

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 21292

(54) Nouvelles substances biologiquement actives, leur obtention à partir de caséine humaine et compositions les contenant.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 45/05, 37/18; C 07 G 7/00; C 12 P 21/06.

(22) Date de dépôt..... 3 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 14 du 9-4-1982.

(71) Déposant : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM), établissement public, résidant en France.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Harlé et Léchopiez,
21, rue de La Rochefoucauld, 75009 Paris.

La présente invention concerne des substances biologiquement actives obtenues par fractionnement d'hydrolysats enzymatiques de la caséine humaine et les compositions qui les contiennent.

5 Les substances selon la présente invention sont des agents immunologiques qui favorisent en particulier la production d'anticorps.

10 La caséine humaine, qui est un complexe de protéines (α_5 , β , K, ...) est présente essentiellement dans le lait maternel. Sous l'action d'une enzyme protéolytique la caséine peut donner naissance, après fractionnement, à des substances biologiquement actives.

15 Selon la présente invention, les nouvelles substances sont obtenues par traitement, à l'aide d'au moins une enzyme protéolytique, de la caséine humaine délipidée puis solubilisée, suivi du fractionnement des produits hydrosolubles, en fonction de leur poids moléculaire moyen, par filtration sur un support approprié.

20 D'un intérêt tout particulier sont les substances selon l'invention dont le poids moléculaire moyen est voisin de 1200 ± 200 ; cependant les substances dont le poids moléculaire moyen est voisin de 2500 ou de 5500 présentent également des propriétés intéressantes.

25 A titre d'enzyme protéolytique, on utilise avantageusement dans le procédé de l'invention, la trypsine, la chymotrypsine ou autre enzyme analogue, ou leurs mélanges, la trypsine étant préférée.

30 Par ailleurs, les substances obtenues selon la présente invention peuvent être couplées avec des acides gras. Généralement les acides gras sont des acides aliphatiques contenant 8 à 18 atomes de carbone. D'un intérêt tout particulier est l'acide laurique. Le couplage peut s'effectuer en traitant une substance selon la présente invention par un dérivé activé d'un acide gras tel que l'anhydride ou le chlorure.

35 Les nouvelles substances selon la présente invention, ainsi que leurs produits de couplage avec les acides gras sont des agents immunologiques qui favorisent la pro-

duction d'anticorps et qui accélèrent le phénomène de phagocytose.

In vitro, ils se sont montrés particulièrement actifs à des concentrations comprises entre 0,1 et 10 µg/ml dans le test de sécrétion d'anticorps (hémolytiques) anti-globules rouges de moutons par des cellules spléniques de souris immunisées in vivo et dans le test de phagocytose de globules rouges de moutons opsonisés par les macrophages péritonéaux de souris.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, montrent comment l'invention peut être mise en pratique.

EXEMPLE 1 -

La caséine humaine (400 mg) est délipidée par traitement au moyen de 25 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2:1 en volumes).

La caséine insoluble est solubilisée par traitement au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,05 N de telle manière que la concentration finale en caséine soit voisine de 2 mg/cm³.

La solution obtenue est soumise à une dialyse contre 2 litres de tampon phosphate 0,033 M à pH 8 pendant 2 jours en renouvelant 5 fois la solution tampon.

On obtient ainsi une solution à pH 8 contenant la caséine soluble. Cette solution est soumise à l'action de la trypsine de telle manière que le rapport enzyme/substrat soit voisin de 1/100. L'hydrolyse enzymatique est poursuivie pendant 24 heures à 37°C, la moitié de la quantité d'enzyme étant introduite au départ de la réaction et le reste 4 heures après le début de l'hydrolyse.

Le mélange réactionnel est centrifugé à 15 000 tours/mn pendant 2 heures ; le surnageant est amené à sec puis repris par 16 ml d'une solution d'acide acétique à 30 %. Le mélange est soumis à 3 centrifugations successives à 13000 tours/minute, pendant 30 minutes.

Le liquide clair surnageant (16 ml) est filtré sur une colonne de Sephadex G 50 (hauteur : 105 cm, diamètre : 2,5 cm) en éluant avec de l'acide acétique à 30 % et en recueillant des fractions de 2 cm³.

En opérant de cette manière et en suivant la chromatographie par absorption U.V. on obtient des zones qui permettent de définir 8 fractions pour lesquelles le poids moléculaire moyen est établi. Le diagramme de la filtration est représenté à la figure 1.

Les fractions biologiquement actives sont les suivantes :

- substance IV : fractions 71 à 82 ; poids moléculaire moyen 5300
- substance V : fractions 84 à 98 ; poids moléculaire moyen 2230
- substance VI : fractions 99 à 114 ; poids moléculaire moyen 1120.

