

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 79 25113

(54) Nouveaux polypeptides et leur utilisation comme agents carcinostatiques et comme agents de détection et de détermination de virus.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 C 103/52; A 61 K 37/02; C 12 Q 1/04.

(22) Date de dépôt..... 9 octobre 1979.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 9 octobre 1978, n° 124.412/78.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 16 du 17-4-1981.

(71) Déposant : SUNTORY LTD, société de droit japonais, résidant au Japon.

(72) Invention de : Kumao Toyoshima, Akira Hakura, Toshihiro Nakanishi et Hajime Yoshizumi.

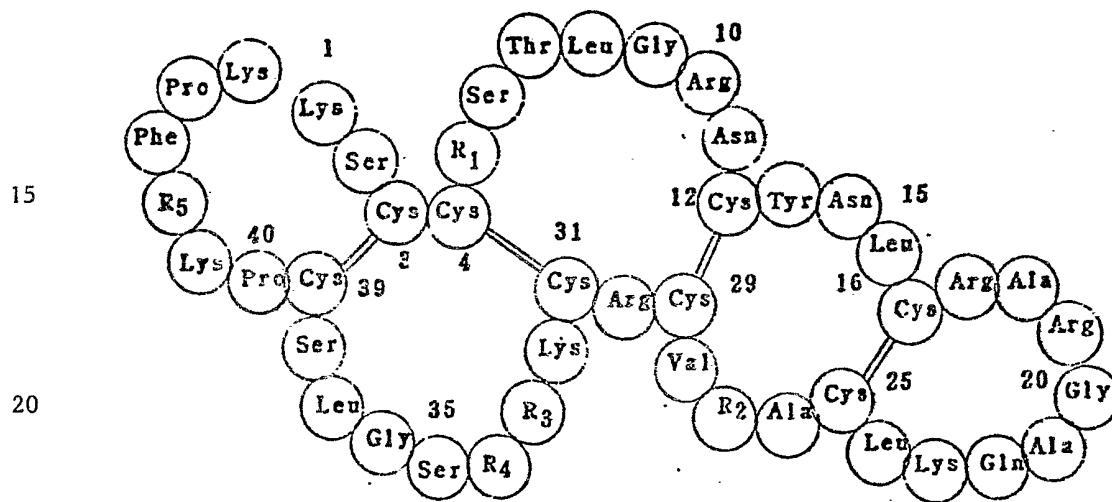
(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

La présente invention concerne certains nouveaux polypeptides et elle concerne également des agents carcinostatiques et des agents servant à la détection et à la détermination de virus, ces agents contenant les polypeptides nouveaux à titre de constituants actifs.

5 Plus particulièrement, l'invention concerne des agents carcinostatiques ainsi que des agents de détection et/ou de détermination de virus, agents qui contiennent les deux types suivants de polypeptides nouveaux répondant à la formule générale ci-après (formule structurale primaire) :

10



25

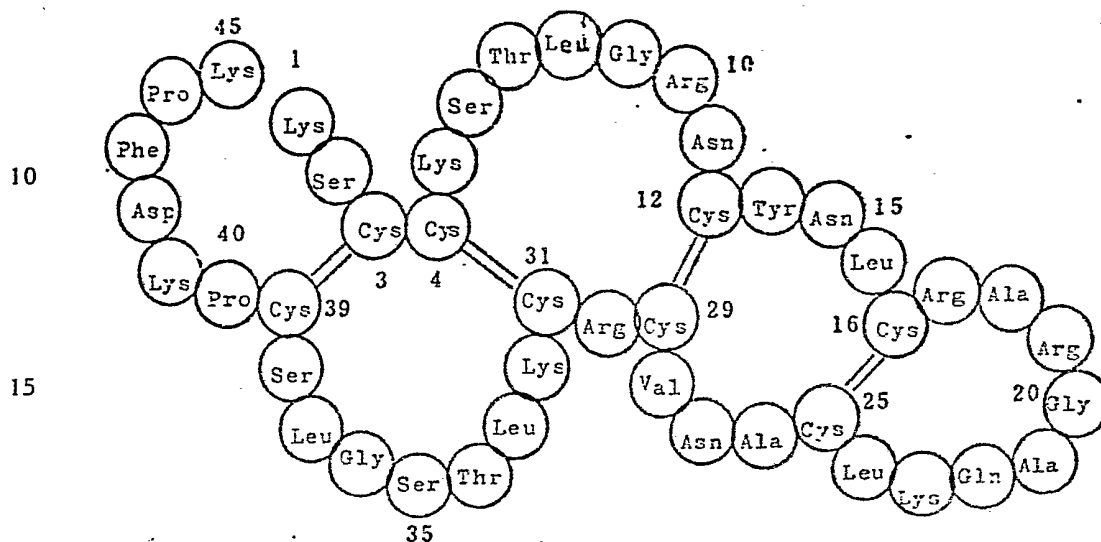
dans laquelle les symboles "Ala", "Arg", "Asn", "Cys", "Gln", "Gly", "Leu", "Lys", "Phe", "Pro", "Ser", "Thr", "Tyr" et "Val" indiquent respectivement les restes de formes lévogyres de l'alanine, arginine, asparagine, 1/2
 30 cystine, glutamine, glycine, leucine, lysine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine et valine et dans laquelle les radicaux R_1 à R_5 désignent (1) les restes des L-aminoacides respectifs suivants :

35 R_1 : lysine
 R_2 : asparagine
 R_3 : leucine
 R_4 : thréonine
 R_5 : acide aspartique

ou (2) R_1 représente l'arginine, R_2 et R_5 représentent la glycine, R_3 représente l'isoleucine et R_4 représente la sérine. Les symboles " — "
 40 représentent les liaisons -S-S- et, en outre, les chiffres arabes apparais-

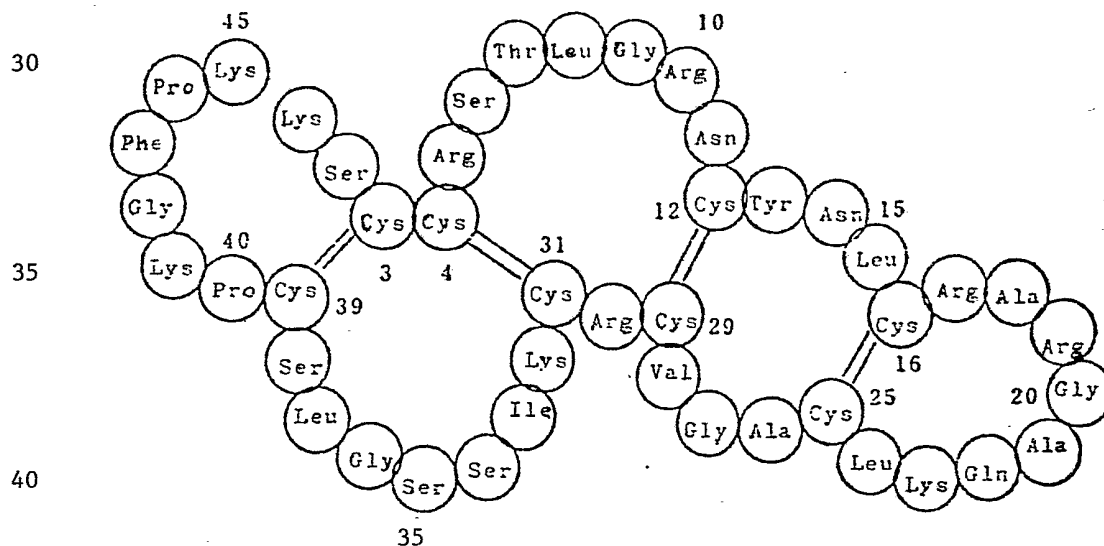
sant dans la formule structurale à côté de certains restes d'acides aminés désignent la séquence de ces acides aminés en partant du N terminal.

Le premier analogue des nouveaux polypeptides selon l'invention (qu'on désignera ci-après "SP₁") est constitué de quarante cinq restes d'acides aminés et répond à la formule structurale primaire ci-après :



dans laquelle tous les symboles désignant les restes d'acides aminés respectifs sont les mêmes que ci-dessus. Cet analogue présente une structure tétracyclique particulière en ce qu'il est prévu quatre liaisons disulfure de pontage entre chaque paire de molécules de cystéine, lesdites paires étant présentes entre les 3ème et 39ème, 4ème et 31ème, 12ème et 29ème, et 16ème et 25ème positions, respectivement.

Le second analogue des polypeptides nouveaux selon l'invention (qu'on désignera ci-après "SP₂") comprend également 45 fragments d'acides aminés et répond à la formule structurale primaire ci-après :



dans laquelle tous les symboles désignant les restes d'acides aminés respectifs sont les mêmes que ci-dessus. Cet analogue présente également une structure tétracyclique particulière en ce qu'il comporte des pontages constitués par des liaisons disulfure de la même façon que l'analogue SP₁.

- 5 Ces deux analogues peuvent être caractérisés par les paramètres physiques et chimiques suivants :

(SP₁) :

Aspect : cristaux aciculaires incolores

Point isoélectrique : pH de 10 environ

- 10 Poids moléculaire (PM) :

4 913 calculé à partir des séquences d'acides aminés, mais le PM est en outre estimé comme ayant une valeur d'environ 5 500 selon un procédé d'équilibre de sédimentation. Pour obtenir cette dernière détermination, on dissout l'échantillon dans un tampon 0,05 M de tris-HCl contenant de la guanidine. HCl (6M) de manière à atteindre une concentration de 1 à 5 mg/ml et la mesure étant effectuée à 17 600 tours/minute à l'aide d'une ultracentrifugeuse Spinco Modèle E (Beckman Co)

Nombre de fragments d'acides aminés : 45

- 20 Séquence d'acides aminés :
- | | | |
|--|----|----|
| | 5 | 10 |
| Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Ser-Thr-Leu-Gly-Arg- | | |
| | 15 | 20 |
| Asn-Cys-Tyr-Asn-Leu-Cys-Arg-Ala-Arg-Gly- | | |
| | 25 | 30 |
| Ala-Gln-Lys-Leu-Cys-Ala-Asn-Val-Cys-Arg- | | |
| | 35 | 40 |
| Cys-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Leu-Ser-Cys-Pro- | | |
| | 45 | |

Lys-Asp-Phe-Pro-Lys

- 30 Les abréviations et les chiffres ont la même signification que précédemment.

Analyse élémentaire :

	C	H	N	S
Calculé (%)	49,56	6,84	19,07	5,21
Trouvé (%)	49,32	6,94	18,92	5,34

- 35 Spectre d'absorption U.V. (Figure 3) :

On observe une absorption caractéristique due aux peptides à proximité de 278 nm. On mesure des échantillons de 2 mg/ml à l'aide du spectrophotomètre à deux ondes et à double faisceau fabriqué par Hitachi (Type 356).

- 40 Spectre d'absorption I.R. (Figure 4) :

On observe une absorption caractéristique due aux peptides à proximité de $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ (mesurée par un spectrophotomètre à réseau I.R. fabriqué par Hitachi).

Composition en Aminoacides :

Les résultats sont indiqués dans le tableau 1. On hydrolyse les échantillons avec du HCl 6N à 110°C dans un tube hermétique dans lequel a été établi le vide et on effectue la mesure à l'aide d'un analyseur d'acides aminés (type JLC 5 AH de Nippon Denshi Co., Ltd.)

TABLEAU 1

	Aminoacides	Proportion molaire (trouvée)	Nombres entiers les plus proches (nombre de fragments d'acides aminés présumés)
5			
10			
15	AsX(Asp+Asn)	4,02	4
	Thr	1,94	2
	Ser	4,00	4
20	GLX(Glu+Gln)	1,01	1
	Pro	2,11	2
	Gly	3,11	3
	Ala	3,12	3
	1/2 Cys	-	8 *
25	Val	0,88	1
	Met	0,00	0
	Ile	0,00	0
	Leu	4,76	5
	Tyr	-	1 *
30	Phe	1,01	1
	Lys	6,08	6
	His	0,00	0
	Arg	4,11	4
	Trp **	0,00	0

* à partir des séquences d'acides aminés

** mesuré par spectrophotométrie.

Electrophorèse sur Gel :

On observe une bande unique à la suite de l'électrophorèse à disque de polyacrylamide. On effectue cette mesure dans un gel à 7,5 %

de polyacrylamide à pH 9,4 et 4,0. On connecte l'électrode supérieure à l'anode et on effectue l'électrophorèse à 25 mA/cm² pendant 50 minutes à température ambiante. On teinte le gel avec du colorant bleu (Coomassie Brilliant Blue R) (0,02 %) et on supprime la coloration avec 10% d'acide trichloracétique.

(SP₂) :

Poids moléculaire :

4 812 (à partir du résultat des séquences d'acides aminés). Cependant on trouve un PM aux alentours de 5 500 par le procédé d'équilibre de sédimentation mettant en oeuvre une ultracentrifugeuse, comme expliqué à propos de SP₁.

Nombre de fragments d'acides aminés : 45

Séquence d'acides aminés :

5 10
 Lys-Ser-Cys-Cys-Arg-Ser-Thr-Leu-Gly-Arg-
 15 20
 Asn-Cys-Tyr-Asn-Leu-Cys-Arg-Ala-Arg-Gly-
 25 30
 Ala-Gln-Lys-Leu-Cys-Ala-Gly-Val-Cys-Arg-
 20 35 40
 Cys-Lys-Ile-Ser-Ser-Gly-Leu-Ser-Cys-Pro-
 45
 Lys-Gly-Phe-Pro-Lys

25 Les abréviations et les chiffres ont les mêmes significations que précédemment.

Analyse élémentaire :

	C	H	N	S
Calculé (%)	49,34	6,94	19,77	5,32
Trouvé (%)	49,21	6,52	19,92	4,92

30 Spectre d'absorption U.V. (Figure 3) :

On observe une absorption caractéristique due aux peptides à proximité de 278 nm.

Spectre d'absorption I.R. (Figure 4) :

35 On observe une absorption caractéristique due aux peptides à proximité de 1 600 cm⁻¹.

Composition en Acides Aminés :

Les résultats sont indiqués dans le tableau 2. On effectue l'analyse de la même manière que celle qui a été décrite pour le tableau 1.

<u>TABLEAU 2</u>			
Aminoacides	Proportion molaire (trouvée)	Nombres entiers les plus proches (nombre de radicaux restants présumés)	
5	AsX(Asp+Asn)	2,16	2
	Thr	1,10	1
	Ser	4,92	5
	Glx(Glu+Gln)	1,04	1
	Pro	2,13	2
10	Gly	4,88	5
	Ala	3,05	3
	1/2 Cys	-	8 ✕
	Val	0,84	1
	Met	0,00	0
15	Ile	0,95	1
	Leu	3,89	4
	Tyr	-	1 ✕
	Phe	1,00	1
	Lys	4,81	5
20	His	0,00	0
	Arg	4,95	5
	Trp **	0,00	0

* à partir des séquences d'acides aminés

** mesuré par spectrophotométrie.

Electrophorèse sur Gel :

On observe une bande unique à la suite de l'électrophorèse à disque de polyacrylamide.

Il est évident à l'examen de ces résultats que SP_1 et SP_2 sont très similaires l'un à l'autre, aussi bien sur le plan physique que sur le plan chimique et il en résulte que la séparation de ces deux composés à partir d'un mélange est difficile sans chromatographie à l'aide d'un absorbant à cations échangeables, comme par exemple la carboxyméthyl (CM) cellulose.

SP_1 et SP_2 ainsi que leurs analogues sont présents en des quantités importantes dans l'orge et le blé.

On va décrire ci-après un exemple de procédé pour obtenir SP. On met en suspension 4 kg de farine de blé dans 20 litres d'acide sulfurique 0,05N et on maintient à 30° C pendant 3 heures. Après enlèvement du précipité par centrifugation (3000 tours/minute, 10 minutes, température ambiante) on neutralise le liquide qui surnage avec NaOH 10N et on laisse au repos pendant 12 heures à 50° C. On enlève le précipité résultant par centrifugation et on chromatographie le surnageant sur une colonne de CM cellulose (2,5 x 80 cm) équilibrée avec un tampon phosphate 0,05 M, à pH 7,2 et avec élution à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl de 0,1 à 0,8 M dans le même tampon (700 ml dans chaque réservoir) à température ambiante. On contrôle le débit par absorption à 280 nm. On chromatographie une nouvelle fois l'éluat sur une colonne similaire (1,5 x 75 cm) et, si on désire, on lyophilise. Rendement : 120 mg.

On charge 120 mg de la matière ci-dessus séchée sur une colonne de CM cellulose (3,1 x 33 cm) tamponnée avec une solution 0,2 M de bicarbonate d'ammonium et on élue avec un gradient d'une solution de bicarbonate d'ammonium de 0,2 à 0,8 M à une vitesse de 66 ml/hr. On fractionne l'éluat en fragments de 13 ml, chacun étant contrôlé par absorption à 280 nm. On recueille ainsi deux types de fractions d'absorption, les fractions N° 63 à 75 et N° 80 à 89, respectivement.

Les exemples suivants, présentés en références aux dessins annexés, servent à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée, dessins dont :

- la figure 1 est un graphique montrant le nombre de cellules en fonction de la durée de culture (en heures) pour les cellules à l'état d'inhibition de contact ;

- la figure 2 A représente un graphique des poids corporels des souris en fonction du nombre de jours après l'inoculation ;

- la figure 2 B est un graphique montrant le nombre de souris ayant survécu en fonction du nombre de jours après l'inoculation ;

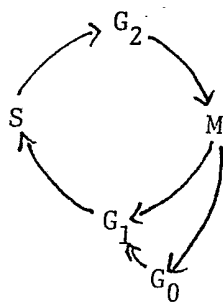
- la figure 3 représente les spectres U.V. de SP_1 et SP_2 ; et

- la figure 4 représente les spectres I.R. de SP_1 et SP_2 .

