce	Concentration pour une inhibition de 50% de la croissance			
			CBx (unités/ml)	γ-Lympho- toxine (unités/ml)	CBF (unités/ml)	Mitomycine C (µg/ml)
10	KB	Homme	1,0	16	18	34
	HEp-2	Homme	1,6	5,6	24	17
	HEL	Homme	1,1	-	33	26
	MX-1	Homme	1,9	-	3,5	32
	L1210	Souris	3,0	-	-	43
	P388	Souris	3,3	-	-	36
15	Intestin 407	Homme	>1.000	80,0	>20.000	32
	Girardi	Homme	>1.000	-	>20.000	45
	Coeur	Homme	>1.000	-	>20.000	19
	Chang foie	Homme	>1.000	8,0	>20.000	19
	20	Vero	Singe	650	-	-
MDCK		Chien	520	-	-	41

Note: "-" signifie que l'essai n'a pas été effectué

TABLEAU 2-2

		Concentration pour une inhibition de 50% de la croissance						
Nom des cellules	Espèce	CBX1 (unités/ml)	CBX2 (unités/ml)	α-Lympho- toxine (unités/ml)	β-Lympho- toxine (unités/ml)	CBF (unités/ml)	Mitomy- cine C (µg/ml)	
Cellules tumorales	KB	1,0	1,0	19	21	18	34	
	HEP-2	1,5	1,4	4,8	7,2	24	17	
	HEL	1,3	1,5	-	-	33	26	
	MX-1	1,8	1,6	-	-	3,5	32	
	L1210	3,2	3,4	-	-	-	43	
	P388						36	
Cellules normales	Intestin 407	>1.000	>1.000	76,0	92,0	>20.000	32	
	Girardi coeur	>1.000	>1.000	-	-	>20.000	19	
	Chang foie	>1.000	>1.000	9,6	8,8	>20.000	19	
	Vero	630	640	-	-	-	52	
	MDCK	550	530	-	-	-	41	

Note: "-" signifie que l'essai n'a pas été effectué

TABLEAU 2-3

5	Nom des cellules	Espèce	Concentration pour une inhibition de 50% de la croissance			
			CB _{X3} ^{⊕1)} (unités/ml)	CB _{X3} ^{⊕2)} (unités/ml)	Mitomycine C (µg/ml)	
10	KB	Homme	1,0	1,0	35	
	HEp-2	Homme	1,5	1,7	18	
	HEL	Homme	1,3	1,4	25	
	MX-1	Homme	1,8	1,7	30	
	L1210	Souris	3,1	2,9	44	
	P388	Souris	3,4	3,5	37	
15	Intestin 407	Homme	>1.000	>1.000	35	
	Girardi coeur	Homme	>1.000	>1.000	44	
	Chang foie	Homme	>1.000	>1.000	21	
	Vero	Singe	620	580	50	
	20	MDCK	Chien	510	540	44
		Culture primaire	Rat	870	910	61
		Foie de rat				

25 Notes: ⊕1) CB_{X3} obtenu à l'exemple 26

⊕2) CB_{X3} obtenu à l'exemple 29

TABLEAU 2-4

	Noms des cellules	Espèce	Concentration pour une inhibition de 50% de la croissance			
			A ^{⊕1)} (unités/ml)	B ^{⊕2)} (unités/ml)	C ^{⊕3)} (unités/ml)	
5	Cellules tumorales	KB	1,0	1,0	1,0	
		HEp-2	1,5	1,4	1,6	
		HEL	Homme	1,6	1,7	1,9
		MX-1	Homme	1,8	1,7	1,6
10		L1210	Souris	3,0	3,2	3,0
		P388	Souris	3,1	3,4	3,2
15	Cellules normales	Intestin 407	Homme	>1.000	>1.000	>1.000
		Girardi coeur	Homme	>1.000	>1.000	>1.000
		Chang foie	Homme	>1.000	>1.000	>1.000
		Vero	Singe	610	590	580
		MDCK	Chien	580	610	600

- 20 Notes: ^{⊕1)} Mélange de CB_x et CB_{x1}
^{⊕2)} Mélange de CB_x, CB_{x1}, CB_{x2} et CB_{x3}
^{⊕3)} Mélange de CB_{x2} et CB_{x3}

25 Comme il découle des résultats ci-dessus, CB, similaire à CBF, a sélectivement endommagé les cellules tumorales pratiquement sans endommager les cellules normales. Toutefois, l'intensité de l'effet cytotoxique sur les tumeurs respectives est différente entre CB et CBF. Au contraire, la α - et la β -Lymphotoxine ainsi que la Mitomycine C présentent une cytotoxicité non sélective vis-à-vis des cellules normales et des cellules tumorales.

30

Essai 2

Influence sur des souris sur lesquelles on a effectué une transplantation de Sarcome 180 ou de Tumeur d'Ehrlich

5 Sur des souris mâles (souche ddY) pesant de 25 à 30 g on transplante par voie intrapéritonéale 3×10^6 cellules par animal de Sarcome 180 ou de tumeur ascitique d'Ehrlich et on observe le nombre de jours de survie. A des groupes de 5 souris, on administre tous les jours, par voie intra-veineuse, entre le jour suivant la transplantation et la 10 mort des animaux, CB_X obtenu à l'exemple 6, CB_{X1} obtenu à l'exemple 15, CB_{X2} obtenu à l'exemple 20 et CB_{X3} obtenu à l'exemple 26 ou 29. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage du nombre moyen de jours de survie par rapport au groupe de référence, et sont indiqués aux tableaux 3-1 15 à 3-3.

Tableau 3-1

Tumeur	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
20 Sarcome 180 de la souris	CB_X	1,2 unité /kg	111
		4 unités/kg	131
		12 unités/kg	164
	25 Mitomycine C	0,5 mg/kg	140
		20 mg/kg	172
30 Tumeur ascitique d'Ehrlich	CB_X	1,2 unité /kg	141
		4 unités/kg	159
		12 unités/kg	187
	Mitomycine C	0,5 mg/kg	168
		20 mg/kg	

Tableau 3-2

	Tumeur	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)	
5	Sarcome 180 de la souris	CB _{X1}	1 unité /kg	113	
10			3 unités/kg	133	
			10 unités/kg	160	
15		CB _{X2}	1 unité /kg	110	
			3 unités/kg	135	
			10 unités/kg	159	
20	Mitomycine C	0,5 mg/kg	138		
	Cyclophosphamide	20 mg/kg	170		
20	Tumeur ascitique d'Ehrlich	CB _{X1}	1 unité /kg	139	
			3 unités/kg	164	
			10 unités/kg	187	
		25	CB _{X2}	1 unité /kg	135
				3 unités/kg	161
				10 unités/kg	189
30	Mitomycine C	0,5 mg/kg	164		
	Cyclophosphamide	20 mg/kg	206		

Tableau 3-3

	Tumeur	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)	
30	Sarcome 180 de la souris	CB _{X3} ^{⊕1)}	1 unité /kg	110	
			3 unités/kg	129	
			10 unités/kg	157	
		35	CB _{X3} ^{⊕2)}	1 unité /kg	108
				3 unités/kg	131
				10 unités/kg	150
40	Mitomycine C	0,5 mg/kg	142		
	Tumeur ascitique d'Ehrlich	CB _{X3} ^{⊕1)}	1 unité /kg	139	
3 unités/kg			155		
10 unités/kg			181		
45		CB _{X3} ^{⊕2)}	1 unité /kg	132	
			3 unités/kg	157	
			10 unités/kg	179	
50	Mitomycine C	0,5 mg/kg	166		

Notes: ⊕1) CB_{X3} obtenu à l'exemple 26⊕2) CB_{X3} obtenu à l'exemple 29

Il découle nettement des résultats ci-dessus que CB présente un effet anti-tumoral significatif aussi bien sur des souris chez lesquelles on a transplanté des cellules de Sarcome 180 que sur des souris chez lesquelles on a

5 transplanté des cellules de tumeur d'Ehrlich.

Essai 3

Influence sur les jours de survie de souris leucémiques

Sur des souris mâles de souche BDF₁ de 20 à 25 g on transplante par voie intrapéritonéale 10⁵ cellules par

10 animal de leucémie L1210 de la souris ou 10⁶ cellules par animal de leucémie P388 de la souris, et on observe le nombre de jours de survie. CB_X obtenu à l'exemple 10, CB_{X1} obtenu à l'exemple 16, CB_{X2} obtenu à l'exemple 20 et CB_{X3} obtenu à l'exemple 26 ou 29 sont administrés par voie

15 intrapéritonéale à des groupes de 5 souris, soit chaque jour à partir du jour suivant la transplantation jusqu'à la mort (pour CB_X, CB_{X1} et CB_{X2}), soit une seule fois le jour suivant la transplantation (pour CB_{X3}). Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre moyen de jours de

20 survie par rapport au groupe témoin, et sont indiqués aux tableaux 4-1 - 4-3.

TABLEAU 4-1

25	Tumeur	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
30	Leucémie L1210 de la souris	CB _X	0,4 unité /kg 1,2 unité /kg 4 unités/kg	105 123 151
		Mitomycine C	0,5 mg/kg	128
		Cyclophosphamide	20 mg/kg	172
35	Leucémie P388 de la souris	CB _X	0,4 unité /kg 1,2 unité /kg 4 unités/kg	113 128 144
		Mitomycine C	0,5 mg/kg	133
		Cyclophosphamide	20 mg/kg	147

TABLEAU 4-2

	Tumeur	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
5		CB _{X1}	3 unités/kg 10 unités/kg 30 unités/kg	108 122 149
10	Leucémie L1210 de la souris	CB _{X2}	1 unité /kg 3 unités/kg 10 unités/kg	110 121 151
		Mitomycine C	0,5 mg/kg	136
		Cyclophosphamide	20 mg/kg	
15		CB _{X1}	1 unité /kg 3 unités/kg 10 unités/kg	110 126 147
	Leucémie P388 de la souris	CB _{X2}	0,3 unité /kg 1 unité /kg 3 unités/kg	109 125 151
20		Mitomycine C	0,5 mg/kg	130
		Cyclophosphamide		

TABLEAU 4-3

	Tumeur	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
25		CB _{X3} ^{⊕1)}	10 unités/kg 30 unités/kg 100 unités/kg	109 120 149
30	Leucémie L1210 de la souris	CB _{X3} ^{⊕2)}	10 unités/kg 30 unités/kg 100 unités/kg	111 121 132
		Mitomycine C	5,0 mg/kg	
35		CB _{X3} ^{⊕1)}	10 unités/kg 30 unités/kg 100 unités/kg	122 145 176
	Leucémie P388 de la souris	CB _{X3} ^{⊕2)}	10 unités/kg 30 unités/kg 100 unités/kg	120 148 171
40		Mitomycine C	5,0 mg/kg	141

Notes: ⊕1) CB_{X3} obtenu à l'exemple 26⊕2) CB_{X3} obtenu à l'exemple 29

Il découle nettement des résultats ci-dessus que CB présente un effet anti-tumoral significatif aussi bien chez les souris porteuses de leucémie L1210 que chez celles porteuses de leucémie P388.

5 Essai 4

Influence sur le nombre de jours de survie de souris porteuses de carcinome du poumon

Des souris mâles de souche DBF₁ de 20 à 25 g subissent une transplantation intramusculaire, dans la cuisse droite de 2×10^6 cellules de carcinome de Lewis du poumon, et on observe le nombre de jours de survie. CB_X obtenu à l'exemple 7, CB_{X1} obtenu à l'exemple 17, CB_{X2} obtenu à l'exemple 22 et CB_{X3} obtenu à l'exemple 26 ou 29 sont administrés par voie intraveineuse à des groupes de 6 15 souris, chaque jour à partir du jour suivant la transplantation, jusqu'à leur mort. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre moyen de jours de survie par rapport au groupe témoin, et sont indiqués aux tableaux 5-1 et 5-2.

TABLEAU 5-1

20	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
25	CB _X	1,2 unité /kg	104
		4 unités/kg	112
		12 unités/kg	146
	Mitomycine C	0,5 mg/kg	121
	Cyclophosphamide	20 mg/kg	163

TABLEAU 5-2

Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
5 CB _{X1}	1 unité /kg	107
	3 unités/kg	113
	10 unités/kg	145
CB _{X2}	1 unité /kg	109
	3 unités/kg	121
	10 unités/kg	143
10 CB _{X3} ^{⊕1)}	1 unité /kg	115
	3 unités/kg	143
	10 unités/kg	157
15 CB _{X3} ^{⊕2)}	1 unité/kg	111
	3 unités/kg	136
	10 unités/kg	159
Mitomycine C	0,5 mg/kg	120
Cyclophosphamide	20 mg/kg	164

Notes: ⊕1) CB_{X3} obtenu à l'exemple 26

⊕2) CB_{X3} obtenu à l'exemple 29

20 Essai 5

Influence sur la survie de souris porteuses de mélanome

Sur des souris mâles de souche BDF₁ de 20 à 25 g on transplante par voie sous-cutanée, dans le dos, 10⁶ cellules par animal de mélanome B 16 de la souris, et on note le nombre de jours de survie. CB_X obtenu à l'exemple 10 et CB_{X3} obtenu à l'exemple 26 ou 29 sont administrés par voie intraveineuse à des groupes de 7 souris, chaque jour, à partir du jour suivant la transplantation jusqu'à leur mort. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre moyen de jours de survie par rapport au groupe témoin et sont indiqués aux tableaux 6-1 et 6-2.

TABLEAU 6-1

Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
35 CB _X	1,2 unité /kg	112
	4 unités/kg	135
	12 unités/kg	180
Mitomycine C	0,5 mg/kg	138
Cyclophosphamide	20 mg/kg	158

TABLEAU 6-2

	Substance testée	Dose journalière	Nombre moyen de jours de survie (%)
5	CB _{X3} ^{⊕1)}	1 unité /kg	110
		3 unités/kg	131
		10 unités/kg	178
10	CB _{X3} ^{⊕2)}	1 unité /kg	116
		3 unités/kg	129
		10 unités/kg	176
	Mitomycine C	0,5 mg/kg	140

Notes: ⊕1) CB_{X3} obtenu à l'exemple 26

⊕2) CB_{X3} obtenu à l'exemple 29

Il découle nettement des résultats ci-dessus que CB présente un effet anti-tumoral évident sur les souris porteuses de mélanome B 16 de la souris.

Essai 6

Influence sur la métastase pulmonaire du cancer

Sur des souris mâles de souche BDF₁ de 20 à 30 g réparties en groupes de 6 animaux chacun, on transplante par voie sous-cutanée, dans le dos, des segments carrés de 2 mm de côté de cancer de Lewis du poumon. CB_X obtenu à l'exemple 6, CB_{X1} obtenu à l'exemple 15, CB_{X2} obtenu à l'exemple 20 et le CBF obtenu sont administrés une fois par jour, pendant les 12 jours à partir du 9ème jour après la transplantation, par voie intraveineuse. Au 21ème jour suivant la transplantation, on isole et pèse la masse de tumeur primitive, et on calcule le nombre de nodules de métastase dans les poumons, suivant le protocole opératoire de Wexler, H. (J. Natl. Cancer Institute, Vol. 36, 641 (1966)). Les résultats obtenus sont rapportés aux tableaux 7-1 et 7-2.

TABLEAU 7-1

Essai	Substance testée	Dose journalière	Poids de la tumeur (g)	Nombre de nodules de métastase dans le poumon
5	1 Témoin		9,6 ± 1,9	29,2 ± 7,3
	CB _X	4 unités/kg	5,1 ± 1,6 [⊕]	6,8 ± 3,2 [⊕]
		40 unités/kg	3,0 ± 0,3 ^{⊕⊕}	0,4 ± 0,4 ^{⊕⊕}
	Cyclophosphamide	20 mg/kg	3,4 ± 0,7 ^{⊕⊕}	0,4 ± 0,2 ^{⊕⊕}
10	2 Témoin		7,3 ± 0,3	29,2 ± 1,4
	CB _X	4 unités/kg	4,1 ± 1,2 [⊕]	6,7 ± 2,1 [⊕]
		40 unités/kg	2,3 ± 0,2 ^{⊕⊕}	0,5 ± 0,2 ^{⊕⊕}
	CBF	4 unités/kg	6,6 ± 0,6	22,0 ± 5,0
		40 unités/kg	4,2 ± 0,4 [⊕]	21,4 ± 4,5

15 TABLEAU 7-2

Substance testée	Dose journalière	Poids de la tumeur (g)	Nombre de nodules de métastase dans le poumon
Témoin		7,8 ± 0,5	29,6 ± 1,0
20 CB _{X1}	3 unités/kg	4,3 ± 1,3 [⊕]	7,3 ± 2,0 [⊕]
	30 unités/kg	2,4 ± 0,3 ^{⊕⊕}	0,5 ± 0,3 ^{⊕⊕}
CB _{X2}	3 unités/kg	4,9 ± 1,3 [⊕]	7,1 ± 1,9 [⊕]
	30 unités/kg	2,1 ± 0,5 ^{⊕⊕}	0,7 ± 0,3 ^{⊕⊕}
25 CBF	3 unités/kg	6,8 ± 0,6	23,0 ± 5,2
	30 unités/kg	4,3 ± 0,5 [⊕]	22,4 ± 4,4
Cyclophosphamide	20 unités/kg	3,5 ± 0,6 ^{⊕⊕}	0,6 ± 0,3 ^{⊕⊕}

Notes: Les résultats des tableaux sont exprimés en (moyenne) ± (écart type)

- 30 ⊕ Statistiquement différent du groupe témoin à un niveau de signification égal ou inférieur à 5%
- ⊕⊕ Statistiquement différent du groupe témoin à un niveau de signification égal ou inférieur à 1%.

35 Il ressort nettement des résultats ci-dessus que CB_X supprime avec grand succès le cancer primaire du poumon et ses métastases pulmonaires, tandis que CBF n'a pratiquement pas d'effet sur les métastases pulmonaires.

Essai 7 Effet d'induction de la différenciation des cellules tumorales

Conformément au protocole opératoire de Hozumi, M. et al (Cancer Research, Vol. 40, 2919-2924 (1980)), 5×10^5 cellules de leucémie myélogène aigüe M-1 (fournies par Dr. Motoo Hozumi, Saitama Cancer Center) sont mises en suspension dans 1 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et contenant également des aminoacides et des vitamines en des proportions doubles des niveaux habituels, qui a été additionné de chaque substance à tester, et sont cultivées à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Ensuite, les cellules sont remises en suspension dans un milieu contenant 0,2% de particules de latex de polystyrène (Dow Chemical Co.), sont incubées à 37°C pendant 4 heures, après quoi le nombre de cellules ayant phagocyté les particules et le nombre de cellules totales sont comptés sous un microscope optique et le taux de différenciation est calculé d'après le rapport de ces cellules. Les résultats obtenus sont indiqués au tableau 8.

TABLEAU 8

Substance à tester	Concentration	Taux de différenciation (%)
Témoin		1
CB _X	0,004 unité/ml	8
	0,04 unité/ml	11
	0,4 unité/ml	18
Dexaméthasone	20,0 ng/ml	25

CB_X a pour effet d'induire la différenciation.

30 Essai 8

Test relatif à l'effet pyrogène

Conformément au protocole opératoire décrit dans la Pharmacopée japonaise, CB_X obtenu à l'exemple 3 est administré par voie intraveineuse à des lapins blancs à une dose de 100 unités par animal. Les résultats des mesures de la température rectale effectuées jusqu'à 3 heures plus

tard à l'aide d'un thermomètre de type thermocouple sont rapportés au tableau 9.

TABLEAU 9

Lapin	Poids (kg)	Température rectale avant et après injection de CB _x (°C)			
		Avant injection	1 heure après	2 heures après	3 heures après
A	2,0	38,90	38,70	38,80	38,80
B	2,0	38,90	38,90	38,97	38,97
C	2,0	39,25	39,25	39,22	39,30

Essai 9

Influence sur souris porteuses de cancer du sein

Sur des groupes de 6 souris dénudées de souche BALB/C, de 20 à 25 g on transplante par voie sous-cutanée, dans le dos, des segments carrés de 2 mm de côté de cancer du sein humain MX-1. CB_{x3} obtenu à l'exemple 26 ou 29 est administré par voie intraveineuse aux souris pendant 14 jours, à partir du 14ème jour après la transplantation. Le 15ème jour après la première administration, on mesure le volume de la tumeur primaire. Les résultats obtenus sont rapportés au tableau 10.

TABLEAU 10

Substance testée	Dose journalière	Volume de la tumeur ^{⊕1)} (cm ³)
Témoin CB _{x3} ^{⊕2)}	1 unité /kg	9,7 ± 2,2
	3 unités/kg	7,6 ± 1,3
	10 unités/kg	4,3 ± 1,3 [⊕]
CB _{x3} ^{⊕3)}	1 unité /kg	2,2 ± 0,9 ^{⊕⊕}
	3 unités/kg	7,3 ± 1,2
	10 unités/kg	4,6 ± 1,4 [⊕]
Mitomycine C	0,5 mg/kg	2,0 ± 1,0 ^{⊕⊕}
		4,4 ± 1,1 [⊕]

Notes) ⊕1) (Valeur moyenne) ± (écart type)

⊕2) CB_{x3} obtenu à l'exemple 26

⊕3) CB_{x3} obtenu à l'exemple 29

- ⊙ Statistiquement différent du groupe témoin à un niveau de signification égal ou inférieur à 5%
- ⊙⊙ Statistiquement différent du groupe témoin à un niveau de signification égal ou inférieur à 1%.

Essai 10

Influence sur tumeur induite par le méthylcholanthrène
 Du 3-méthylcholanthrène dissous dans de l'huile
 10 d'olive est injecté par voie sous-cutanée, latéralement, dans
 l'abdomen de groupes de 8 souris de souche ddY pesant 20 à 25 g,
 à raison de 0,5 mg par souris. CB_{X3} obtenu à l'exemple 26
 ou 29 est administré par voie intraveineuse aux souris,
 15 une fois par jour pendant 21 jours à partir du 60ème jour
 environ après l'injection de 3-méthylcholanthrène. On
 mesure le volume de la tumeur le 21ème jour suivant la
 première administration de CB_{X3}. Les résultats obtenus
 sont rapportés au tableau 11.

TABLEAU 11

20	Substance testée	Dose journalière	Volume de la tumeur ^{⊙1)} (cm ³)
	Témoin		10,5 ± 2,3
	CB _{X3} ^{⊙2)}	1 unité /kg	8,5 ± 1,4
		3 unités/kg	5,4 ± 1,4 [⊙]
25		10 unités/kg	2,5 ± 0,7 ^{⊙⊙}
	CB _{X3} ^{⊙3)}	1 unité /kg	8,9 ± 1,5
		3 unités/kg	5,1 ± 1,3 [⊙]
		10 unités/kg	2,2 ± 0,8 ^{⊙⊙}
	Mitomycine C	0,5 mg/kg	6,6 ± 1,3 [⊙]

- 30 Notes: ⊙1) (Valeur moyenne) ± (écart type)
 ⊙2) CB_{X3} obtenu à l'exemple 26
 ⊙3) CB_{X3} obtenu à l'exemple 29
 ⊙ Statistiquement différent du groupe témoin à un niveau de signification égal ou inférieur à 5%
 35 ⊙⊙ Statistiquement différent du groupe témoin à un niveau de signification égal ou inférieur à 1%

Il découle des résultats ci-dessus que CB_{X3} présente de toute évidence un effet anti-tumoral sur la tumeur spontanée.

Essai 11Test de toxicité (administration ~~unique~~)

5 A des souris mâles de souche BDF₁ de 20 à 25 g, réparties en groupes de 10 animaux chacun, on administre CB par voie intraveineuse et on note la mortalité des animaux pendant 7 jours. Résultat: les 10 animaux ont tous survécu sans présenter de variation de poids corporel et d'état général, même après administration de 10.000 unités/kg de CB_X, CB_{X1} ou CB_{X2}, ou 100.000 unités/kg de CB_{X3}.

10 Essai 12

Test de toxicité (administration continue pendant 30 jours)

15 A des souris mâles de souche BDF₁ de 20 à 25 g, réparties en groupes de 10 animaux chacun, on administre CB par voie intraveineuse pendant 30 jours, et on observe le nombre d'animaux morts, ainsi que les variations du poids corporel et de l'état général. Les animaux sont pesés entre 9 et 10 heures du matin, et l'examen de l'état général est effectué le 10ème, le 20ème et le 30ème jour, conformément au protocole opératoire d'Arvien (Science, 20 Vol. 36, 123 (1962)). Résultat: pendant ces 30 jours, la mortalité est nulle lorsqu'on administre 1.000 unités/kg/jour de CB_X, CB_{X1} ou CB_{X2}, ou 10.000 unités/kg/jour de CB_{X3}, et le courbe de gain de poids est plus ou moins la même que celle du groupe témoin. En outre, l'état général 25 s'avère être normal, comme celui du groupe témoin.

Il découle des essais décrits ci-dessus que CB supprime sélectivement la croissance des cellules tumorales et, en outre, il y a non seulement une suppression remarquable des métastases cancéreuses, mais également une très 30 grande efficacité d'action sur diverses tumeurs avec encore une grande sécurité, même à des doses supérieures à la dose à laquelle se manifesterait l'effet pharmaceutique. Il s'ensuit que CB est très précieux pour le traitement de diverses tumeurs comme le cancer de l'estomac, 35 le cancer du poumon, l'hépatome, le cancer du colon, le cancer du sein, le cancer de l'utérus, la leucémie, etc..

CB peut être administré sous la forme de préparations classiques, par exemple d'injections, de gouttes pour les yeux, de gouttes nasales, d'inhalations, de préparations topiques, de préparations administrables par voie orale, rectale, vaginale, etc.. La posologie de CB chez l'adulte n'est pas particulièrement limitée du fait de sa grande sécurité d'emploi, mais, d'une façon générale, elle est de 0,5 à 500.000 unités et de préférence de 0,5 à 5.000 unités pour l'application par voie topique, de 20 à 100.000 unités pour l'administration par voie générale (par exemple par injection intraveineuse, injection intramusculaire, etc..) et de 50 à 500.000 unités pour l'administration par voie orale, la dose journalière pouvant être ajustée de façon appropriée, suivant le mode d'utilisation et la gravité de la maladie. La préparation peut contenir CB_x, CB_{x1}, CB_{x2} et CB_{x3} seuls ou en mélanges en toute proportions souhaitées.

CB peut être présenté sous forme de préparations pharmaceutiques, par tout mode opératoire classique utilisant des véhicules, bases, excipients, etc.. pharmaceutiquement acceptables. De préférence, pour l'administration par voie orale, on utilise des préparations entériques (par exemple des capsules, des comprimés, des poudres, etc.). CB peut également être présenté sous la forme de préparations administrables par voie rectale (suppositoires), d'injections (par exemple d'injections aqueuses), de préparations reconstituables de poudre lyophilisée à dissoudre dans de l'eau distillée pour injection au moment de l'utilisation, et de préparations topiques comme des pomades, des lotions, etc.. En outre, on peut utiliser CB pour la préparation de gouttes pour les yeux, de gouttes nasales, ou d'inhalations.

Comme exemples de véhicules et excipients solides utilisables avantageusement suivant l'invention, on citera des excipients courants comme le lactose, le mannitol, l'amidon de maïs et la fécule de pomme de terre; des liants comme la cellulose cristalline, des dérivés cellulosiques,

la gomme arabique, l'amidon de maïs et la gélatine; des agents de désintégration ~~comme l'amidon de maïs~~, la féculé de pomme de terre et la carbohydroxyméthylcellulose calcique; ainsi que des lubrifiants comme le talc et le stéarate de magnésium. Comme exemples de véhicules liquides utilisables avantageusement suivant l'invention, on citera l'eau distillée pour injection, le sérum physiologique, les huiles végétales pour injection, ainsi que des glycols comme le propylène glycol et le polyéthylèneglycol.

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés à titre d'illustration de l'invention.

Exemple 1

Des lymphocytes humains (2×10^{10} cellules) sont mis en suspension dans 4.000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau, et on les cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. Puis, on dialyse le liquide surnageant du milieu de culture contre un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2), et une fraction relarguée à l'aide de sulfate d'ammonium (40-80%) est obtenue à partir du dialysat. On redialyse cette fraction contre ledit tampon phosphate, puis on la soumet à une filtration sur gel en utilisant Sephadex G-100 (Pharmacia Co.). On recueille une fraction ayant une masse moléculaire de 12.000 à 17.000, désignée fraction CB_x brute, tandis que la fraction éluee antérieurement est désignée fraction CBF brute. On adsorbe la fraction CB_x brute sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine (Maruzen Oil Co.), on élue à l'aide d'un tampon phosphate 0,01 M contenant du fucose (0,5M). Après élimination du fucose par dialyse, on adsorbe à nouveau CB_x sur le Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine, puis on élue par la méthode des gradients en utilisant un tampon phosphate (pH 7,2), obtenant ainsi du CB_x purifié. On obtient au total 0,02 mg de CB_x. L'activité totale du CB_x obtenu est de 150 unités telle que déterminée par la méthode décrite ci-dessus. C'est ainsi que l'activité spécifique du CB_x purifié est de 7.500 unités/mg.

Exemple 2

On met des lymphocytes de bovins (2×10^9 cellules) en suspension dans 1000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1 afin de purifier CB_X et on obtient 0,01 mg de CB_X. L'activité totale du CB_X obtenu est de 20 unités; l'activité spécifique du CB_X purifié est ainsi de 2.000 unités/mg.

Exemple 3

On met des lymphocytes de souris (5×10^{10} cellules) en suspension dans 5.000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1 afin de purifier CB_X, et on obtient 0,12 mg de CB_X. L'activité totale du CB_X obtenu est de 400 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 3.333 unités/mg.

Exemple 4

On met des cellules BALL-1 (lignée cellulaire humaine, 1×10^{10} cellules), qui ont été pré-cultivées, en suspension dans 2.000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau, et on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin de purifier CB_X, et on obtient 0,7 mg de CB_X. L'activité totale du CB_X obtenu est de 4.000 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 5.714 unités/mg.

Exemple 5

On met des cellules Flow 7000 (lignée de fibroblastes humaine, 3×10^9 cellules), qu'on a fait croître par culture cellulaire, en suspension dans 600 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau, et on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂

et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin de purifier CB_X , et on obtient 0,005 mg de CB_X .

L'activité totale du CB_X obtenu est de 10 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 2.000 unités/mg.

Exemple 6

On met des lymphocytes humains (2×10^{10} cellules) en suspension dans 4.000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de phytohémagglutinine (Difco Co.) à une concentration finale de 50 $\mu\text{g/ml}$, on cultive à 37°C pendant 48 heures, dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin de purifier CB_X , et on obtient 1,0 mg de CB_X . L'activité totale du CB_X obtenu est de 10.000 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 10.000 unités/mg.

Exemple 7

On met des cellules Flow 7000 (lignée de fibroblastes humains, 3×10^9 cellules) en suspension dans 600 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de phytohémagglutinine à une concentration finale de 50 $\mu\text{g/ml}$, on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin de purifier CB_X , et on obtient 60 μg de CB_X . L'activité totale du CB_X obtenu est de 480 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 8.000 unités/mg.

Exemple 8

On met des cellules TALL-1 (lignée cellulaire humaine, 9×10^9 cellules) qu'on a fait croître par culture cellulaire, en suspension dans 800 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de phytohémagglutinine à une concentration finale de 50 $\mu\text{g/ml}$, on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère conte-

nant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin de purifier CB_X, et on obtient 0,8 mg de CB_X. L'activité totale du CB_X obtenu est de 7.500 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 9.375 unités/mg.

Exemple 9

On soumet des souris adultes à un traitement préalable en les irradiant avec des rayons-X d'environ 400 REM afin de supprimer leur réponse immune, puis on les soumet à une transplantation sous-cutanée de cellules TALL-1 (origine humaine). On alimente ensuite les souris pendant 3 semaines. On isole la masse tumorale formée dans le tissu sous-cutané, pesant environ 10 g, on la broie et on la dissocie dans du sérum physiologique contenant de la trypsine, et on recueille les cellules dispersées. On traite ces cellules suivant le mode opératoire de l'exemple 1, afin d'obtenir CB_X. Le rendement en CB_X est d'environ 190 unités par souris.

Exemple 10

On met des cellules BALL-1 (lignée cellulaire humaine, 9 x 10⁹ cellules) en suspension dans 1.800 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de 9 x 10⁶ pfu (unités formatrices de plaque) de virus Sendai (HVJ), on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin de purifier CB_X, et on obtient 720 µg de CB_X. L'activité totale du CB_X obtenu est de 7.920 unités, l'activité spécifique du CB_X purifié étant ainsi de 11.000 unités/mg.

CB_X obtenu ci-dessus est dissous dans une solution saline physiologique à une concentration de 1 mg/ml, et le pouvoir rotatoire spécifique de la solution à 598 nm (Na-ligne D) a été mesuré comme étant de 26,5 à 28,5° à l'aide d'un polarimètre (Nihon Bunko DIP-181) en utilisant une microcellule de 10 mm sur le trajet lumineux. Le pouvoir rotatoire spécifique de la solution saline physiologique utilisée comme témoin, a été posé comme étant de 0. CB_X est lévogyre.

CB_X (10/ μ g) obtenu ci-dessus est mis sous forme d'une pastille avec de la poudre de bromure de potassium pour déterminer le spectre IR de CB_X . La mesure intégrée (60 fois) a été effectuée par un spectrophotomètre à infrarouge par transformation de Fourier (Analect Instruments Co). Le résultat est donné à la Fig 1.

Exemple 11

On soumet des souris dénudées à une transplantation sous-cutanée de cellules BALL-1 (d'origine humaine), puis on les alimente pendant 3 semaines. On isole ensuite les masses tumorales résultantes, formées dans le tissu sous-cutané, pesant environ 10 g chacune, on les broie, puis on les dissocie dans du sérum physiologique contenant de la trypsine, et on recueille ensuite les cellules dispersées. On lave ces cellules à l'aide de milieu de Eagle contenant 5% de sérum humain, puis on met 2×10^9 de ces cellules en suspension dans 2.000 ml du même milieu et on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin d'obtenir CB_X . Le rendement en CB_X est d'environ 200 unités par souris nue.

Exemple 12

On met des cellules JBL (lignée cellulaire humaine) en suspension dans du sérum physiologique, puis on introduit la suspension dans une chambre de diffusion cylindrique en matière plastique ayant une capacité d'environ 10 ml, qu'on munit d'un filtre à membrane à pores d'environ 0,5 micron, et on place cette chambre dans la cavité péritonéale d'un rat adulte. On alimente le rat pendant 4 semaines, puis on retire la chambre.

La concentration cellulaire en cellules humaines ainsi obtenue est d'environ 5×10^9 cellules par ml, ce qui représente environ 10^3 fois ou plus que le résultat obtenu par culture in vitro dans un milieu nutritif dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air.

On met au total 1×10^{10} des cellules JBL, obtenues par le mode opératoire décrit ci-dessus, en suspension dans 4.000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère

contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 1, afin d'obtenir CB_x. Le rendement en CB_x est d'environ 350 unités par rat.

5 Exemple 13

On soumet des souris dénudées adultes à une transplantation sous-cutanée de cellules BALL-1 (d'origine humaine), puis on les alimente pendant 5 semaines. On soumet ensuite chaque souris à une injection intrapéritonéale de
10 1 mg de phytohémagglutinine, on sacrifie les animaux 24 heures après l'injection, et on recueille le liquide d'ascite qu'on centrifuge à 4°C et 1.000 G. On dialyse le liquide surnageant obtenu contre du sérum physiologique contenant un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2), pendant 15
15 heures. On soumet ensuite la solution à une ultrafiltration en utilisant un filtre à membrane et on concentre le filtrat, obtenant ainsi une solution contenant CB_x. La quantité de CB_x est d'environ 8.000 unités par souris dénudées.

20 Exemple 14

On met des cellules NALL-1 (lignée cellulaire humaine) en suspension dans du sérum physiologique et on verse dans une chambre de diffusion cylindrique en matière plastique ayant une capacité de 10 ml environ qu'on munit d'un
25 filtre à membrane ayant des pores de 0,5 micron environ, et on introduit cette chambre dans la cavité péritonéale d'un rat adulte. On alimente ce rat pendant 4 semaines, puis on retire la chambre. On lave les cellules qu'on a ainsi fait croître, à l'aide de milieu de Eagle contenant
30 5% de sérum humain, et on remet en suspension dans le même milieu, à une concentration cellulaire d'environ 5×10^6 cellules par ml. On additionne la suspension d'environ 200 µg/ml de phytohémagglutinine et on fait incuber le mélange à 37°C pendant 2 jours, afin d'induire la production de
35 CB_x. CB_x ainsi produit est purifié et concentré comme décrit à l'exemple 1 et on le lyophilise, obtenant ainsi CB_x sous forme pulvérulente. Le rendement en CB_x est d'environ 15.000 unités par rat.

Exemple 15

40 En opérant comme décrit à l'exemple 6, on cultive des

lymphocytes humains et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture afin d'obtenir une fraction purifiée ayant une masse moléculaire de 70.000 à 90.000. On désigne cette fraction CB_{X1} . L'activité totale du 0,1 mg de CB_{X1} purifié est de 5.000 unités, l'activité spécifique du CB_{X1} purifié étant ainsi de 50.000 unités/mg.

Le pouvoir rotatoire spécifique de CB_{X1} obtenu ci-dessus est mesuré comme indiqué à l'exemple 10, CB_X est dextrogyre.

La détermination du spectre IR de CB_{X1} obtenu ci-dessus a été obtenue comme décrit à l'exemple 10. Le spectre est donné à la Fig.2.

Exemple 16

En opérant comme décrit à l'exemple 10, on cultive des cellules BALL-1, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture afin d'obtenir un CB_{X1} purifié. L'activité totale des 100 μ g de CB_{X1} purifié obtenus est de 4.200 unités, l'activité spécifique du CB_{X1} purifié étant ainsi de 42.000 unités/mg.

Exemple 17

En opérant comme décrit à l'exemple 7, on cultive des cellules Flow 7000, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 10 μ g de CB_{X1} purifié. L'activité totale du CB_{X1} obtenu est de 250 unités, l'activité spécifique du CB_{X1} purifié étant ainsi de 25.000 unités/mg.

Exemple 18

En opérant comme décrit à l'exemple 2, on cultive des lymphocytes de bovins et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 0,002 mg de CB_{X1} purifié. L'activité totale du CB_{X1} obtenu est de 14 unités, l'activité spécifique du CB_{X1} purifié étant ainsi de 7.000 unités/mg.

Exemple 19

En opérant comme décrit à l'exemple 4, on cultive des cellules BALL-1, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 0,2 mg de CB_{X1} purifié. L'activité totale du CB_{X1} obtenu est de 2.300 unités, l'activité spécifique du CB_{X1} purifié étant ainsi de 11.500 unités/mg.

Exemple 20

En opérant comme décrit à l'exemple 6, on cultive des lymphocytes humains, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi une fraction purifiée
5 ayant une masse moléculaire de 40.000 à 50.000. On désigne cette fraction CB_{X2}. L'activité totale du 0,25 mg obtenu est de 5.200 unités, l'activité spécifique du CB_{X2} purifié étant ainsi de 20.800 unités/mg.

Exemple 21

10 En opérant comme décrit à l'exemple 10, on cultive des cellules BALL-1, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 75 µg de CB_{X2} purifié. L'activité totale du CB_{X2} obtenu est de 10.000 unités, l'activité spécifique du CB_{X2} purifié étant ainsi de
15 133.333 unités/mg.

Le pouvoir rotatoire spécifique de CB_{X2} obtenu ci-dessus est mesuré comme indiqué à l'exemple 10. CB_X est dextrogyre.

La détermination du spectre IR de CB_{X2} obtenu ci-dessus a été obtenue comme décrit à l'exemple 10. Le spectre est donné à
20 la Fig.3.

Exemple 22

En opérant comme décrit à l'exemple 7, on cultive des cellules Flow 7000, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 20 µg de CB_{X2} purifié.
25 L'activité totale du CB_{X2} obtenu est de 500 unités, l'activité spécifique du CB_{X2} purifié étant ainsi de 25.000 unités/mg.

Exemple 23

30 En opérant comme décrit à l'exemple 2, on cultive des lymphocytes de bovins, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 0,001 mg de CB_{X2} purifié. L'activité totale du CB_{X2} obtenu est de 40 unités, l'activité spécifique du CB_{X2} purifié étant ainsi de 40.000 unités/mg.

Exemple 24

En opérant comme décrit à l'exemple 4, on cultive des cellules BALL-1, et on purifie le liquide surnageant du milieu de culture, obtenant ainsi 0,25 mg de CB_{X2} purifié.

L'activité totale du CB_{X2} obtenu est de 2.900 unités, l'activité spécifique du CB_{X2} purifié étant ainsi de 11.600 unités/mg.

Exemple 25

5 On met des lymphocytes humains (2×10^{10} cellules) en suspension dans 4000 ml de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de phytohémagglutinine à une concentration de 50 µg/ml, on cultive la suspension à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5%
10 de CO₂ et 95% d'air. On dialyse ensuite le liquide surnageant du milieu de culture contre un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2) et, à partir du dialysat, on obtient une fraction par relargage à l'aide de sulfate d'ammonium à 40-80%. On dialyse à nouveau cette fraction contre ledit tampon
15 phosphate, puis on la soumet à une filtration sur gel en utilisant du Sephadex G-100, obtenant ainsi une fraction ayant une masse moléculaire de 7.000 à 9.000 qui est désignée fraction CB_{X3} brute.

On adsorbe la fraction CB_{X3} brute sur Sephalose associée à de la phytohémagglutinine, et on élue à l'aide de
20 tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2) contenant de la N-acétyl-D-galactosamine (0,5 M). Après élimination de la N-acétyl-D-galactosamine par dialyse, on fait passer la solution résultante sur carboxyméthylcellulose équilibrée à l'aide
25 d'un tampon phosphate 0,05 M (pH 6,4), puis on élue à l'aide de tampon phosphate 0,05 M (pH 6,4) contenant du chlorure de sodium (0,5 M). On obtient ainsi 0,1 mg de CB_{X3}. L'activité totale du CB_{X3} obtenu est de 5.000 unités.

Exemple 26

30 On soumet des hamsters nouveaux-nés à un traitement préalable par injection d'anti-sérum préparé sur des lapins de façon classique, afin de réduire leurs réponses immunes autant que possible, et on les soumet ensuite à une transplantation sous-cutanée de cellules BALL-1, puis on les
35 alimente pendant 3 semaines. On isole les masses des tumeurs formées dans le tissu sous-cutané, pesant environ 15 g, on les broie et on les dissocie dans du sérum physiologique. Après lavage des cellules obtenues à l'aide de

milieu de Eagle exempt de sérum, on met 1×10^{11} de ces cellules en suspension dans 150 litres de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de 9×10^6 pfu de virus Sendai (HVJ), on cultive à 37°C pendant 48 heures dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On dialyse le liquide surnageant du milieu de culture contre un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2) et, à partir du dialysat, on obtient une fraction par relargage à l'aide de sulfate d'ammonium à 40-80%. On dialyse à nouveau cette fraction contre le même tampon phosphate, puis on la soumet à une filtration sur gel en utilisant du Sephadex G-100, obtenant ainsi une fraction ayant une masse moléculaire de 7.000 à 9.000, désignée fraction CB_{X3} brute. On adsorbe cette fraction CB_{X3} brute sur Sephalose associée à conga-valine A, et on élue à l'aide d'un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2) contenant du α-méthyl-D-mannoside (0,5 M). Après avoir éliminé le α-méthyl-D-mannoside par dialyse, on fait passer la solution sur carboxyméthylcellulose équilibrée à l'aide d'un tampon phosphate 0,05 M (pH 6,0), puis on élue à l'aide d'un tampon phosphate 0,05 M (pH 7,8). L'activité totale des 0,2 ml de CB_{X3} obtenus est de 12.000 unités, et son point isoélectrique est de 6,3 à 7,8.

Exemple 27

On met des cellules Flow 7000 (3×10^{10} cellules) en suspension dans 1,0 litre de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau et, après addition de phytohémagglutinine à une concentration finale de 50 µg/ml, on cultive à 37°C pendant 48 heures, dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air. On soumet le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 26, afin de purifier le CB_{X3}, et on obtient 0,1 mg de CB_{X3}. L'activité totale du CB_{X3} obtenu est de 3.100 unités.

Exemple 28

On met des lymphocytes de bovins (5×10^{10} cellules) en suspension dans 10 litres de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau, et on cultive à 37°C pendant 48 heures, dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et 95% d'air.

On soumet ensuite le liquide surnageant du milieu de culture aux opérations décrites à l'exemple 26 afin de purifier CB_{X3} , et on obtient 0,1 mg de CB_{X3} purifié. L'activité totale du CB_{X3} purifié est de 1.700 unités.

5 Exemple 29

On met des cellules BALL-1 (5×10^{11} cellules), qu'on a fait croître par culture cellulaire, en suspension dans 100 litres de milieu de Eagle contenant 10% de sérum de veau, et on cultive à 37°C pendant 48 heures, dans une
 10 atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air. On dialyse le liquide surnageant du milieu de culture contre un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2), et on obtient une fraction, par relargage à l'aide de sulfate d'ammonium à 40-80%. On dialyse à nouveau cette fraction contre ledit tampon phosphate
 15 puis on la soumet à une filtration sur gel en utilisant du Sephadex G-100, obtenant ainsi une fraction ayant une masse moléculaire de 7.000 à 9.000. On adsorbe cette fraction sur Sephalose associée à de la phytohémagglutinine, et on élue à l'aide d'un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2)
 20 contenant de la N-acétyl-D-galactosamine (0,5 M). Après élimination de la N-acétyl-D-galactosamine par dialyse, on fait passer la solution dialysée sur de la carboxyméthyl cellulose équilibrée à l'aide de tampon Tris 0,05 M (pH 8,0), puis on élue à l'aide de tampon Tris 0,05 M (pH 8,0)
 25 contenant du chlorure de sodium (0,5 M), obtenant ainsi 0,1 mg de CB_{X3} purifié. L'activité totale du CB_{X3} obtenu est de 8.200 unités, et son point isoélectrique est de 8,0 à 9,2.

Le pouvoir rotatoire spécifique de CB_{X3} obtenu ci-dessus
 30 est mesuré comme décrit à l'exemple 10. CB_{X3} n'a aucun pouvoir rotatoire.

Le spectre IR de CB_{X3} obtenu ci-dessus est déterminé comme à l'exemple 10. Le spectre est fourni à la Fig. 4.

Exemple 30 (Injections aqueuses)

35 CB_X 100.000 unités
 Chlorure de sodium 9 g
 Eau distillée pour
 injection, q.s. pour faire 1.000 ml

On pèse et mélange le CB_x et le chlorure de sodium, on dissout dans 500 ml d'eau distillée pour injection, et on amène le volume total à 1.000 ml à l'aide d'eau distillée pour injection. On filtre cette solution aqueuse en milieu stérile, en utilisant un filtre à membrane, et on introduit 2 ml de filtrat dans une série de récipients stérilisés en verre qu'on scelle, afin d'obtenir des injections aqueuses.