Exemple 2 -

Chacune des substances obtenues à l'exemple 1 est soumise à l'action de l'anhydride laurique en opérant dans l'alcool butylique tertiaire.

Pour chacune des substances lipidées, on obtient une fraction soluble dans l'alcool butylique tertiaire et une fraction insoluble dans l'alcool butylique tertiaire.

Chacune de ces fractions est soumise aux tests biologiques : la fraction IV-lipidée insoluble et la fraction VI lipidée insoluble présentent des propriétés particulièrement intéressantes.

La présente invention concerne également les compositions utilisables en thérapeutique, qui contiennent une substance selon la présente invention en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

Ces compositions peuvent être utilisées comme adjuvants de vaccins (par exemple vaccin antigrippal composé de sous-unités hémagglutinantes, vaccin antipolyomyélitique à virus inactivé, vaccin antimalarique) en injection simultanée avec l'antigène (viral, bactérien, parasitaire, fongique, tumoral) à l'égard duquel on souhaite augmenter la production d'anticorps ou la réactivité cellulaire spécifique.

Ces compositions pharmaceutiques peuvent être également employées comme immunostimulants non spécifiques en

vue d'augmenter la résistance de l'hôte (homme ou animal domestique) vis-à-vis des infections ou en immunothérapie antitumorale.

5 En tant qu'adjuvants, les produits peuvent être administrés soit en solution aqueuse, soit en émulsion huileuse, soit encore sous forme de liposomes avec l'antigène à l'égard duquel on souhaite obtenir une réponse immunitaire augmentée ou améliorée par la voie utilisée pour cet anti-
10 gène et dans des proportions variant entre 0,01 et 10 fois la quantité d'antigène avec lequel ils sont mélangés avant d'être injectés.

Pour l'application comme immunostimulant non spécifique, ces produits peuvent être utilisés par voies intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intra-nasale, éventuellement orale ou rectale, soit en solution aqueuse, soit
15 en émulsion huileuse, soit encore sous forme de liposomes. Dans ce cas, la dose de composé selon l'invention qui est administrée est généralement comprise entre 0,01 et 25 mg/kg. En thérapeutique humaine, les doses journalières dépendent de
20 l'effet recherché. Elles peuvent être comprises entre 0,1 et 10 mg pour un adulte.

Les compositions solides pour administration orale peuvent être des comprimés, des pilules, des poudres ou des
25 granulés.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des émulsions pharmaceutiquement acceptables, des solutions, des suspensions, des sirops ou
des élixirs.

30 Les compositions pour administration parentérale ou intra-nasale peuvent être des solutions stériles aqueuses, des suspensions ou des émulsions.

La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique ou en incorporant des agents stérilisants. Les compositions solides
35 rendues stériles par irradiation (rayon β) peuvent être dissoutes dans l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable éventuellement au moment de l'emploi.

Les compositions pour administration rectale sont des suppositoires.

L'exemple 3 suivant, donné à titre non limitatif, illustre une composition selon l'invention.

5 EXEMPLE 3.

On prépare selon la technique habituelle une composition liquide administrable par voie intraveineuse ayant la composition suivante :

- | | | |
|-------------------------------------|-----|-------|
| - substance V obtenue à l'exemple 1 | ... | 50 mg |
| - soluté injectable | ... | 5 ml. |

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de nouvelles substances biologiquement actives caractérisé en ce que l'on traite par au moins une enzyme protéolytique de la caséine humaine délipidée et solubilisée, puis fractionne les produits hydrosolubles, en fonction de leurs poids moléculaire moyen, par filtration sur un support approprié puis isole les substances actives que l'on fait réagir éventuellement avec un acide gras de préférence sous forme activée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, à titre d'enzyme on utilise la trypsine, la chymo trypsine ou autre enzyme protéolytique équivalente, ou leurs mélanges, la trypsine étant préférée.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on traite par la trypsine de la caséine humaine délipidée et solubilisée, le rapport enzyme/substrat étant voisin de 1/100, pendant 24 heures à 37°C, puis, après centrifugation, fractionne les produits hydrosolubles par filtration sur Sephadex G 50 en éluant avec de l'acide acétique à 30 % puis isole les substances actives.
4. Nouvelles substances biologiquement actives lorsqu'elles sont obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
5. Nouvelles substances selon la revendication 4, caractérisées en ce que leur poids moléculaire moyen est compris entre 1000 et 5500, en particulier voisin de 1200 ± 200 , de 2500 ou de 5500.
6. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins une substance selon l'une des revendications 4 ou 5 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles.