

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

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

**2 484 258**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 80 12794**

(54) Agent immunothérapeutique pour tumeurs, avec du lipopolysaccharide comme composant actif, et procédé de préparation de cet agent.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 39/04.

(22) Date de dépôt..... 9 juin 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 4 juillet 1979, n° 84681/1979.

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 51 du 18-12-1981.

(71) Déposant : MARUYAMA Chisato, résidant au Japon.

(72) Invention de : Chisato Maruyama.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Bert, de Keravenant et Herrburger,  
115, bd Haussmann, 75008 Paris.

L'invention concerne un nouvel agent immunothérapeutique pour tumeurs.

Récemment, des tentatives ont été effectuées pour extraire des composés, efficaces comme remède contre le cancer, à partir des cellules de diverses bactéries et de produits bactériens. En particulier, des essais très poussés ont été effectués pour obtenir des agents carcinostatiques moins toxiques, par extraction de composés ayant une activité carcinostatique, à partir de cellules de mycobactéries.

De plus, des recherches chimiques pour guérir le cancer ont été menées avec vigueur, en utilisant les composés de cellules BCG ou de cellules d'autres mycobactéries, comme agents immunothérapeutiques pour divers cancers d'animaux.

Néanmoins, les cellules de BCG contiennent des composés qui causent des effets secondaires, et augmenter l'administration de la cellule elle-même est très dangereux. De ce fait, on a souhaité développer des agents d'immunothérapie en éliminant les composés causant des effets secondaires de la cellule, et en extrayant sélectivement les composés actifs seuls ou par promotion de l'activité de ces composés par traitement ou autre. Ainsi, on a développé un composant de squelette de paroi cellulaire BCG (voir demande de brevet japonaise n° 28813:1979), muranyl dipeptide (voir demandes japonaises n° 156812/1977 et 98922/1978), et un glycolipide contenant un acide gras à longue chaîne dans une substance cireuse D (voir demandes japonaises n° 3514/1978 et 28830/1979).

L'objet principal de l'invention est de proposer un agent immunothérapeutique efficace contre les tumeurs et notamment un agent, sans effets secondaires.

On a découvert que, lorsqu'une cellule peu et faible du bacille tuberculeux humain, le mycobactérium tuberculosis, de souche Aoyama B ou le Mycobactérium tuberculosis souche H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> est extrait avec de l'eau chaude, et que le composé lipopolysaccharide récupéré est purifié par purification fractionnée, on peut obtenir le lipoarabinomannan ayant une activité anti-tumeur et pas d'effet secondaire.

On a également découvert que, lorsque ce lipoarabinomannan, ou arabinomannan exempt de lipide, obtenu par élimination d'acides gras du lipoarabinomannan par saponification, est modifié chimiquement par un acide gras, on obtient

un lipoarabinomannan chimiquement modifié, qui est comparable ou supérieur au lipoarabinomannan, extrait et purifié de la cellule, concernant l'activité anti-tumeur, et ne produit pas d'effet secondaire.

5 Les composants de l'agent immunothérapique pour tumeurs de l'invention, le procédé pour sa préparation, et l'action thérapeutique qu'il produit, seront décrits en détail à l'aide des exemples et expériences, sans limiter l'étendue de l'invention.

10 EXEMPLE 1 -

Cet exemple illustre le procédé d'extra-  
tion du lipopolysaccharide.

(1-1) On inocule, dans un milieu de culture Sauton, le Mycobac-  
térium tuberculosis, souche Aoyama B, et l'on conduit une cul-  
15 ture aérobie durant 14 jours. La cellule est récupérée par  
filtration et lavée à l'eau froide, puis l'on ajoute de l'eau  
distillée à la cellule, pour faire flotter la cellule dans  
l'eau. La dispersion de cellule est chauffée à 100° C durant  
120 minutes, et filtrée, afin d'obtenir une solution aqueuse de  
20 l'extrait de cellule. On ajoute à la solution de l'acide  
sulfosalicylique, pour précipiter le composant protéiné, et la  
solution est séparée par centrifugation. Le produit qui surnage  
est dialysé en utilisant une membrane à dialyse, et le liquide  
interne est mélangé à de l'éthanol, dans une proportion 9 fois  
25 supérieure à la quantité de liquide interne, et le mélange est  
séparé par centrifugation, et l'on récupère le lipopolysaccharide  
brut précipité.

