



MINISTRE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1000263A4

NUMERO DE DEPOT : 8700377

Classif. Internat.: A61K C07K

Date de délivrance : 27 Septembre 1988

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 09 Avril 1987 à 15h45
à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : ELLEM INDUSTRIA FARMACEUTICA S.p.A.
Corso di Porta Ticinese 89, I-20123 Milan(ITALIE)

représenté(e)s par : KUBORN Jacques, OFFICE BIEBUYCK, Square Marie-Louise
40 Bte 19 - 1040 BRUXELLES.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : TRIPEPTIDE A ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE.

INVENTEUR(S) : Brunetti Brunetto, Corso di Porta Ticinese 89, I-Milan (IT); Prada Marco, Via Caravaggio 31, I-Casalpusterlengo (IT)

Priorité(s) 09.04.86 IT ITA20027 86

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 27 Septembre 1988
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L.
Directeur.

TRIPEPTIDE A ACTIVITE IMMUNOSTIMULANTE

On sait par la littérature que la L-analine est importante pour la fonction des lymphocytes T, étant donné qu'elle est essentielle pour que ces cellules puissent répondre in vitro aux stimuli mitogènes (Rotter V. et al.: J. Immunol. 123, 1726, 1979); de plus, la L-analine est également essentielle pour la croissance in vitro de lymphocytes (Nordlind K. et al.: Int Archs Allergy appl. Immunol. 59, 1979).

Les données de nos laboratoires cependant, établissent seulement une faible activité immunostimulante de cet acide aminé, comme montré dans l'essai d'induction in vitro de Thy 1.2 sur des cellules T immatures provenant de souris normales.

La L-arginine également est renseignée comme dotée d'activité immunostimulante à la fois in vitro et in vivo, en particulier chez les animaux blessés et fatigués (Barbul A. et al.: Surg.Res. 29, 228, 1980; J. Parenteral Enteral Nutr. 4,446, 1980; ibid. 5, 492, 1981) et sur des tumeurs induites expérimentalement (Rettura G.: J. Parenteral Enteral Nutrition 3, 409, 1979).

Dans notre essai d'induction de Thy .2, la L-arginine fait également preuve d'une activité peu importante, encore que statistiquement significative.

Nous avons synthétisé un tripeptide de séquence Arg-Ala-Arg (en abrégé ci-après ELS2), et avons comparé dans notre essai son activité à celle d'un mélange des deux aminoacides simples en proportion molaire 2Arg:1Ala. Le tripeptide résultant est de loin plus actif que le mélange des deux acides aminés, puisqu'il induit 13% de cellules ($P < 0,01$), comparés à seulement 5% (non significatif statistiquement) avec le mélange.

La L-arginine a été choisie pour les deux positions terminales du tripeptide, en se basant sur le fait que, dans de nombreux tripeptides immunostimulants connus, cet acide aminé occupe soit la position N (comme dans le cas de la thymopentine), soit la position C (par exemple dans la tuftsine, l'ubiquitine, la thymopoietine).

CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

POIDS MOLECULAIRE: 401,49

ROTATION OPTIQUE: $[\alpha]_D^{20} = 3,69$ ($c = 1$, acide acétique)

ANALYSE HPLC :

Le tripeptide a été analysé par HPLC par appariement d'ions en utilisant les conditions de séparation décrites ci-après.

Eluant: NaH_2O_4 0,05 M pH 4,3 + SDS 5×10^{-4} M, MeOH; 50:50.

Débit: 1 ml/min.

Détection: 225 nm

Volume d'injection: 20 μl

Echantillon: 20 μg

Colonne: μ Bondapack C18 (eaux), 300 x 3,9 mm

On utilise l'appareillage suivant:

Chromatographe à liquide : SERIES 4 (Perkin Elmer)

Clapet d'injection : Reodyne mod. 7125-075 à boucle de 20 μl

Détecteur: Spectrophotomètre LC 95 (Perkin Elmer)

Intégrateur de calcul: Data station 3600 (Perkin Elmer)

La figure représente le profil HPLC du tripeptide.