L'un des objectifs principaux de l'invention est d'utiliser les nouveaux polypeptides décrits ci-dessus comme agents carcinostatiques et comme agents de détection et de détermination de virus.

On a déjà découvert que certains peptides acides provenant de certains microorganismes possèdent des propriétés antitumorales. Par exemple, Beerman et al (1977) ont indiqué récemment que la néocarzinostatine, dont la séquence d'acides aminés a été déterminée par Meinhofer et al (1972), agit comme inhibiteur contre la division des cellules par liaison aux doubles chaînes DNA des cellules suivie d'un sectionnement de la chaîne.

D'autre part, on a constaté que les cellules de tumeurs sont différentes des cellules normales en ce qui concerne certaines caractéristiques. Comme facteur le plus caractéristique des cellules de tumeurs, on peut faire remarquer la diminution de l'aptitude d'inhibition de contact et la variation des membranes des cellules, en même temps que d'autres symptômes. Par exemple, la différence entre les cellules de tumeurs et les cellules normales peut être constatée par une culture in vitro. Dans le cas des cellules normales, la croissance des cellules s'arrête une fois qu'elles se sont développées et ont pris une disposition monolamellaire sur une surface intérieure inférieure du plateau ; au contraire, dans le cas des cellules de tumeurs, la croissance des cellules ne s'arrête pas mais se poursuit sans aucune limitation au-delà du stade monolamellaire sans s'arrêter à ce dernier stade. Plus précisément, l'une des particularités caractéristiques des cellules de tumeurs est leur croissance illimitée. On peut donc présumer que dans les cellules de tumeurs, on remarque un cycle récurrent de croissance des cellules qui est différent de celui des cellules normales et, par conséquent, au cours de la croissance des cellules de tumeurs on observe le cycle suivant :



G_1 : phase préparatoire pour synthèse de DNA (phase de pré-synthèse de DNA)

S : phase de synthèse de DNA

5 G_2 : stade préparatoire pour la segmentation (phase de post-synthèse de DNA)

M : phase de segmentation

G_0 : phase stagnante de segmentation;

10 Ce cycle passe incontestablement par la phase de synthèse de DNA.

Ensuite, comme expliqué par Ben-Or et al (Nature, 188, 1200, 1961) et par d'autres chercheurs, dans la surface d'une membrane de cellule (couche superficielle), la surface change du point de vue de la densité de la charge et devient fortement chargée négativement à mesure de la croissance des cellules hépatiques. Contrairement à ce qu'il vient d'être dit, la cause de 15 l'augmentation de la densité de la charge à la surface des cellules de tumeurs peut être considérée comme une accélération de la fonction multiplicatrice (surtout de la fonction de synthèse de DNA).

La transformation des cellules normales en cellules de tumeurs 20 peut être provoquée par un virus plutôt que par des facteurs physio-chimiques tels que les substances chimiques, les rayons U.V., les radiations etc.. De même, dans les cellules qui sont devenues des cellules de tumeurs à la suite d'une infection par un virus de tumeur, on constate en général que sa charge à la surface devient plus négative et que la structure superficielle change 25 jusqu'à un état dans lequel les cellules subissent une forte multiplication, en d'autres termes, un état analogue à celui de la phase 5 dans le cycle cellulaire. En fait, on a détecté la présence de certaines substances carcinos- tiques qui apparaissent basées sur ces caractéristiques des cellules de tumeurs. Pour citer une substance typique parmi les substances indiquées, la 30 poly-DL-lysine (degré moyen de polymérisation de 240) possède une action carcinostatique reconnue.

A la suite des recherches effectuées par les demandeurs et axées sur l'action physiologique des polypeptides nouveaux SP_1 et SP_2 (qu'on désigne d'une façon générale par "SP"), comme précédemment expliqué, lesdits composés 35 étant isolés des grains de blé et leur structure chimique étant déterminée de la façon décrite plus haut, on a trouvé que ce SP agit d'une façon spéciale et sélective sur les cellules animales à la phase S (phase de synthèse de DNA) et tue lesdites cellules, tout en faisant preuve d'une faible action contre d'autres cellules à un stade quelconque autre que la phase S. En parti- 40 culier, ce SP n'agit pas contre les cellules normales à l'état d'inhibition

de contact.

De nombreuses cellules comprenant des tissus d'origine animale peuvent être considérées comme étant dans la phase G₀. Ainsi alors que le SP selon l'invention est fatal pour les cellules dans la phase de segmentation (cellules de tumeurs) dans les corps vivants, on remarquera que cette substance n'affecte pas les cellules normales à l'état d'inhibition de contact. En conséquence, une nouvelle découverte des demandeurs concerne des protéines basiques possédant la propriété d'agir très sélectivement et d'une façon très spéciale sur les cellules qui sont dans un état spécial et de les tuer afin d'arrêter ou d'inhiber toute nouvelle croissance des tumeurs.

Plus précisément, SP montre son fort pouvoir destructeur de cellules uniquement contre les cellules dans la phase de multiplication. En général, étant donné qu'on savait parfaitement qu'il existe une similitude entre la multiplication des cellules de tumeurs et celles des cellules animales, le fait que SP soit fatal pour les cellules dans la phase S fournit tout d'abord la perspective d'une utilisation de cette substance en qualité d'agent antitumoral ayant une fonction et un mécanisme nouveaux. Comme on le verra plus loin, cette affirmation a été corroborée par des tests in vivo sur des animaux atteints de cancer. La seconde possibilité fondée sur ce qui précède est l'utilisation de cette substance comme agent de détection et de détermination de virus.

A l'heure actuelle on utilise la culture des virus avec des cellules animales et végétales pour de nombreuses recherches et buts pratiques, comme par exemple l'isolement d'un virus, des études concernant ses propriétés, la fabrication des vaccins, le traitement prophylactique et curatif des maladies à virus etc.. Cependant, pour effectuer une telle recherche et un tel développement, une exigence préalable et impérative consiste à pouvoir détecter et/ou déterminer avec exactitude et commodément la nature du virus.

Les moyens utilisés dans ce but sont les suivants :

- 1) Procédé dans lequel on mesure la dégénération cellulaire visible des cellules infectées par un virus, à titre de paramètre (dégénération cellulaire).
- 2) Procédé par phénomène d'hémoagglutination, provoqué par mélange des érythrocytes avec des cellules infectées par le virus (procédé d'hémoagglutination).
- 3) Procédé par phénomène d'interférence entre une cellule infectée par un virus et d'autres virus ; les infections provoquées par ces derniers virus sont inhibées (procédé d'interférence).
- 4) Procédé avec un antisérum particulier qui est spécifiquement actif sur un virus particulier (procédé d'antisérum).
- 5) Procédé d'un changement métabolique des cellules provoqué par les

infections par virus, (mesure du changement métabolique).

6) Procédé par microscopie directement ou après coloration (procédé microscopique).

Parmi ces procédés, le procédé (1) est le plus répandu mais il
5 existe de nombreux virus qui ne sont pas détectables par cette méthode, comme
par exemple, le virus de leucémie murine (Mo-Mu LV). En outre, même si certains
virus sont détectables d'une façon ou d'une autre selon les procédés 1 à 6,
ces procédés sont, dans la pratique, difficiles à appliquer car, ou bien le
jugement fourni n'est pas clair et n'est pas concluant ou bien les techniques
10 utilisées sont trop fastidieuses. Ainsi, de nombreux perfectionnements ont
déjà été proposés. Par exemple, Rowe et al [Virology, 42, 1136 - 9 (1970)] ont
cultivé des cellules infectées avec Mo-LuLV ci-dessus avec des cellules
d'embryon de souris (ME), puis ils ont arrêté la croissance par irradiation
par des rayons U.V. et ils ont fait suivre cette opération d'une culture avec
15 des cellules XC (cellules de tumeurs de rats cancérisés par des souches en
plaquettes du virus de sarcome de Raus), le dernier stade consistant à mesurer
le nombre de plaquettes ainsi formées après coloration. Cette mesure est une
utilisation de la propriété spéciale des cellules XC, ces cellules formant
aisément un syncytium avec le virus développé par les cellules infectées avec
20 le virus et, par conséquent, il s'agit en quelque sorte d'une détection et détermination
indirectes (titrage) du virus. De ce fait, il est inévitable que l'objet
d'une telle mesure soit limité de façon naturelle à un virus spécial qui forme
un syncytium par comparaison avec un procédé de mesure directe tel que le
procédé de dégénération cellulaire. En variante, on utilise partiellement le
25 procédé d'anti-sérum pour une telle mesure mais la préparation de l'anti-sérum
est très fastidieuse et prend beaucoup de temps. De plus, ces procédés ne sont
applicables qu'à des virus spécifiques. Pour toutes ces raisons, il existe
un besoin sérieux de mettre au point un procédé de détection et de titrage de
virus, procédé qui serait plus commode, plus exact et plus universel pour
30 constituer un guide fiable dans l'étude des virus.

Ce problème a été résolu par la présente invention qui consiste à
appliquer la caractéristique remarquable indiquée plus haut de SP qui est fatal
aux cellules infectées par les virus, à la réalisation de l'objectif recherché.

On remarquera que le virus de leucémie des souris dont il a été
35 question plus haut ne produit pas un effet de cysto-dégénération sur les cellules
réceptrices. Plus précisément, il s'agit d'un exemple dans lequel la
détection directe classique ou le titrage des virus par l'effet de cysto-dégénération
n'est pas applicable, étant donné que rien ne différencie les cellules
infectées par les virus des cellules non infectées lorsqu'on utilise un examen
40 microscopique, la synthèse de DNA etc.. Cependant, à la suite des essais

effectués par les demandeurs, il est maintenant clair que lorsqu'on applique le SP aux cellules à l'état d'inhibition de contact, par exemple aux cellules A₃₁ (un clone dérivé de BLAB/C de souris), seules les cellules infectées par le virus sont tuées alors que les cellules saines (non infectées) ne sont nullement affectées et aussi que cette action fatale sélective est presque quantitative. Ce résultat est en conformité avec celui trouvé par la mesure des cellules XC selon Rowe (procédé des plaquettes XC). En outre, étant donné que le nombre des virus initiaux est calculé à partir du nombre de syncytiums formés par diffusion des cellules XC dans ce procédé des plaquettes XC, il est naturellement impossible d'isoler des cellules insensibles au virus ou les cellules non infectées car ce sont des cellules vivantes (les cellules initiales sont devenues statiques par suite de l'irradiation par des rayons U.V. et en outre, des cellules XC ont été ajoutées à la culture).

Cependant, selon les moyens préconisés consistant à ajouter directement SP à la culture, le procédé devient beaucoup plus simple en premier lieu et, en outre, il présente un avantage certain en ce que les cellules survivantes (survie due à l'insuffisance de la quantité de virus, la mutation des cellules, etc..) peuvent être utilisées pour de nombreuses études étant donné que les cellules débarrassées de l'infection fatale sont toujours vivantes. En conséquence, si la quantité de virus (c'est-à-dire le nombre de virus individuels) est suffisante on peut l'appliquer avantageusement à l'isolement des cellules ayant subi une mutation, lesdites cellules subissant une mutation en raison de leur sensibilité au virus ou bien le virus subissant une mutation au cours de la multiplication des cellules. Dans ces conditions, en utilisant l'agent SP selon l'invention, on peut fournir des moyens nouveaux et efficaces pour étudier les virus, comme suit :

(I) On peut détecter et titrer un virus qui est négatif à la dégénération cellulaire simplement à partir d'un mélange de ce virus et de cellules réceptrices. Ce procédé est simple, car il est le même que l'isolement d'un virus qui est positif à la dégénération cellulaire à partir d'un mélange de ce virus et de cellules réceptrices.

(II) Il devient possible de détecter et d'isoler des cellules qui ont perdu leur sensibilité au virus.

Comme il a déjà été décrit en détails, le fait que SP possède une action particulière contre les cellules animales lors de la phase de synthèse de DNA et contre les cellules infectées par le virus ou des cellules transformées, constitue la base d'utilisation de cette substance comme agent carcinostatique. Cette présomption a été démontrée par des expériences in vivo contre EAC

(Carcinomes d'ascite d'Ehrlich), les sarcomes 180A et la leucémie lymphocyti-
que L 1210 de la souris. Plus précisément on constate une inhibition marquée
contre la multiplication des cellules de tumeurs d'EAC par un dosage de 1 à
2,5 mg/kg de SP. En outre, un effet visible de survie contre le sarcome 180A
5 et la leucémie lymphocyti- que L 1210 a été constaté avec un dosage de 0,5 à
3 mg/kg de SP.

Ci-après, on va décrire des faits expérimentaux typiques à partir
desquels les découvertes ci-dessus ont été principalement déduites, ainsi que
les études de toxicité aiguë de SP. En outre, étant donné que les effets et
10 les comportements de SP₁ et SP₂ sont pratiquement identiques, les données et
les faits concernant SP₁ sont également applicables à SP₂ dans la description
suivante.

(1) Action particulière de SP sur le cycle cellulaire animal.

(1-a) (Matières expérimentales)

15 Cellules : Cellule A₃₁ (clone dérivé de BALB/C (souche) de souris)
Milieu de culture : NEM d'aigle avec addition de 10 % de sérum de
foetus bovin.

Agent : SP qui a été utilisé sous forme d'une solution de sel de
tamponnement au phosphate (PBS).

20 (1-b) Procédé expérimental.

Pour synchroniser le cycle des cellules, on soumet les cellules A₃₁
à une incubation préliminaire de manière à provoquer l'inhibition de contact.
On traite ensuite, une partie des cellules avec de la trypsine et on étale un
nombre fixe de cellules sur des plaquettes en matière plastique. On ajoute
25 ensuite l'agent dans un rapport de 4 ou 6 μ g pour 1 ml du milieu toutes les
4 heures et on mesure respectivement de temps en temps les nombres de cellules
vivantes (différenciées par coloration), la synthèse de DNA et le nombre de
cellules de métaphases.

En outre, au cours de cet essai, on effectue la mesure de la quanti-
30 té de DNA à chaque stade du cycle cellulaire à l'aide d'un compteur à scintil-
lations (Beckman Type LS 350). On effectue cette mesure de DNA en ajoutant
0,3 μ ci de (3H)-thymidine par plaquette, en titrant l'absorption de thymidine
dans les 4 heures à l'aide d'un compteur à scintillations et en comparant avec
la quantité de thymidine synthétisée. On calcule le nombre de cellules vivantes
35 après coloration avec 0,05 ml de rouge neutre à 8 % par plaquette, en dispersant
avec de la trypsine, en mettant en suspension dans PBS et en calculant le
nombre de cellules colorées (en considérant les cellules colorées comme des
cellules vivantes) à l'aide d'une table de calcul Türk-Bürker.

(1-c) (Résultat)

40 Le résultat de cette expérience apparaît sur la figure 1. Comme

on peut le voir sur la figure, l'addition de 6 ou 12 $\mu\text{g/ml}$ de SP aux cellules pendant la phase de synthèse de DNA après 12 heures depuis la suppression de l'inhibition de contact provoque la mort des cellules testées mais sans influencer les cellules dans la phase G_1 n'ayant pas atteint le laps de 12 heures à partir du moment de la suppression de l'inhibition de contact. L'action de SP devient faible contre les cellules à la phase G_2 ou M, cellules qui ont passé par la phase S. Au contraire, on doit remarquer que la mort des cellules qui sont en inhibition de contact ne se produit pas du tout. De ce résultat, il devient évident que SP présente un comportement spécial contre les cellules à la phase S et tue ces cellules.

Ordinairement, lors de la multiplication cellulaire, quatre phases telles que $G_1 - S - G_2 - M$ sont répétées, mais les cellules viennent en contact

les unes avec les autres à la suite de cette multiplication et peuvent ainsi prendre l'état d'inhibition de contact. Ainsi, on peut présumer que SP n'influe pas sur les cellules normales mais attaque sélectivement les cellules de tumeurs pendant la phase S. Ce fait suggère en outre que SP est utilisable comme un inhibiteur particulier contre le cycle cellulaire et, de même, comme un agent biologique, c'est-à-dire un agent de synchronisation pour la culture des cellules.

(2) Action de SP contre les cellules transformées.

(2-a) Matières expérimentales.

Cellules A_{31} (déjà citées), LP_{14} , PV_4 (résultat de la transformation de A_{31} par le virus de polyome).

Milieu de culture : le même que dans (1-a) ci-dessus.

Agent : le même que dans (1-a) ci-dessus.

(2-b) Procédé expérimental.

On disperse $8,3 \times 10^4$ cellules individuelles par plaquette dans le milieu et en même temps on ajoute SP à raison de 2 μg par ml du culture.

On poursuit l'incubation pendant 3 jours à 37°C et on remplace ensuite le milieu de culture par un milieu nouveau. On ajoute la même quantité de SP dans le milieu et on incube pendant 4 jours. On disperse la culture finale avec de la trypsine et on met en suspension dans PBS, puis on calcule le nombre de cellules comme décrit plus haut dans (1-a).

(2-c) (Résultat)

Le résultat apparaît dans le tableau 3 ci-après :

TABLEAU 3

Cellules	Quantité de SP ajoutée (μ g/ml de milieu)		
	0	2	4
5			
Cellule normale (A_{31})	285 ⁽¹⁾ (100,0) ⁽²⁾	290 (101,8)	220 (77,2)
10			
Cellule transformée (LP_{14})	310 (100,0)	238 (76,8)	63 (20,3)

15

Notes :

(1) Nombre de cellules par plaquette ($\times 10^4$ / plaquette).

(2) les nombres qui apparaissent entre parenthèses indiquent les pourcentages numériques des cellules testées par comparaison avec le témoin sans addition de SP.

20

(3) Effet fatal sur les cellules infectées par virus

(3-a) Matières expérimentales

Cellules : les mêmes que dans (1-a)

Virus : Virus de leucémie murine (Mo-LuLV), souche Molony de souris

25

Milieu de culture : MEM d'aigle avec 5 % de sérum de fœtus bovin.

Agent : le même que (1-a) décrit plus haut.

(3-b) Procédé expérimental.

On disperse 3×10^5 cellules individuelles A_{31} dans le milieu, on infecte simultanément avec MuLV et on incube pendant 5 jours à 37°C. Après que l'inhibition de contact qui a lieu a été confirmée par voie microscopique, on ajoute à la culture 10 μ g/ml de SP et on incube pendant 4 heures de plus. On colore les cellules avec un rouge neutre (la concentration finale est de 0,4 %) et on calcule le nombre de cellules vivantes (en utilisant les cellules colorées comme paramètre des cellules vivantes) à l'aide d'une table de calcul Türk-Bürker avec comparaison avec les cellules A_{31} infectées par virus.

(3-c) (Résultat)

Le résultat apparaît dans le tableau 4 ci-après :

TABLEAU 4

5	Cellules	Nombre de cellules vivantes/plateau (3)
	Cellules normales (A_{31} - MuLV)	4×10^5
	Cellules infectées par virus (A_{31} + MuLV)	$1,8 \times 10^3$
10		
15	Note : (3) Le nombre de cellules vivantes après 4 jours depuis le traitement avec SP. Il ressort à l'évidence de ce tableau que SP attaque les cellules infectées par virus et les tue. Ce phénomène, en ce qui concerne la sensibilité accrue des cellules infectées par virus à l'action de SP, laisse penser que SP pourrait être utilisé pour plusieurs usages scientifiques tels que la discrimination des cellules infectées par virus et le titrage de la teneur en virus ou la sélection des mutants de virus ou des applications similaires.	
20	(4) Action carcinostatique sur les animaux (4-a) : (Matières expérimentales) Animaux : souris (albinos suisses)	
25	Cellules : Cellules de carcinome d'ascite d'Ehrlich (EAC) (4-b) Procédé expérimental.	
30	On partage un certain nombre de souris albinos suisses (mâles, pesant en moyenne 21,6 g et âgées de 5 à 6 semaines) en 6 groupes, dont chacun comprend 6 souris, et on inocule chaque souris par voie i.p. avec 0,1 ml de la suspension de cellules de tumeur. La suspension contient $3,5 \times 10^7$ cellules individuelles de tumeur par ml, et on la prépare en diluant une ascite avec PBS recueilli d'une souris cancérisée par EAC après 7 jours à compter de l'inoculation. A partir du jour qui suit celui de l'inoculation, on administre par voie i.p. pendant 7 jours, jour après jour, respectivement 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 et 3,0 mg/kg/0,2 ml de SP. Les ascites développées après 8 jours depuis l'inoculation sont recueillies et on calcule le rapport cellulaire (T/C %).	
35		

(4-c) Résultat

Le résultat de cette expérience est résumé dans le tableau 5.

TABLEAU 5

5	Dose d'administration de SP (mg/kg)	T/C % (nombre de cellules / souris)	Décision ⁽⁴⁾
10	0	100,0 (265 x 10 ⁶)	Témoin
	1,0	42,9 (113 x 10 ⁶)	+
	1,5	30,3 (79,7 x 10 ⁶)	++
	2,0	22,3 (58,7 x 10 ⁶)	++
	2,5	12,6 (33,2 x 10 ⁶)	++
	3,0	9,1 (24,0 x 10 ⁶)	+++

Note : (4) La décision est basée sur la norme suivante :

15	T/C %	100 - 66 : -
		65 - 41 : +
		40 - 11 : ++
		10 - 0 : +++

20 Comme il est indiqué dans ce tableau 5, il est évident que SP est hautement actif contre la croissance des cellules de tumeurs avec une dose supérieure à 2,0 mg/kg contre EAC de la souris.

(4'-a) : (Matières expérimentales)

25 Animaux : souris (souche ICR, femelle, poids moyen 23,0g, âge 5 semaines),

Cellules : Cellules de sarcome 180 A

(4'-b) : (Procédé expérimental)

30 On groupe six souris en un groupe organisé et on inocule chaque souris par voie i.p. avec 0,1 ml de la suspension des cellules de tumeur. La suspension contient 1×10^8 cellules expérimentales individuelles par ml. A partir du jour d'inoculation, on administre 5 fois par jour par voie i.p. 0,5 mg / kg de SP.

(4'-c) : Résultat

35 Le résultat apparaît sur la figure 2 annexée. Comme on peut le voir, la perte de poids corporel des souris expérimentales est faible ou même elle diminue pendant qu'on poursuit l'administration de SP mais, une fois que cette

administration est interrompue, on peut constater une augmentation brutale du poids corporel et ensuite, la mort du groupe tout entier après 31 jours à dater de la cancérisation. Au contraire, dans le groupe témoin n'ayant pas subi d'administration de SP, on constate une augmentation brutale du poids corporel et tous les animaux meurent 17 jours après la cancérisation. Il est donc évident que SP exerce un effet carcinostatique marqué contre les cellules de tumeurs de sarcome 180 A.

(5) Toxicité aiguë pour les souris

(5-a) (Matières expérimentales)

10 Animaux : souris (CF n° 1, Albinos suisse et BDF₁)

(5-b) (Procédé expérimental)

On divise les souris CF n°1 (mâles, poids moyen 26,2 g, âge 5 semaines), les souris albinos suisses (mâles, poids moyen 21,5 g, âge 5 à 6 semaines) et les souris BDF₁ (femelles, poids moyen 20,5 g, âge 5 à 6 semaines) en 4 groupes. Chaque groupe est composé de 6 souris et on injecte dans l'intérieur du péritoine de chaque souris des quantités prévues de SP en dissolution dans 0,2 ml de PBS.

(5-c) (Résultat)

Le résultat apparaît dans le tableau 6. La valeur DL₅₀ de SP semble être d'environ 3,5 mg/kg. Cette valeur semble faible (c'est-à-dire que la toxicité de SP est importante) mais elle est pratiquement la même que celle de la néocarzinostatine (constituée par 109 aminoacides), qui a déjà été utilisée dans la pratique médicale en qualité d'agent carcinostatique. En outre, étant donné que la toxicité résiduelle de SP est faible, une fois que l'administration est arrêtée, l'état ultérieur des souris survivantes est tout à fait similaire à celui des souris normales, c'est-à-dire qu'on ne constate aucune toxicité chronique.

En outre, en prenant en considération les découvertes indiquées, la dose appropriée de SP n'a pas besoin de dépasser 2,5 mg/kg et on préfère une valeur de 0,3 à 1,0 mg/kg par jour. Une telle dose peut être divisée en plusieurs prises pour une administration à long terme.

TABLEAU 6

5	CF N°1 (5)			Albinos-Suisse (6)			BDF (7)		
	Quantité réelle (mg)	mg/kg de poids corporel	Nombre de souris mortes	Quantité réelle (mg)	mg/kg de poids corporel	Nombre de souris mortes	Quantité réelle (mg)	mg/kg de poids corporel	Nombre de souris mortes
10	0,065	2,48	0/6	0,044	2,05	0/6	0,040	1,95	0/6
	0,85	3,24	2/6	0,066	3,07	3/6	0,060	2,93	1/6
	0,105	4,01	4/6	0,088	4,09	5/6	0,080	3,90	3/6
	0,125	4,77	6/6	0,110	5,12	6/6	0,100	4,88	6/6

15

Notes : (5) DL_{50} : 3,63 mg/kg(6) DL_{50} : 3,15 mg/kg(7) DL_{50} : 3,74 mg/kg

20 (6) Action de SP contre des cellules infectées par virus et des cellules non infectées.

(6-a) (Matières expérimentales)

Cellules : Cellules A_{31} (clone dérivé de BALB/C de souris)

Virus : Mo-MuLV (Virus de leucémie de souris, de la souche Molony)

25 Milieu de culture : MEM d'aigle avec 5 % de sérum de foetus bovin.

Agent : le même que dans (1-a) (mélange de SP_1 et SP_2)

(6-b) (Procédé expérimental)

30 On disperse 3×10^5 cellules individuelles A_{31} par litre, on infecte par addition d'une quantité suffisante de MuLV et on incube ensuite pendant 5 jours à 37° C. Après confirmation microscopique de l'apparition de l'inhibition de contact, on ajoute 10 μ g/ml de SP au milieu. Après 4 heures, on colore les cellules avec un rouge neutre (concentration finale 0,4 %), on disperse dans la trypsine et on calcule sur une table de calcul Türk-Bürker en considérant les cellules colorées comme vivantes par comparaison avec les cellules A_{31} non infectées.

35

(6-c) Résultat

Le résultat apparaît dans le tableau 7.

TABLEAU 7

	Nombre de cellules vivantes/plaquette [*]
5 Cellules normales (-MuLV) Cellules A₃₁ infectées par virus (+MuLV)	4,0 x 10⁵ (témoin) 1,8 x 10³
10 Note : [*] Le nombre de cellules vivantes après 4 heures avec traitement par SP. Il ressort de ce tableau que SP attaque d'une façon très particulière les cellules infectées par virus et les tue. (7) Mesures de la quantité de virus. (7-a) (Matières expérimentales)	
15 Cellules : A₃₁ (les mêmes que dans 1-a) Cellules XC (cellules de tumeur de rat cancérisées par une souche en plaquettes de virus de sarcome de Raus. Virus : MuLV (le même que dans 1-a) Milieu de culture : MEM d'aigle (le même que dans 1-a)	
20 Agent : Le même que dans 1-a. (7-b) (Procédé expérimental) On dilue le virus progressivement de 10¹ à 10⁹ fois et on ajoute ensuite chaque produit de dilution sur les plaquettes respectives comportant 5 x 10⁴ cellules individuelles A₃₁. On effectue l'incubation pendant 5 heures.	
25 Après confirmation de l'inhibition de contact, on disperse les cellules avec de la trypsine et on divise ensuite en trois parties égales, puis on incube à 37° C pour provoquer une inhibition de contact. On répète les stades ci-dessus à deux reprises afin de provoquer l'infection totale de toutes les cellules. Aux plaquettes des cellules qui sont à l'état d'inhibition de contact qu'on obtient de cette façon, on ajoute 10 µg/ml (concentration finale) de SP et on colore les cellules avec du rouge neutre après 24 heures afin de calculer le nombre de cellules vivantes comme dans l'essai 1.	
30 On effectue également un essai parallèle selon le procédé des plaquettes de XC. Pour effectuer cet essai, on immobilise les cellules qui sont en état d'inhibition de contact, soit par irradiation avec des rayons U.V. soit par addition de mitomycine C dans un rapport de 5 à 10 µg/ml à la plaquette. On ajoute ensuite 2 à 4 x 10⁶ cellules individuelles de XC à chaque plaquette. Après 20 heures, on fixe les cellules avec du méthanol et on colore par le procédé de Gimsa, de manière à calculer le nombre de plaquettes formées. 40 (7-c) (Résultat)	

Le résultat est indiqué dans le tableau 8.

TABLEAU 8

5	Degré de dilution du virus (10^{-n}) (n=)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Pas d'addition (Témoin)
	Nombre de cellules dans échantillon traité par SP ($\times 10^4$ /plaquette) (A)	7,2	5,5	0,75	24,3	43,0	42,5	49,0	43,8	46,0	31,5
10	Nombre de cellules dans échantillon non traité au SP ($\times 10^4$ /plaquette) (B)	34,3	33,8	24,5	28,3	56,3	41,5	45,5	34,8	44,8	33,3
	A : B (A/B)	0,21	0,16	0,03	0,86	0,76	1,27	1,08	1,26	1,03	0,95
15	Procédé des plaquettes XC	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-

Il ressort de ce tableau que dans les régions où le degré de dilution du virus est inférieur à 10^{-4} , on constate une baisse soudaine du nombre des cellules vivantes. Ce fait indique la présence de cellules infectées par les virus qui sont hautement sensibles au SP. Plus précisément, dans ce cas, la quantité de virus avant dilution peut être présumée comme étant d'environ 1×10^{-4} /ml et cette présomption est en accord avec le résultat obtenu par le procédé des plaquettes XC. En outre, selon cette utilisation de SP, les techniques sont très simples car il suffit de 4 heures pour les mesures et, en outre, le résultat apparaît quantitativement. Ce procédé est donc beaucoup plus pratique que le procédé connu des plaquettes XC.

La présente invention est fondée sur les découvertes indiquées et son essence est l'utilisation de SP comme agent carcinostatique et comme agent de détection et de détermination de virus. Quand on utilise ce SP comme agent carcinostatique, on peut l'employer sous forme unitaire de SP_1 ou SP_2 pur ou brut ou encore sous forme d'un mélange de ceux-ci. On peut réaliser l'administration de SP par injection, par exemple intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée ou par voie orale, par exemple sous forme d'une solution, de comprimés, de granules, de dragées, de pastilles, etc... ou bien encore par une administration percutanée, comme par exemple des suppositoires d'introduction dans le vagin ou dans l'anus, ou enfin sous forme d'un onguent dermique. Pour injection, il est évidemment préférable de purifier le SP autant qu'il est possible. Pour les compositions pharmaceutiques, on peut commodément utiliser

des véhicules quelconques, des diluants, des liants, des épaississeurs et d'autres véhicules pharmaceutiquement acceptables, qu'on peut commodément utiliser pour préparer des produits pharmaceutiques, lorsqu'on effectue des préparations de SP. Des véhicules non toxiques tels que des graisses
5 liquides conviennent pour préparer des suspensions de SP aux fins d'injection.

On peut convertir SP en un sel d'addition d'acide en utilisant un acide physiologiquement acceptable tel que l'acide chlorhydrique, bromhydrique, maléïque, fumarique, lactique, citrique, malique, tartrique, succinique, glutarique, etc...

10 D'une façon générale, le dosage approprié de SP est de 0,5 à 2,0 mg/kg de poids corporel par jour mais il est évident que la détermination de la dose n'est pas définitive et qu'on peut varier les dosages selon le procédé et/ou la forme d'administration.

D'autre part, si l'on utilise le SP comme agent de détection ou de
15 détermination de virus, la concentration appropriée est d'environ 5 à 20 µg/ml du milieu de culture. Cependant, dans ce cas encore, la concentration optimale doit être finalement fixée selon la nature du virus.

Si la concentration est trop faible, il devient impossible de tuer entièrement les cellules infectées par le virus. Si la concentration est trop
20 élevée, les cellules saines restantes (les cellules non infectées) vont être affectées de façon fatale.

Outre les usages mentionnés, le polypeptide selon l'invention est utilisable comme un éliminateur contre ce qu'on appelle les porteurs de virus qui sont présents à l'état latent, comme par exemple le virus de papillome de
25 lapin, le virus de la grippe, le virus de la fièvre jaune, le virus de la rougeole, le virus de la grippe porcine provenant de *Paragonimus westermani* et similaires.

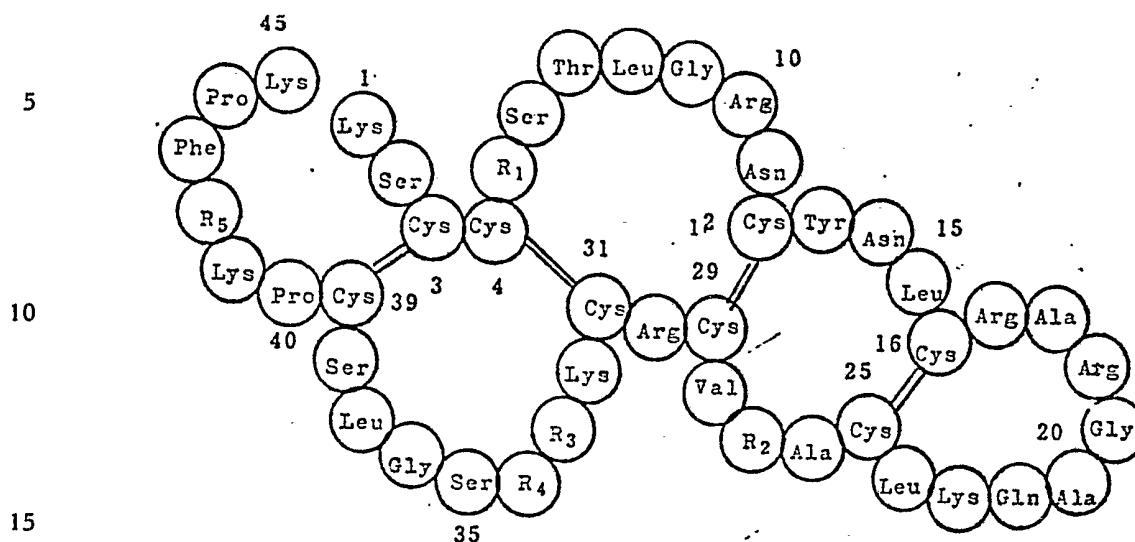
SP, qui est le constituant principal de l'agent selon l'invention forme une solution aqueuse stable. Il est donc commode de l'utiliser sous forme
30 d'une préparation aqueuse avec ou sans autres constituants comprenant un milieu synthétique pour la culture ou l'incubation du virus.

Les figures 1 et 2 décrites plus haut au sujet des essais 1 et 4' représentent respectivement (1) le comportement de SP contre chaque stade des cellules A₃₁ et (2) l'effet de survie ainsi que l'effet contre une augmen-
35 tation du poids corporel des souris cancérisées par multiplication des cellules de tumeur avec le sarcome 180 A (A étant la montée et la descente du poids moyen du corps et B étant le pourcentage de survie). Les figures 3 et 4 ont déjà été décrites.

Il va de soi qu'on peut apporter diverses modifications aux modes de
40 mise en oeuvre qui ont été décrits, sans sortir pour cela du cadre de l'invention.

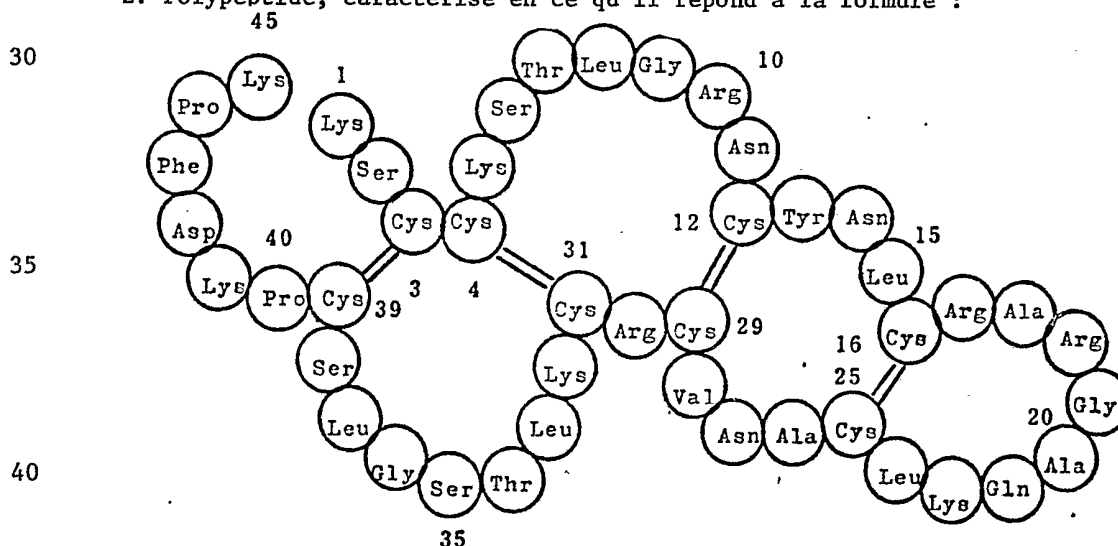
REVENDECATIONS

1. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



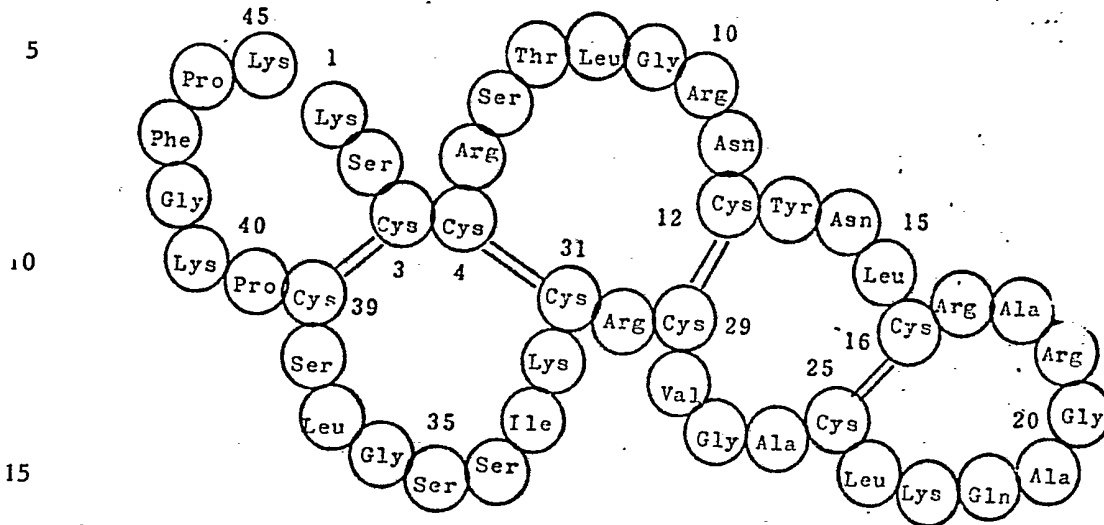
dans laquelle les symboles "Ala", "Arg", "Asn", "Cys", "Gln", "Gly", "Leu", "Lys", "Phe", "Pro", "Ser", "Thr", "Tyr" et "Val" désignent respectivement les restes des formes lévogyres d'alanine, d'arginine, d'asparagine, de 1/2 cystine, de glutamine, de glycine, de leucine, de lysine, de phénylalanine, de proline, de serine, de thréonine, de tyrosine et de valine ; dans laquelle les radicaux R_1 à R_5 désignent (1) respectivement les restes des L-aminoacides suivants : lysine, asparagine, leucine, thréonine et acide aspartique, ou (2) R_1 représente l'arginine, R_2 et R_5 représentent la glycine, R_3 représente l'isoleucine et R_4 représente la sérine ; les symboles "—" désignent les liaisons -S-S- ; et les chiffres arabes apparaissant dans la formule structurale à côté de certains restes d'acides indiquent la séquence de ces acides à partir du N terminal.

2. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



dans laquelle tous les symboles et tous les chiffres ont la même signification que dans la revendication 1.

3. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



dans laquelle tous les symboles et tous les chiffres ont la même signification que dans la revendication 1.

4. Agent carcinostatique, caractérisé en ce qu'il comprend à titre d'ingrédient actif, un polypeptide tel que défini dans la revendication 1, 2 ou 3 et un véhicule ou diluant pharmaceutiquement acceptable.

5. Procédé de détection et/ou de détermination de virus, caractérisé en ce qu'il consiste à utiliser une composition comprenant un polypeptide tel que défini dans la revendication 1, 2 ou 3 et un véhicule ou diluant pharmaceutiquement acceptable.

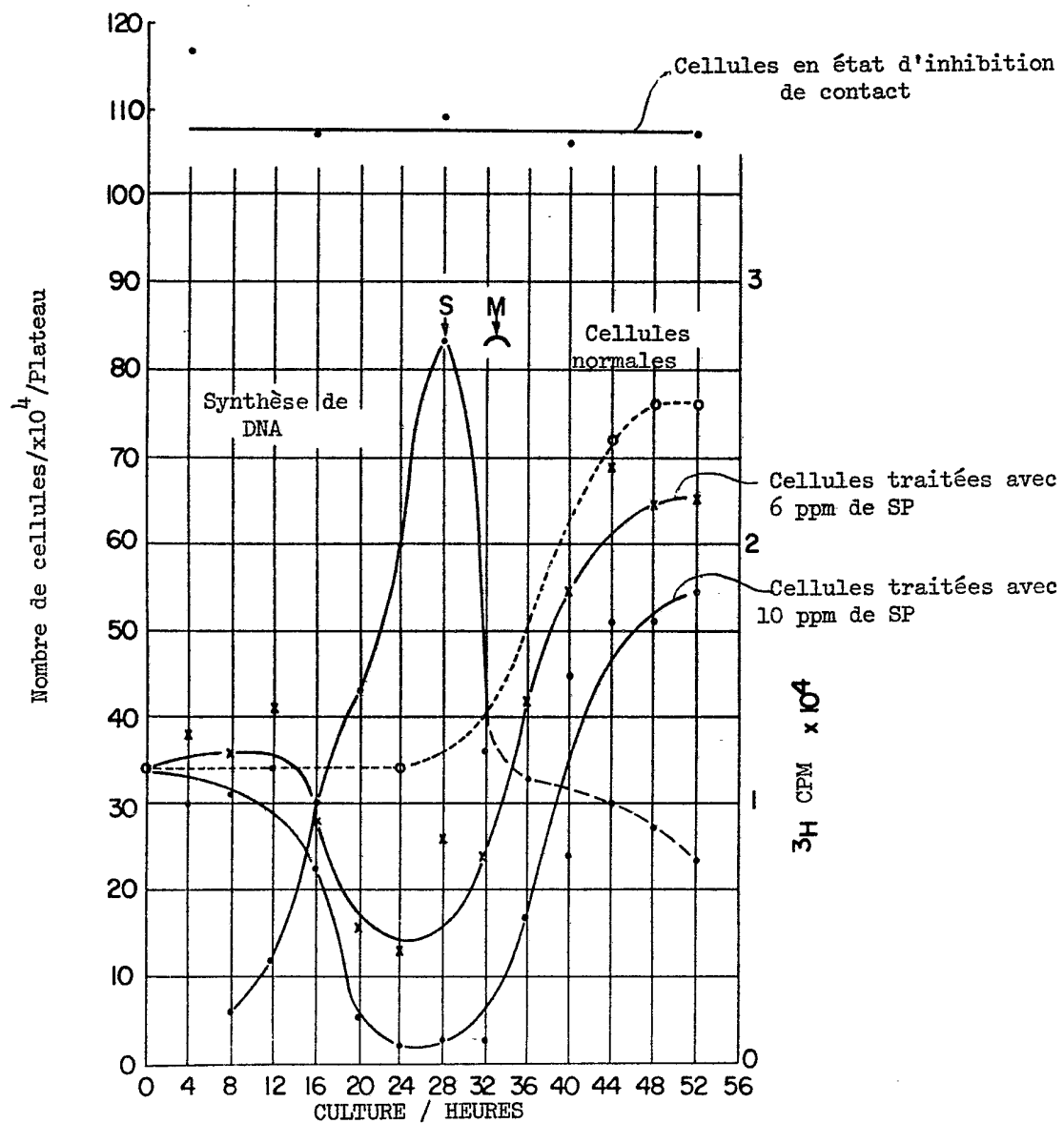


FIG. 1

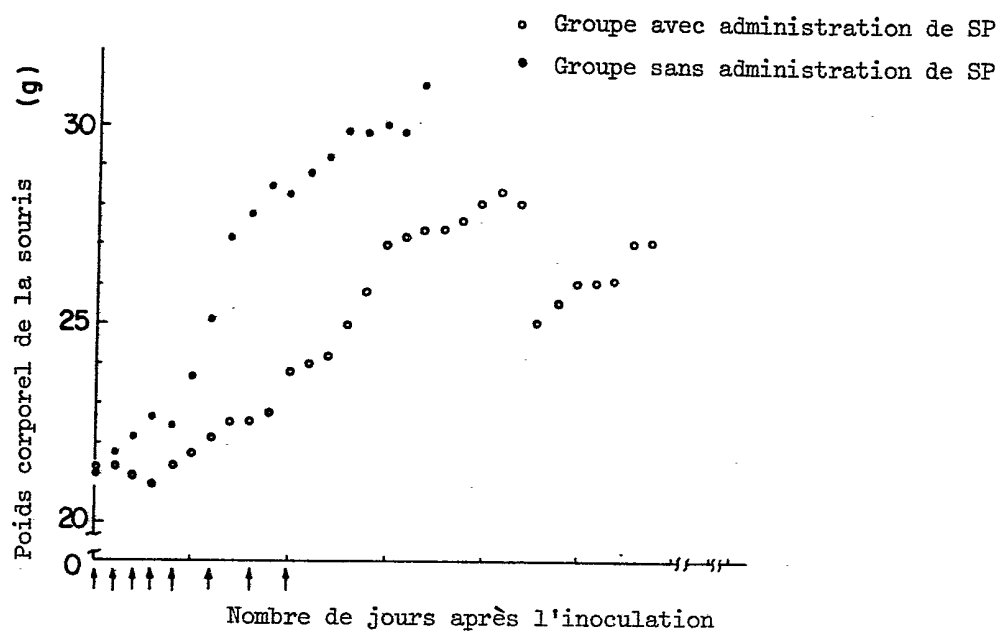


FIG. 2A

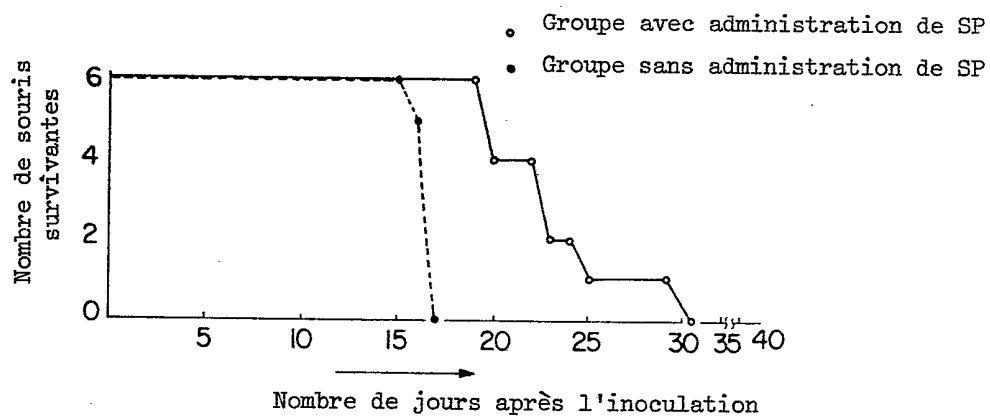
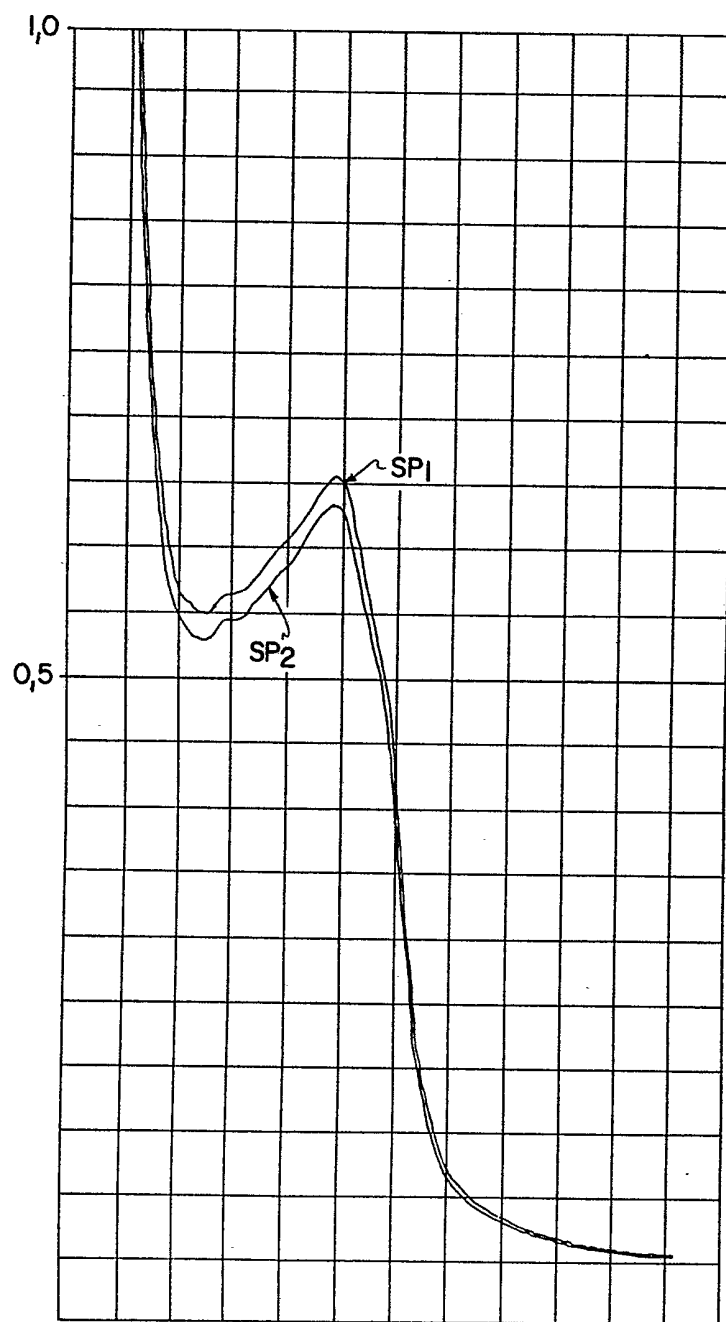
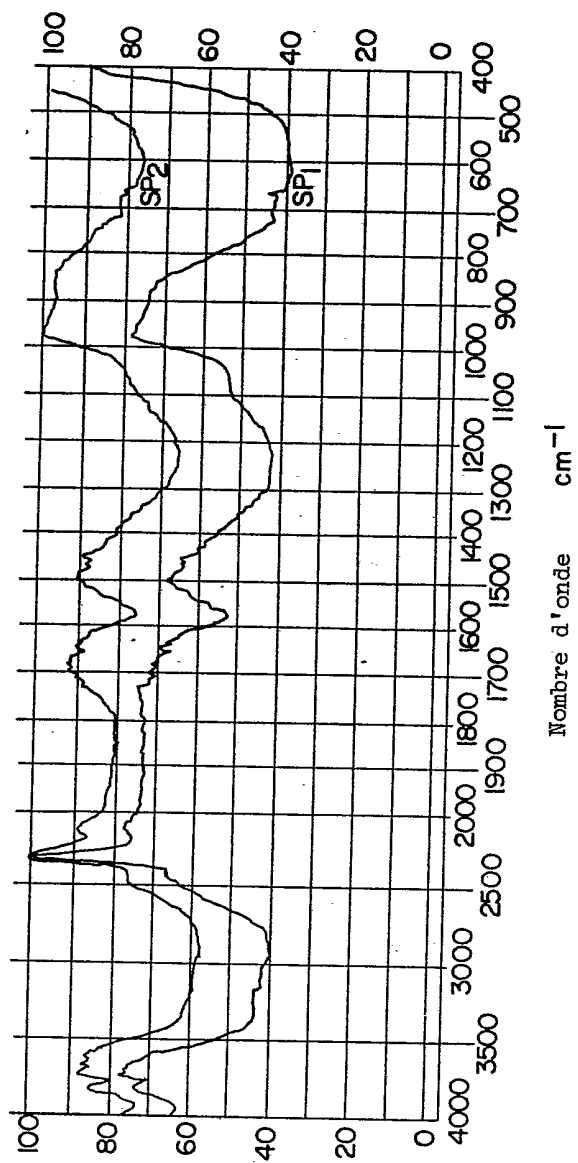


FIG. 2B

*FIG. 3*

Nombre d'onde cm⁻¹**FIG. 4**