On charge le lipopolysaccharide brut dans  
une colonne remplie de DEAE-Sephadex A-25 (forme bicarbonatée)  
30 et l'on recueille une fraction élevée à l'eau distillée. La  
fraction est concentrée et mélangée avec une quantité équivalente  
d'éthanol, et l'on opère la séparation du mélange par centrifu-  
gation.

Le produit qui surnage est concentré, et  
35 tamisé sur un tamis moléculaire, selon une chromatographie en  
phase liquide à performance élevée, sur une colonne remplie de  
TSK Gel 4000 SW, TSK Gel 3000 SW et TSK Gel 2000 SW, chaque  
produit provenant de Toyo Soda K-K, et l'on recueille une  
fraction de poids moléculaire compris entre 10.000 et 16.000.  
40 La fraction est dialysée et concentrée, puis purifiée encore

par chromatographie d'affinité, sur lit d'agarose-concanavalin fourni par les laboratoires E.Y, pour obtenir un lipopolysaccharide purifié.

(1-2) Le mycobacterium tuberculosis, souche H<sub>37</sub>R<sub>V</sub> est cultivé 5 dans les mêmes conditions que celles de l'exemple 1-1. La cellule récupérée est soumise aux mêmes traitements, pour obtenir un lipopolysaccharide brut, qui est purifié par les mêmes procédés que ceux de l'exemple 1-1, en lipopolysaccharide purifié.

10 EXPERIENCE 1 -

ANALYSE DES COMPOSANTS MONOSACCHARIDE DU LIPOPOLYSACCHARIDE -

(1-1). Le lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-1 est hydrolysé avec de l'acide sulfurique, neutralisé par de l'Amberlite IR-45 (forme hydroxylée) et identifié par chromatographie en couche mince. On détecte de l'arabinose, mannose et glucose (arabinose : mannose : glucose = 6 : 4 : traces). Le produit obtenu ci-dessus par hydrolyse et neutralisation, est réduit et acétylé selon les procédés connus, et le mélange d'acétate d'alditol résultant est déterminé par chromatographie gazeuse, en utilisant trois types de colonne. On confirme ainsi que le mélange est constitué de 61 % d'arabinose, 38 % de mannose et 1 % de glucose. Ainsi, il est confirmé que le composant saccharide de ce lipopolysaccharide est de l'arabinomannan (1-2). Le composant monosaccharide du lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-2 est analysé par les mêmes procédés que ceux de l'expérience 1-1. Le résultat confirme que l'échantillon purifié est constitué par 56 % d'arabinose et 44 % de mannose. Ainsi, il est confirmé que le composant saccharide de ce lipopolysaccharide est de l'arabinomannan.

30 EXPERIENCE 2 -

ANALYSE DE LA STRUCTURE DE LA CHAINE SACCHARIDE DU LIPOPOLYSACCHARIDE -

(2-1). Le lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-1, est méthylé complètement selon le procédé Hakomori, et le lipopolysaccharide méthylé est hydrolysé avec de l'acide sulfurique, neutralisé par de l'Amberlite IR-45 (forme hydroxylée), puis réduit et acétylé selon des procédés connus. Le mélange d'acétate d'alditol partiellement méthylé résultant est déterminé par chromatographie gazeuse sur quatre sortes de colonne chargée et de colonne capillaire SCOT. Les pics détectés sont comparés avec les pics d'acétates d'alditol partiellement méthylé.

témoins, synthétisés séparément, et les composants saccharide partiellement méthylés respectifs sont identifiés et déterminés. En outre, les composants saccharide respectifs sont confirmés et identifiés à partir de parties des pics respectifs par

5 GC - MS.

La relation quantitative de l'alditol partiellement méthylé, déterminé par chromatographie gazeuse, et des liaisons indiquées, est représentée dans le tableau 1. (2-2). Le lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-2 10 est traité comme dans l'expérience 2-1. La relation quantitative de l'alditol partiellement méthylé, déterminé par chromatographie gazeuse, et des liaisons indiquées, est représentée dans le tableau 2.

Tableau 1

<u>Saccharide détectée</u>	<u>Liaison indiquée</u>	<u>Rapport aux : 2-O-Methyl-Arabinose (= 1.0)</u>	<u>%</u>	<u>Remarques</u>
2,3,5-tri-O-methyl-D-arabinose	(Araf)1 →	1.2	6.2	
2,3-di-O-methyl-D-arabinose	→ 5(Araf)1 →	8.0	41.0	
3,5-di-O-methyl-D-arabinose	→ 2(Araf)1 →	1.4	7.2	59.5%
2-O-methyl-D-arabinose	→ 3(Araf)1 → → 5(Araf)1 →	1.0	5.1	
2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-mannose	(Manp)1 →	2.5	12.8	
3,4,6-tri-O-methyl-D-mannose	→ 2(Manp)1 →	1.2	6.1	
2,3,4-tri-O-methyl-D-mannose	→ 6(Manp)1 →	1.4	7.2	40.5%
3,4-di-O-methyl-D-mannose	→ 2(Manp)1 → → 6(Manp)1 →	2.8	14.4	
Total		19.5	100	

Tableau 2

Saccharide détectée	Liaison indiquée	Rapport 2-O-Methyl-Arabinose AUX (= 1.0)	%	Remarques
2,3,5-tri-O-methyl-D-arabinose	(Araf)1 →	0.9	3.0	
2,3-di-O-methyl-D-arabinose	→ 5(Araf)1 →	12.4	41.5	
3,5-di-O-methyl-D-arabinose	→ 2(Araf)1 →	2.3	7.7	
2-O-methyl-D-arabinose	→ 3(Araf)1 → → 5(Araf)1 →	1.0	3.3	
6.-				
2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-mannose	(Manp)1 →	2.8	9.4	
3,4,6-tri-O-methyl-D-mannose	→ 2(Manp)1 →	2.7	9.0	
2,3,4-tri-O-methyl-D-mannose	→ 6(Manp)1 →	5.3	17.7	44.5%
3,4-di-O-methyl-D-mannose	→ 2(Manp)1 → → 6(Manp)1 →	2.5	8.4	
Total				
		29.9	100	

EXPERIENCE 3 -ANALYSE DES ACIDES GRAS DANS LE LIPOPOLYSACCHARIDE -

(3-1). A 1mg du lipopolysaccharide obtenu dans l'exemple 1-1, on ajoute 1 ml de méthanol contenant 100  $\mu$ g de méthyl laurate comme référence interne, et 3,3 % d'acide chlorhydrique, et l'on décompose le mélange par méthanolysé dans un tube scellé rempli d'azote. Le mélange résultant est concentré à basse température, et dissout dans le chlorure de méthylène. Par chromatographie gazeuse utilisant deux sortes de colonnes chargées, les constituants acides gras sont identifiés et déterminés par la durée de rétention du méthyl ester de l'acide gras. Les pics des esters méthyliques des acides gras respectifs sont identifiés par GC-MS. Les résultats de l'identification par chromatographie gazeuse sont représentés dans le tableau 3.

15

TABLEAU 3

Methyl laurate (référence interne)	(100 $\mu$ g)
Metyl myristate	10.4 $\mu$ g $42.9 \times 10^{-9}$ mol
Methyl palmitate	89.5 $\mu$ g $330.9 \times 10^{-9}$ mol
Methyl heptadecanoate	0.5 $\mu$ g $1.8 \times 10^{-9}$ mol
Methyl stearate	37.3 $\mu$ g $125.0 \times 10^{-9}$ mol
Methyl oleate	0.2 $\mu$ g $0.7 \times 10^{-9}$ mol
Methyl tubercurostearate	12.8 $\mu$ g $41.0 \times 10^{-9}$ mol
Total	150.7 $\mu$ g $542.3 \times 10^{-9}$ mol

25

Les résultats expérimentaux ci-dessus confirment que la teneur en acide gras de l'échantillon de lipopolysaccharide est d'environ 15 % (150,7  $\mu$ g pour 1 mg de polysaccharide) et l'on peut supposer que le lipopolysaccharide (poids moléculaire moyen 13.000) qui a été obtenu dans l'exemple 1-1, contient environ 7,6 acides gras (1950 équivalents-grammes). (3-2). Le lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-2 est traité comme dans l'exemple 3-1, de façon à identifier et déterminer le constituant acide gras. Les résultats de l'identification sont représentés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Methyl laurate (référence interne)	(100 $\mu$ g)	
Methyl myristate	6.6 $\mu$ g	$27.2 \times 10^{-9}$ mol
5 Methyl palmitate	39.6 $\mu$ g	$146.4 \times 10^{-9}$ mol
Methyl heptadecanoate	0.4 $\mu$ g	$1.4 \times 10^{-9}$ mol
Methyl stearate	13.2 $\mu$ g	$44.2 \times 10^{-9}$ mol
Methyl tubercurostearate	19.8 g	$63.4 \times 10^{-9}$ mol
10 Total	79.6 $\mu$ g	$282.6 \times 10^{-9}$ mol

Les résultats expérimentaux ci-dessus confirment que la teneur en acide gras de l'échantillon de lipopolysaccharide est d'environ 8 % (79,6  $\mu$ g par mg de polysaccharide) et l'on peut supposer que le lipopolysaccharide (poids moléculaire moyen 12.000) qui a été obtenu dans l'exemple 1-2 contient environ 3,9 acide gras (1000 équivalent-grammes).

#### EXPERIENCE 4 -

##### ANALYSE DE LA STRUCTURE DE L'ACIDE GRAS DANS LE LIPOPOLYSACCHARIDE -

20 (4-1). Le lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-1 est traité avec de l'éther méthylvinyle dans le diméthylsulfoxyde, en présence d'acide p-toluène-sulfonique comme catalyseur pour methoxyéthyler les groupes hydroxyl libres. Les acides gras sont éliminés par saponification et les groupes 25 hydroxyl, qui ont été libérés, sont méthylés suivant le procédé Hakomori. Puis les groupes methoxyéthyl sont éliminés par hydrolyse, avec du méthanol contenant un acide, et un mélange de monosaccharides partiellement méthylés est obtenu par hydrolyse acide. Le mélange est réduit et acétylé suivant des procédés connus, et les acétates sont analysés par chromatographie 30 gazeuse, en utilisant trois sortes de colonne chargée et du xylitol comme référence interne, et l'identification et la détermination sont effectuées par comparaison avec des acétates d'alditol standards de monosaccharides libres et partiellement 35 méthylés.

Les pics identifiés sont représentés dans le tableau 5.

## TABLEAU 5

5-méthyl-D-arabinitol	6.14%
2-méthyl-D-arabinitol	2.48%
	59.22%
3-méthyl-D-arabinitol	0.33%
5 D-arabinitol	50.27%
<hr/>	
2-méthyl-D- mannitol	0.02%
3-ou 4-méthyl-D-mannitol	0.22%
	40.78 %
6-méthyl-D-amnnitol	1.04%
10 D-mannitol	39.50%
<hr/>	
total	100 % (comprenant 10,23% d'ester d'acide gras de monosaccharide).

Les résultats expérimentaux ci-dessus

15 suggèrent qu'environ un acide gras est lié par 10 molécules du constituant monosaccharide, et la plupart des positions de liaison sont les positions 5 des unités arabinose, le reste étant les positions 2 des unités arabinose, les positions 6 des unités mannose, et autres.

20 A partir des résultats analytiques obtenus dans les expériences 1-1, 2-1, 3-1 et 4-1, on peut s'attendre à ce que le lipopolysaccharide obtenu dans l'exemple 1-1 soit un lipopolysaccharide ayant un poids moléculaire moyen d'environ 13.000 qui est constitué d'arabinomannan ayant un poids moléculaire moyen d'environ 11.000, composé d'environ 47 unités 25 d'arabinose et environ 30 unités mannose et environ 8 acides gras ayant 14 à 19 atomes de carbone ( principalement de l'acide palmitique) qui sont liés à l'arabinomannan. (4-2). Le lipopolysaccharide purifié obtenu dans l'exemple 1-2 est traité comme dans l'expérience 4-1. Les pics de l'acétate d'alditol partiellement méthylé résultants sont identifiés comme le montre le tableau 6.

TABLEAU 6

5	5-méthyl-D-arabinitol	3.29 %	55.49 %
	2-méthyl-D-arabinitol	1.60 %	
	3-méthyl-D-arabinitol	0.03 %	
10	D-arabinitol	50.57 %	44.51 %
	2-méthyl-D-mannitol	0.01 %	
	3- or 4-méthyl-D-mannitol	0.03 %	
	6-méthyl-D-mannitol	1.00 %	
	D-mannitol	43.47 %	
	Total	100 % (comprenant 5,96 % d'ester d'acide gras de monosaccharide)	

15 Les résultats expérimentaux ci-dessus suggèrent qu'environ 1 acide gras est lié par 16 molécules des monosaccharides constituants, et la plupart des positions de liaison sont les positions 5 et 2 des unités arabinose et les positions 6 des unités mannose.

20 Les résultats analytiques obtenus dans les expériences 1-2, 2-2, 3-2 et 4-2, laissent penser que le lipopolysaccharide obtenu dans l'exemple 1-2 est un lipopolysaccharide ayant un poids moléculaire moyen d'environ 12.000, qui est constitué d'arabinomannan ayant un poids moléculaire moyen d'environ 11.000, composé d'environ 42 unités arabinose et environ 34 unités mannose et avec, en moyenne, 4 ou 5 acides gras ayant 14 à 19 atomes de carbone (principalement acide palmitique) qui sont liés à l'arabinomannan.

30 Un procédé pour obtenir un lipopolysaccharide en liant un acide gras au polysaccharide, est connu. Selon l'invention, le lipoarabinomannan plus actif dans l'immunothérapie des tumeurs, peut être préparé en liant un acide gras approprié à l'arabinomannan exempt de lipide ou faiblement lipidique, par ce procédé connu.

#### 35 EXEMPLE 2 -

Cet exemple illustre le procédé pour la préparation de lipoarabinomannan, à partir d'arabinomannan exempt de ( 2-1 ) lipide.

40 La cellule utilisée dans l'exemple 1-1 est extraite à l'alcali, et de l'arabinomannan ayant un poids moléculaire d'environ 8.500 à 14.000 est obtenu par tamisage molécul-

laire, de la même façon que dans l'exemple 1-1. L'arabinomannan ainsi obtenu est purifié encore par chromatographie affinitaire et séché; et l'on fait réagir 10 mg de l'arabinomannan séché avec 10 mg d'anhydride palmitique à 50° C durant 20 heures, pour 5 obtenir la N,N-dimethylformamide-pyridine. On ajoute de l'éther au mélange réactionnel, et récupère le précipité par centrifugation lave à l'éther et le sèche, pour obtenir 11 mg de lipoarabinomannan.

Le résultat de l'analyse confirme que la 10 structure de la chaîne saccharidique du lipoarabinomannan obtenu ci-dessus est essentiellement la même que celle détectée dans les expériences 1-1 et 2-1. En particulier, il est confirmé que l'acide palmitique est lié surtout en position 5 à l'unité arabinose dans la chaîne arabinomannan, dans une proportion 15 d'environ 9,8 % en poids, et que le poids moléculaire moyen est d'environ 12.500.

#### EXEMPLE 3 -

Cet exemple illustre le procédé de préparation de lipoarabinomannan à partir d'arabinomannan faiblement 20 lipidique.

5 mg d'arabinomannan ayant une teneur en acide gras d'environ 3 %, qui a été obtenu comme dans l'exemple 1-1, est traité aux ultrasons, avec 10 mg de chlorure de palmitoyl dans la pyridine, et la réaction est effectuée à 37° C 25 durant 18 heures. On ajoute de l'éthanol au milieu réactionnel et recueille le précipité, le lave à l'éther et le sèche, pour obtenir 4,3 mg de lipoarabinomannan.

Le résultat de l'analyse confirme que la 30 structure de chaîne saccharidique est essentiellement la même que celle détectée dans les expériences 1-1 et 2-1. En particulier, il est confirmé que l'acide palmitique est lié essentiellement en position 5 de l'unité arabinose et en position 6 de l'unité mannose, dans la chaîne arabinomannan, dans une proportion d'environ 28 % en poids, et le poids moléculaire moyen est 35 d'environ 14.000.

Du lipoarabinomannan semblable à celui obtenu dans les exemples 2 ou 3, peut être obtenu en employant de l'arabinomannan exempt de liquide ou faiblement lipidique, extrait et purifié à partir de la cellule du *Mycobacterium* 40 *tuberculosis*, souche H<sub>37</sub>R<sub>V</sub>. De plus, de l'acide stearique peut

être utilisé à la place de l'acide palmitique dans les exemples 2 ou 3.

EXPERIENCE 5 -

5 Dans cette expérience, on teste l'activité anti-tumeur.

Des cellules ( $1 \times 10^6$ ) de tumeur Sarcoma-180 sont transplantées de façon sous-cutanée sur souris ddY (femelle âgée de 10 semaines) qui a été sensibilisée par BCG. A partir du lendemain, du lipoarabinomannan présenté dans le tableau 7, 10 qui est dissout de façon stérile dans du sérum physiologique, est administré par voie hypodermique à des groupes de souris (chaque groupe étant constitué de 8 souris) en quantité de 0,02  $\mu$ g à 2,0  $\mu$ g par souris, chaque jour suivant, 8 fois en tout. Lorsque 30 jours sont passés, après la transplantation des 15 cellules de tumeur, on tue les animaux et pèse les tumeurs. L'activité anti-tumeur de chaque lipoarabinomannan est évaluée à partir du poids de tumeur mesuré.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7

<u>Groupe</u>	<u>Quantité Administrée (<math>\mu</math>g)</u>	<u>Poids de la tumeur</u>	<u><math>\pm</math> S.E. (g)</u>	<u>T/C (%)</u>
Témoin	-	2.71 $\pm$ 0.32		-
ArMn-1 <sup>a)</sup>	0.02	2.54 $\pm$ 0.43		93.7
ditto	0.2	1.78 $\pm$ 0.26*		65.7
ditto	2.0	1.70 $\pm$ 0.29*		62.7
<hr/>				
Témoin	-	2.82 $\pm$ 0.40		-
ArMn-2 <sup>b)</sup>	0.02	1.90 $\pm$ 0.52		67.4
ditto	0.2	1.62 $\pm$ 0.24**		57.4
ditto	2.0	1.74 $\pm$ 0.25**		61.7
<hr/>				
Témoin	-	2.53 $\pm$ 0.33		-
ArMn-3 <sup>c)</sup>	0.02	1.87 $\pm$ 0.40		73.9
ditto	0.2	1.53 $\pm$ 0.27*		60.5
ditto	2.0	1.54 $\pm$ 0.27*		60.9
<hr/>				
Témoin	-	2.85 $\pm$ 0.21		-
ArMn-4 <sup>d)</sup>	0.02	1.52 $\pm$ 0.82**		53.3
ditto	0.2	1.40 $\pm$ 0.15**		49.1
ditto	2.0	1.83 $\pm$ 0.17**		64.2
<hr/>				
Témoin	-	2.93 $\pm$ 0.25		-
ArMn-5 <sup>e)</sup>	0.02	2.03 $\pm$ 0.43		69.3
ditto	0.2	1.83 $\pm$ 0.31*		62.5
ditto	2.0	1.77 $\pm$ 0.20**		60.4

Nota :

a) Lipoarabinomannan extrait et purifié par le procédé décrit dans l'exemple 1-1 (teneur en acide gras = 3 %).

5 b) Lipoarabinomannan extrait et purifié dans l'exemple 1-1 (teneur en acide gras = 15 %).

c) Lipoarabinomannan formé en liant de l'acide palmitique à un arabinomannan exempt de lipide, par une liaison ester, dans l'exemple 2 (teneur en acide palmitique = 10 10 %).

d) Lipoarabinomannan formé en liant de l'acide palmitique à un lipoarabinomannan faiblement lipidique, par une liaison ester dans l'exemple 3 (teneur en acide palmitique = 28 %).

15 e) Lipoarabinomannan extrait et purifié dans l'exemple 1-2 -teneur en acide gras = 8 %).

T/C (%) : le rapport du poids de la tumeur dans le groupe traité au lipopolysaccharide au poids de la tumeur dans le groupe témoin.

20 \* :  $P < 0,05$

\*\* :  $P < 0,01$

Comme il apparaît des résultats présentés dans le tableau 7, les lipopolysaccharides de l'invention, c'est-à-dire le lipoarabinomannan formé en liant un acide gras à un arabinomannan exempt de lipide ou faiblement lipidique, et le lipoarabinomannan extrait et purifié à partir de la cellule, ont une action inhibitrice élevée vis-à-vis de l'accroissement de la tumeur, en administrant de petites quantités. L'arabinomannan ayant une teneur en acide gras plus élevée, présente une action anti-tumeur spécialement élevée, en administrant de plus faibles quantités.

30 Lorsque le lipopolysaccharide de l'invention est administré au corps humain comme agent immunothérapeutique pour tumeurs, c'est sous la forme d'injection hypodermique. Un exemple de préparation de l'injection hypodermique est décrit ci-dessous.

EXAMPLE 5 -

40 1 mg de lipopolysaccharide de l'invention (obtenu dans les exemples 1, 2 ou 3) est dissout dans une quantité appropriée de sérum physiologique pour injection, pour former

100 ml de solution. La solution est traitée pour donner une injection hypodermique contenant 10  $\mu$ g/ml du lipopolysaccharide, selon les procédés habituels. L'injection est administrée par voie hypodermique 1 à 3 fois (10 à 30  $\mu$ g de lipopolysaccharide) par 5 semaine.

Une cellule de bacille de tuberculose, ou des extraits de cette cellule, dont l'activité anti-tumeur a été évaluée, sont un mélange de composés chimiques complexes. Par contre, le lipoarabinomannan de l'invention est un lipopolysac- 10 charide ayant une composition chimique définie, et qui est isolé et purifié. De plus, le lipopolysaccharide de l'invention est caractérisé en ce que les effets secondaires, que donne la cellule, peuvent être éliminés. En conséquence, on peut 15 s'attendre à ce que le lipopolysaccharide de l'invention soit un agent immunothérapique valable pour tumeurs.

REVENDICATIONS

1.- Agent immunothérapique pour tumeurs, caractérisé en ce que le composant actif est un lipopolysaccharide, constitué par de l'arabinomannan comme polysaccharide et des acides gras liés à l'arabinomannan par des liaisons ester, la teneur en acide gras dans le lipopolysaccharide étant de 1 à 28 %, le lipopolysaccharide étant obtenu par extraction à l'eau chaude et purification de la cellule de bacille de tuberculose humaine, *Mycobacterium tuberculosis*, souche Aoyama B ou *Mycobactérium tuberculosis*, souche  $H_{37}R_v$ .

2.- Agent immunothérapique pour tumeurs, suivant la revendication 1, dont le composant actif est un lipopolysaccharide préparé en liant un acide gras à l'arabinomannan par une liaison ester, caractérisé en ce que l'arabinomannan est obtenu par extraction à l'alcali et purification de la cellule de bacille de tuberculose humaine, *Mycobactérium tuberculosis* souche Aoyama B ou *Mycobactérium tuberculosis* souche  $H_{37}R_v$ , la teneur en acide gras dans le lipopolysaccharide étant de 1 à 28 %.

3.- Agent immunothérapique pour tumeurs, suivant la revendication 1, dont le composant actif est un lipopolysaccharide préparé en liant un acide gras à un lipoarabinomannan à travers une liaison ester, caractérisé en ce que le lipoarabinomannan est obtenu par extraction à l'eau chaude et purification de la cellule du bacille de la tuberculose humaine, *Mycobactérium tuberculosis* souche Aoyama B ou *Mycobactérium tuberculosis* souche  $H_{37}R_v$ , la teneur en acide gras dans le lipopolysaccharide étant de 1 à 28 %.

4.- Agent immunothérapique pour tumeurs, selon la revendication 1, caractérisé en ce que les acides gras sont les acides palmitique, myristique, stearique, tubercostearique, heptadecanoïque, oleïque et linoleïque, et que le lipoarabinomannan a une composition monosaccharidique de 30 à 74 % d'arabinose, 20 à 50 % de mannose, 0 à 10 % de glucose et 0 à 13 % de galactose.

5.- Agent immunothérapique pour tumeurs, selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que l'acide gras appartient au groupe constitué par l'acide palmitique et l'acide stearique, et que le lipopolysaccharide a une composition monosaccharidique de 30 à 74 % d'arabinose, 20 à 50 % de mannose, 0 à 10 % de glucose et 0 à 13 % de galactose.