RESISTANCE AU MILIEU GASTRIQUE SIMULE IN VITRO

Le tripeptide résiste au milieu gastrique simulé in vitro. Dans cette étude, le suc gastrique simulé USP XXI (HCl + pepsine) a été utilisé pendant 5 heures à 37°C.

SYNTHESE

NO2

Boc-Ala-Arg-OBz (1)

On a ajouté à du Boc-Ala (0,1 mole) dissous dans du chlorure de méthylène et refroidi à $0^\circ\text{C} \pm 1$, du chloroformiate d'isobutyle (0,1 mole), en agitant et en abaissant la température à -15°C . Après agitation du mélange réactionnel à cette température pendant 15 minutes, une solution prérefroidie d'ester di-p-tosylate de NG-nitro-arginine-benzyle (0,1 mole) et de N-méthylmorpholine (MNM) (0,2 mole) dans du diméthyl formamide a été ajoutée lentement et le mélange réactionnel a été maintenu pendant une nuit sous agitation. Les solvants ont été éliminés sous pression réduite, et le résidu a été repris dans l'acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle a été lavé à l'eau, à l'acide chlorhydrique 1N, dans une solution aqueuse de bicarbonate de soude à 5% et à l'eau. Il a été séché sur du sulfate de sodium, et le solvant a été éliminé sous pression réduite. Le produit obtenu est un sirop. Système TLC $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HOAc}$ (90:8:2). Pureté 95%: Rendement 80%.

Le produit (1) a été débloquent avec un mélange à 50% de chlorure de méthylène et d'acide trifluoroacétique (1:1) à raison de 10 ml par gramme pendant une demi-heure.

Il a été évaporé sous pression réduite, trituré à l'éther, filtré, lavé à l'éther et séché sous vide.

Rendement 98%

Le TFA-Ala-Arg-OBe a été neutralisé avec NMM et couplé à Z3-Arg dans un mélange de diméthyl formamide et de tétrahydrofurane, en utilisant de la NMM et du chloroformiate d'isobutyle, puis a subi le même traitement qu'en (1). Rendement 60%. Système TLC CHCl₃:MeOH (92:8). Une tache importante.

Le tripeptide mentionné ci-dessus a été hydrogéné dans un mélange d'acide acétique, d'eau et de méthanol en présence de pd/c jusqu'à réaction complète.

Il a été séparé du catalyseur par filtration, et le filtrat a été mis à évaporer sous vide.

Le produit, un tripeptide, a été purifié par distribution à contre-courant en utilisant le système N-butanol: acide acétique: eau (4:1:5). Rendement 50%. Système TLC butanol: acide acétique: eau: pyridine (32:6:22:20). Une tache importante. HPLC 97%.

ACTIVITES BIOLOGIQUES.

1.A. INDUCTION IN VITRO DE L'ANTIGENE THY 1.2

La capacité du Arg-Ala-Arg à induire in vitro la différenciation de précurseurs de cellules T de souris en marqueurs de cellules T pour lymphocytes a été contrôlée en mettant en évidence l'induction de l'antigène de membrane Thy 1.2.

MATERIEL ET METHODES

SOURIS: On a utilisé des souris athymiques (nu/nu) âgées de 8 semaines, élevées dans un milieu C3H/He et maintenues dans des conditions particulières exemptes de germes pathogènes.

PREPARATION DES CELLULES: Les rates ont été enlevées aseptiquement, divisées finement et passées à travers un tamis d'acier inoxydable à mailles fines dans du HBSS. Des splénocytes, lavés et remis en suspension dans le milieu 199 (Gibco Ltd.) auquel on a ajouté 1% de BSA (Boehringer Mannheim) et de la gentamycine (100 µg/ml) ont été soumis à

incubation pendant 45 minutes dans des colonnes à laine de nylon équilibrées, suivant la méthode de Julius et al. (Eur. J. Immunol. 3, 645, 1973). Les populations de cellules de l'effluent enrichies avec le précurseur de cellules T ont été utilisées pour les essais biologiques.