Exemples 31 à 33

10 On procède comme décrit à l'exemple 30, pour préparer des injections aqueuses, contenant respectivement CB_{x1}, CB_{x2} et CB_{x3}.

Exemple 34 (Injections lyophilisées)

15	CB _x	100.000 unités
	Albumine de sérum humain à 20%	10 ml
	Chlorure de sodium	9 g
	Eau distillée pour injection, q.s. pour faire	1.000 ml

20 On pèse et mélange le CB_x et le chlorure de sodium, puis on dissout dans une solution obtenue en ajoutant la quantité prédéterminée de l'albumine humaine à 500 ml d'eau distillée pour injection, et on amène le volume total à 1.000 ml à l'aide d'eau distillée pour injection. On filtre cette solution en milieu stérile, à l'aide d'un

25 filtre à membrane, et on introduit des portions aliquotes de 2 ml de filtrat dans des récipients stérilisés, en verre, on lyophilise et on scelle, afin d'obtenir une poudre lyophilisée pour injection.

Exemples 35 à 37

30 On opère comme décrit à l'exemple 34 pour préparer des poudres lyophilisées pour injection, respectivement à partir de CB_{x1}, CB_{x2} et CB_{x3}.

Exemple 38 (Gouttes pour les yeux)

35	CB _x	100.000 unités
	Chlorure de sodium	5 g
	Chlorobutanol	5 g
	Eau distillée pour injection q.s. pour faire	1.000 ml

On pèse les ingrédients ci-dessus et on les dissout dans 950 ml d'eau distillée pour injection. On amène le volume

total à 1.000 ml, et on filtre la solution en milieu stérile, en utilisant une membrane à filtre, afin d'obtenir une préparation utilisable ~~comme~~ gouttes pour les yeux.

Exemples 39 à 41

- 5 On opère comme décrit à l'exemple 38 pour préparer des préparations utilisables en gouttes pour les yeux contenant, respectivement, CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3}.

Exemple 42 (Suppositoires)

	CB _X	100.000 unités
10	Polyéthylène glycol 1500	250 g
	Polyéthylène glycol 4000	environ 750 g
		<hr/>
		1.000 g

- 15 On pèse les ingrédients ci-dessus et on mélange soigneusement tout le CB_X et le polyéthylène glycol 1500 avec 500 g du polyéthylène glycol 4000, après quoi on ajoute le restant du polyéthylène glycol 4000 afin d'obtenir un poids total de 1.000 g, on mélange soigneusement et on présente sous la
- 20 forme de suppositoires de 5.000 mg, utilisables par voie rectale, en procédant par fusion.

Exemples 43 à 45

On procède comme décrit à l'exemple 42 pour préparer des suppositoires (pour voie rectale) contenant respectivement CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3}.

25 Exemple 46 (Gouttes nasales)

	CB _X	100.000 unités
	Chlorure de sodium	5 g
	Chlorobutanol	5 g
	Eau distillée, q.s. pour faire	1.000 ml

- 30 On pèse les ingrédients ci-dessus, et on les dissout dans 950 ml d'eau distillée. On amène la solution résultante à un volume total de 1.000 ml à l'aide d'eau distillée, afin de préparer une solution pour gouttes nasales.

Exemples 47 à 49

- 35 On opère comme décrit à l'exemple 46, pour préparer des solutions pour gouttes nasales contenant, respectivement, CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3}.

Exemple 50 (Comprimés à enrobage entérique)

	CB _X	100.000 unités
	Lactose	64 g
	Fécule de pomme de terre	env. 30 g
5	Alcool polyvinylique	3 g
	Stéarate de magnésium	<u>3 g</u>
		100 g

On pèse respectivement les ingrédients ci-dessus; on mélange la quantité totale de CB_X et de lactose, ainsi qu'environ la moitié de la fécule de pomme de terre; puis on additionne le mélange du restant de la fécule de pomme de terre de façon à obtenir un poids total de 94 g, et on agite le mélange jusqu'à ce qu'il soit homogène. Au mélange résultant on ajoute une solution aqueuse d'alcool polyvinylique, et on prépare des granulés en faisant appel au procédé de granulation par voie humide. On sèche les granulés, on les mélange avec le stéarate de magnésium, et on les comprime en comprimés de 200 mg. On enrobe les comprimés avec du phtalate de méthyl cellulose, afin d'obtenir des comprimés à enrobage entérique.

Exemples 51 à 53

On opère comme décrit à l'exemple 50 afin de préparer des comprimés à enrobage entérique contenant, respectivement, CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3}.

25 Exemple 54 (Pommade)

	CB _X	100.000 unités
	Paraffine liquide	10 g
	Vaseline	<u>env.1.000 g</u>
		1.000 g

30 On pèse respectivement les ingrédients ci-dessus, puis on malaxe soigneusement le CB_X avec la paraffine liquide, on ajoute 500 g de la Vaseline, et on mélange soigneusement. On additionne progressivement le mélange du restant de la Vaseline, afin d'obtenir un poids total de 1.000 g, et on mélange soigneusement le mélange afin de préparer une pommade.

Exemples 55 à 57

On opère comme décrit à l'exemple 54 pour préparer des pommades contenant, respectivement, CB_{X1}, CB_{X2} et CB_{X3}.

REVENDEICATIONS

1. Une forme pratiquement purifiée d'une glycoprotéine (CB) produite par des ~~cellules~~ d'animaux à sang chaud, ayant un effet antitumoral, et présentant les propriétés suivantes:

5 (a) masse moléculaire : d'environ 7.000 à 90.000, par filtration sur gel Sephadex ou électrophorèse sur gel SDS;

10 (b) réactions colorées: présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'aide d'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique;

15 (c) aspect et solubilité: poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme;

20 (d) teneur en sucres: la teneur en sucres est de 8 à 45%, teneur dans laquelle de 6 à 28% des sucres totaux sont des hexoses, de 1 à 11% sont des hexosamines et de 1 à 6% sont des acides sialiques;

25 (e) stabilité: stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus; et

(f) cytotoxicité: endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

30 2. Une forme pratiquement purifiée d'une glycoprotéine (CB_x) suivant la revendication 1, ayant un effet antitumoral, et présentant les propriétés suivantes:

(a) masse moléculaire: de 12.000 à 17.000:

35 (b) réactions colorées: présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après

hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique;

5

(c) aspect et solubilité: poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme;

10

(d) teneur en sucres: la teneur en sucres est de 27 à 33%, teneur dans laquelle de 17 à 20% des sucres totaux sont des hexoses, de 5 à 7% sont des hexosamines et de 5 à 6% sont des acides sialiques;

(e) point isoélectrique: de 4,2 à 7,3;

15

(f) adsorbabilité: adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2);

(g) stabilité: stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus;

20

(h) cytotoxicité: endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales; et

(i) différenciation: induit une différenciation entre les cellules tumorales.

25

3. Une forme pratiquement purifiée d'une glycoprotéine (CB_{X1}) suivant la revendication 1, ayant un effet antitumoral et présentant les propriétés suivantes:

(a): masse moléculaire: de 70.000 à 90.000;

30

(b) réactions colorées: présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-

35

acide sulfurique ;

5 (c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

(d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 35 à 45%, teneur dans laquelle de 23 à 28% des sucres totaux sont des hexoses, de 8 à 11% sont des hexosamines et de 4 à 6% sont des acides sialiques ;

10 (e) point isoélectrique : de 4,3 à 6,2 ;

(f) adsorbabilité : adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,2) ;

15 (g) stabilité : stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ;

20 (h) cytotoxicité : endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

4. Une forme pratiquement purifiée d'une glycoprotéine (CB_{x2}) suivant la revendication 1, ayant un effet anti-tumoral et présentant les propriétés suivantes:

25 (a) : masse moléculaire : de 40.000 à 50.000 ;

(b) réactions colorées : présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration 30 indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique ;

35 (c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

(d) teneur en sucres ; la teneur en sucres est de 30 à 37%, teneur dans laquelle de 20 à 23% des sucres totaux sont des hexoses, de 6 à 8% sont des hexosamines et de 4 à 6% sont des acides sialiques ;

5 (e) point isoélectrique de 4,2 à 7,3 ;

(f) adsorbabilité : adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2) ;

10 (g) stabilité : stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ; et

15 (h) cytotoxicité : endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

5. Une forme pratiquement purifiée d'une glycoprotéine (CB_{X3}) suivant la revendication 1, ayant un effet anti-tumoral et présentant les propriétés suivantes:

20 (a) : masse moléculaire : de 7.000 à 9.000 ;

(b) : réactions colorées : présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique ;

25 (c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

30 (d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 8 à 15%, la teneur dans laquelle de 6 à 10% des sucres totaux sont des hexoses, de 1 à 2% sont des hexosamines et de 1 à 3% sont des acides sialiques ;

(e) adsorbabilité : adsorbable sur carboxyméthylcellulose en chromatographie d'échange d'ions dans

dans un tampon phosphate 0,05M (pH 6,4), en utilisant de la carboxyméthylcellulose ;

5 (f) stabilité : stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ;

(g) cytotoxicité : endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales ; et

10 (h) la séquence des aminoacides sur l'azote terminal de la portion protéinique est Alanine-Alanine.

6. Procédé de préparation d'une glycoprotéine (CB) ayant notamment un effet antitumoral, consistant à cultiver une source de cellules provenant d'animaux à sang chaud, et à extraire de ladite source de cellules ou d'un liquide surnageant cultivé de celle-ci une forme pratiquement purifiée d'une glycoprotéine présentant les propriétés suivantes :

15 (a) masse moléculaire : d'environ 7.000 à 90.000, par filtration sur gel Sephadex ou électrophorèse sur gel SDS ;

25 (b) réactions colorées : présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la

30 (c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

35 (d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 8 à 45%, teneur dans laquelle de 6 à 28% des sucres totaux sont des hexoses, de 1 à 11% sont des hexosamines et de 1 à 6% sont des acides sialiques ;

e) stabilité ; stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ; et

5 f) cytotoxicité ; endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

7. Procédé suivant la revendication 6, caracté-
risé en ce que la glycoprotéine (CB_X) présente les
10 propriétés suivantes :

(a) masse moléculaire : de 12.000 à 17.000:

(b) réactions colorées : présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et
15 la réaction tryptophane acide sulfurique ;

(c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

(d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 27 à 33%, teneur dans laquelle de 17 à 20% des sucres totaux sont des hexoses, de 5 à 7% sont des hexosamines et de 5 à 6% sont des acides sialiques ;

(e) point isoélectrique : de 4,2 à 7,3 ;

(f) adsorbabilité : adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2) ;

(g) stabilité : stable en solution aqueuse à pH 2,0 pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus,
35 et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ;

(h) cytotoxicité ; endommagement sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales ; et

5 (i) différenciation : induit une différenciation entre les cellules tumorales.

8. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que la glycoprotéine (CB_{X1}) présente :

(a) masse moléculaire : de 70.000 à 90.000 ;

10 (b) réactions colorées : présente une coloration indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-
15 acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique ;

20 (c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

25 (d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 35 à 45%, teneur dans laquelle de 23 à 28% des sucres totaux sont des hexoses, de 8 à 11% sont des hexosamines et de 4 à 6% sont des acides sialiques ;

(e) point isoélectrique : de 4,3 à 6,2 ;

(f) adsorbabilité : adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2) ;

30 (g) stabilité : stable en solution aqueuse à pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ;

35 (h) cytotoxicité : endommagement sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

9. Procédé suivant la revendication 6, caracté-

térisé en ce que la glycoprotéine (CB_{X2}) présente les propriétés suivantes :

- (a) : masse moléculaire : de 40.000 à 50.000 ;
- (b) réactions colorées : présente une coloration
 5 indiquant la présence de protéines dans la réaction de Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration
 10 indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique ;
- (c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon
 15 phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;
- (d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 30 à 37%, teneur dans laquelle de 20 à 23% des
 20 sucres totaux sont des hexoses, de 6 à 8% sont des hexosamines et de 4 à 6% sont des acides sialiques ;
- (e) point isoélectrique : de 4,2 à 7,3 ;
- (f) adsorbabilité : adsorbable sur Sephadex associé à Ulex europeus agglutinine dans un tampon phosphate 0,01M (pH 7,2) ;
- (g) stabilité : stable en solution aqueuse à
 25 pH 2,0, pH 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ;
- (h) cytotoxicité : endommage sélectivement les
 30 cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales.

10. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que la glycoprotéine (CB_{X3}) présente les propriétés suivantes :

- (a) : masse moléculaire : de 7.000 à 9.000 ;
- (b) réactions colorées : présente une coloration
 35 indiquant la présence de protéines dans la réaction de

Lowry, une coloration indiquant la présence de liaisons peptide et d'acides aminés dans la réaction à la ninhydrine après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, et une coloration indiquant la présence de sucres dans la réaction phénol-acide sulfurique, la réaction anthrone-acide sulfurique, la réaction indole-acide sulfurique et la réaction tryptophane-acide sulfurique ;

(c) aspect et solubilité : poudre blanche soluble dans l'eau, le chlorure de sodium aqueux et un tampon phosphate, et peu soluble dans le benzène, l'hexane et le chloroforme ;

(d) teneur en sucres : la teneur en sucres est de 8 à 15% teneur dans laquelle de 6 à 10% des sucres totaux sont des hexoses, de 1 à 2% sont des hexosamines et de 1 à 3% sont des acides sialiques ;

(e) adsorbabilité : adsorbable sur carboxyméthylcellulose en chromatographie d'échange d'ions dans un tampon phosphate 0,05M (pH 6,4) utilisant de la carboxyméthylcellulose ;

(f) stabilité : stable en solution aqueuse à pH 2,0 ph 7,0 ou pH 11,0 à 4°C pendant 24 heures ou plus, et en solution aqueuse à pH 7,0 à 60°C pendant 3 heures ou plus ;

(g) cytotoxicité : endommage sélectivement les cellules tumorales sans sensiblement endommager les cellules normales ; et

(h) la séquence des acides aminés sur l'azote terminal de la portion protéinique est Alanine-Alanine.

11. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que les sources de cellules sont choisies parmi les cellules réticulo-endothéliales, les lymphoblastes, les cellules leucémiques et les fibroblastes, lesquelles sources de cellules peuvent être des cellules non établies ou des lignées cellulaires établies.

12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que les lignées cellulaires établies sont choisies parmi BALL-1, TALL-1, NALL-1, Namalwa, M-7002, B-7101, Flow 7000, JBL, EBV-Sa, EBV-Wa, EBV-HO, BALM2 et CCRF-SB,

qui sont toutes d'origine humaine.

13. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que les lignées cellulaires établies sont choisies parmi: les cellules BALB/C 3T3 de la souris, les cellules
5 L1210 de leucémie de la souris, P388, le clone M-3 du mélanome de la souris, les cellules tumorales LLC-WRC 256 du rat, et les cellules RPMI 1846 du mélanome du rat, qui proviennent toutes d'animaux à sang chaud autres que l'homme.

10 14. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules non établies sont choisies parmi les macrophages humains et les lymphocytes humains.

15 15. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que les cellules non établies sont choisies parmi les lymphocytes et macrophages d'animaux à sang chaud autres que l'homme.

20 16. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce qu'on transplante directement des cellules d'une lignée cellulaire établie, provenant de l'homme ou d'animaux à sang chaud autres que l'homme, dans l'organisme d'animaux à sang chaud d'espèce identique ou différente et on extrait la glycoprotéine des tumeurs formées par les cellules transplantées, soit directement, soit après culture de la tumeur suivie de croissance in vitro.

25 17. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce qu'on introduit des chambres de diffusion, qui ont été inoculées à l'aide de sources de cellules provenant d'une lignée cellulaire établie d'origine humaine ou d'animaux à sang chaud autres que l'homme, dans l'organism
30 e d'animaux à sang chaud afin qu'elles soient alimentées par un fluide organique desdits animaux, on cultive lesdites sources de cellules et on extrait la glycoprotéine à partir des sources de cellules cultivées, soit directement, soit après culture suivie de croissance in vitro.

35 18. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que les sources de cellules sont exposées à l'action d'un ou plusieurs inducteurs.

19. Agent thérapeutique antitumoral, caractérisé en ce qu'il contient, à titre de principe actif, une quantité antitumorale efficace d'au moins une glycoprotéine choisie parmi les glycoprotéines CB_X , CB_{X1} , CB_{X2} et CB_{X3} ayant un effet antitumoral, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, éventuellement en association avec un véhicule ou excipient thérapeutiquement acceptable.

20. Agent suivant la revendication 19, caractérisé en ce que l'ingrédient actif est un mélange d'au moins deux glycoprotéines choisies parmi les glycoprotéines CB_X , CB_{X1} , CB_{X2} et CB_{X3} , en toute proportion souhaitée.

Fig.1

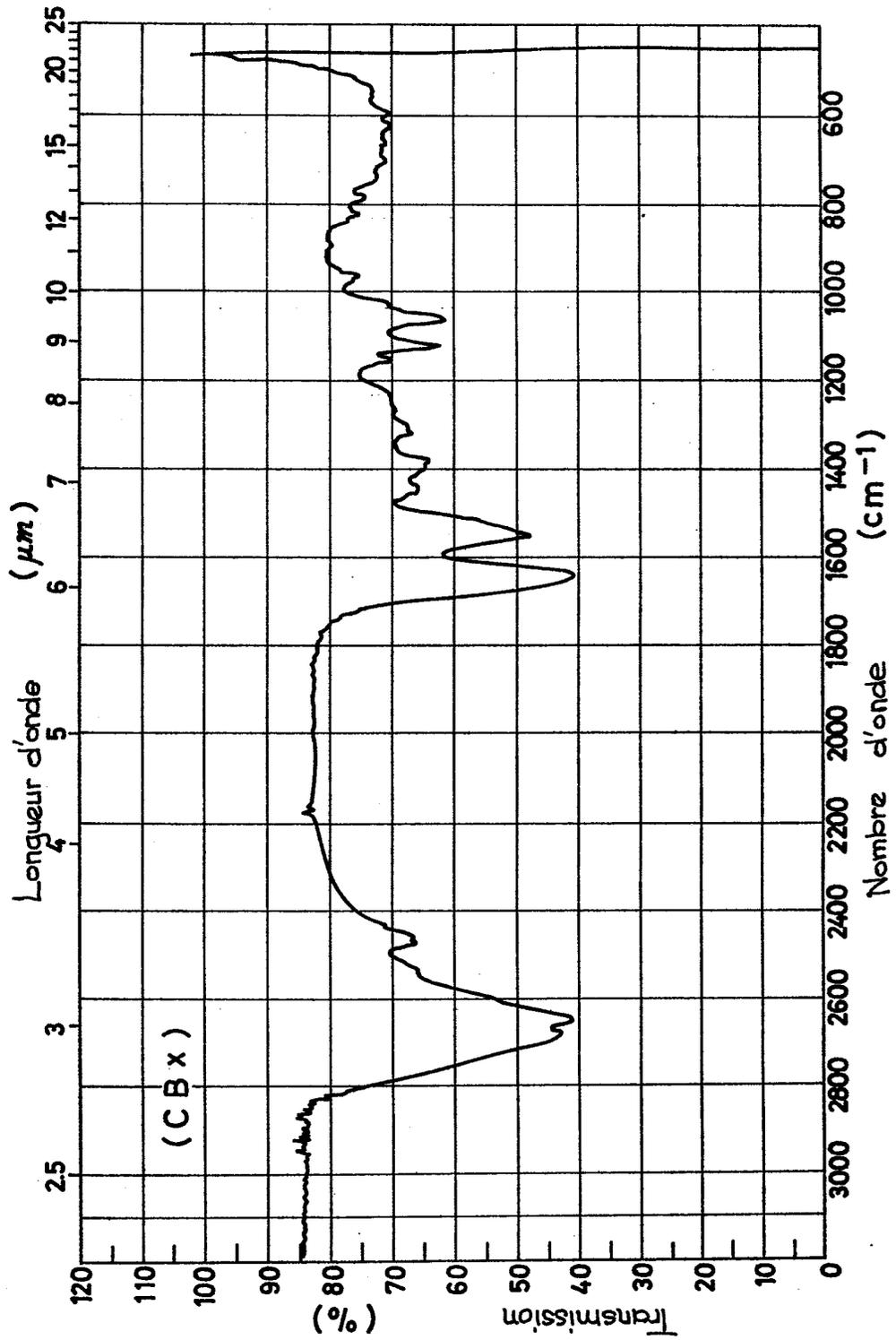


Fig. 2

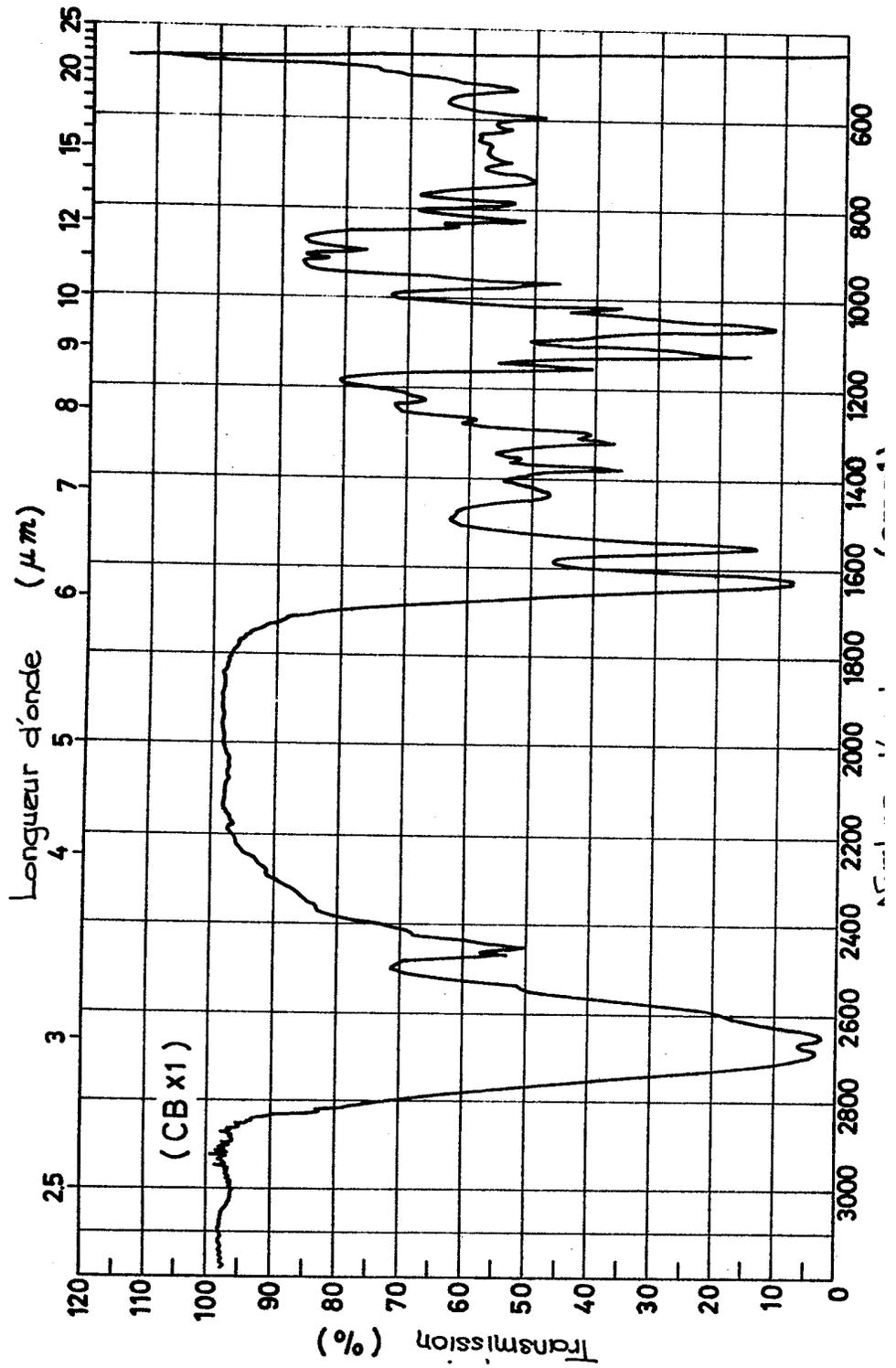
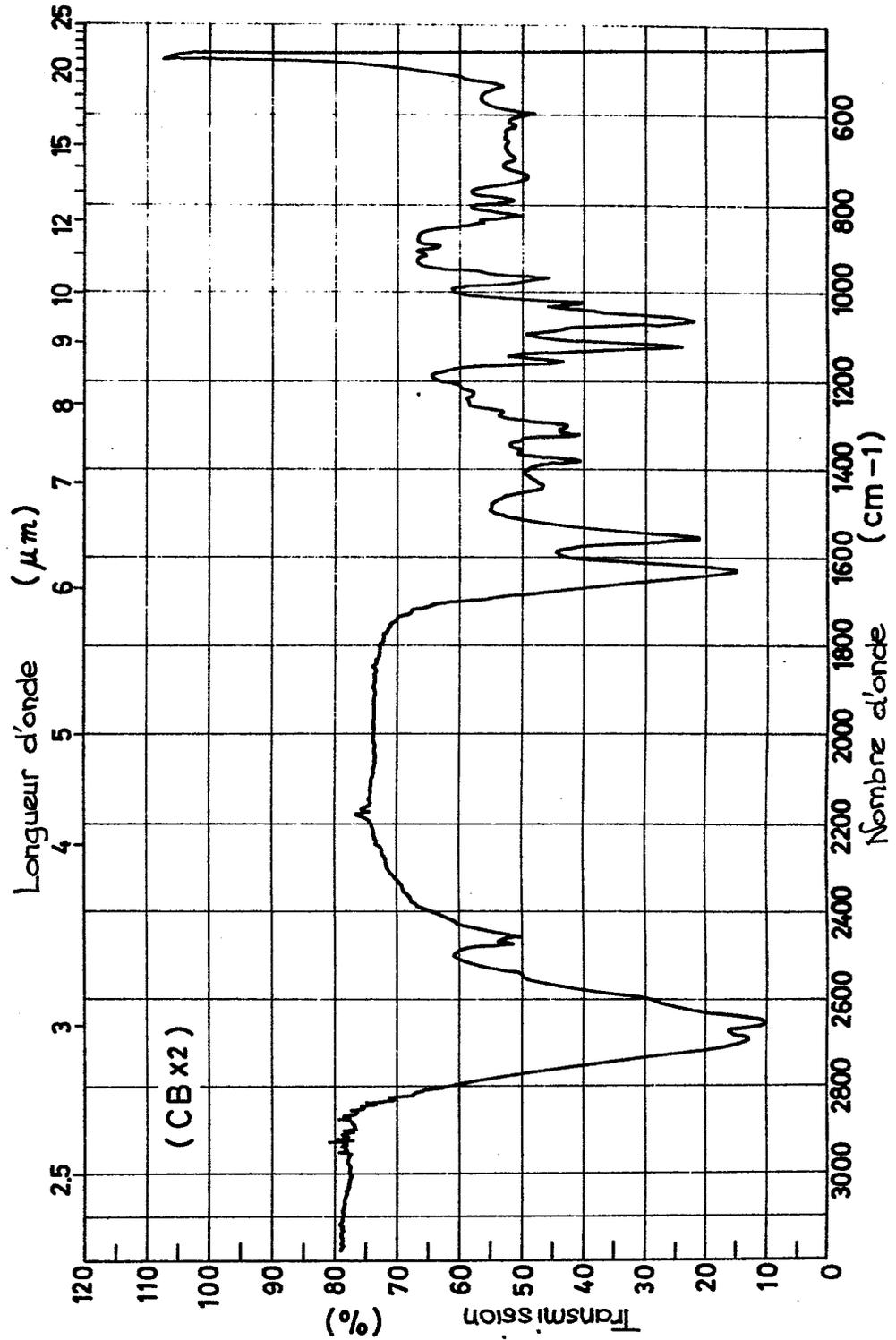


Fig. 3



4/4

Fig. 4