ESSAIS BIOLOGIQUES D'INDUCTION: On a mis à incuber à 37° pendant 18 heures 0.5×10^6 cellules d'effluent dans 0.1 ml de support, avec 0,1 ml de tripeptide ou avec le support seul. Les cultures ont été réalisées en double. A la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées de chlorure d'ammonium à 0,87% afin de provoquer l'hydrolyse des globules rouges, et ensuite avec le HBSS.

L'induction de l'antigène de membrane Thy 1.2 a été déterminée par un essai direct d'immunofluorescence.

IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE: Les cellules ont été mises à incuber à 4° pendant 20 minutes avec un anticorps monoclonal conjugué à la fluorescéine (Bio-Yeda) à une dilution de 1:200. Le mélange a été centrifugé à 300 g pendant 5 minutes, lavé deux fois dans du HBSS, puis mis en suspension en vue du comptage au microscope à fluorescence (Orthoplan Leitz).

La différence des pourcentages de cellules fluorescentes entre les cultures avec et sans tripeptide a donné une indication de l'activité d'induction du produit.

RESULTATS: Comme indiqué au tableau, le tripeptide provoque l'apparition du marqueur Thy 1.2 sur des cellules T immatures, avec une réponse optimale à 10 mcg/ml. La courbe donnant la relation entre la dose et la réponse présente une forme en cloche vu que les concentrations plus faibles et plus élevées du peptide donnent lieu à une induction plus faible.

CONCENTRATION TRIPEPTIDE (mcg/ml)	% THY 1.2 + CELLULES	
	MOYENNE $\pm$ E.S	DIFFERENCE
0	11 $\pm$ 1,6	-
0,0001	13 $\pm$ 3,9	+ 2
0,001	25 $\pm$ 3,7	+ 14
0,01	36 $\pm$ 3,7	+ 25
0,1	36 $\pm$ 5,4	+ 25
1	41 $\pm$ 1,6	+ 30
10	48 $\pm$ 2,2	+ 37
20	33 $\pm$ 3,3	+ 22
50	29 $\pm$ 3,3	+ 18
100	19 $\pm$ 1,7	+ 8
200	19 $\pm$ 4,5	+ 8

1.8 INDUCTION IN VIVO DE L'ANTIGENE DE THY 1.2

MATERIEL ET METHODES

On administre le ELS2 pendant 4 jours consécutifs, puis les souris ont été maintenues au repos pendant 24 heures; ensuite, les rates ont été enlevées et les cellules examinées pour déterminer l'antigène de Thy 1.2 par fluorescence. Les souris de contrôle ont reçu le support 199 (M 199), qui est le support dans lequel le produit avait été dissous. Les souris avaient un poids moyen d'environ 24g.

RESULTATS

	% DE THY 1.2 + CELLULES	
	Oral	i.p.
Contrôle	2%	4%
ELS2 42 μ g/kg	3%	4%
ELS2 420 μ g/kg	6%	7%
ELS2 1055 μ g/kg	17%	19%
ELS2 2110 μ g/kg	16%	17%
ELS2 4220 μ g/kg	18%	17%
ELS2 8440 μ g/kg	17%	20%

Les données indiquent que le ELS2 est en mesure de provoquer la maturation de splénocytes après administration par voie orale et intra péritonéale.

Le dosage optimal est de 1055 µg/kg, tandis qu'une réponse en palier est observée pour des dosages plus élevés.

2. STIMULATION IN VITRO DE LA PRODUCTION DE LYMPHOCYTES.

MATERIEL ET METHODES

PREPARATION DE CELLULES MONONUCLEAIRES DU SANG HUMAIN PERIPHERIQUE (PBMC).

Du sang périphérique est obtenu de volontaires en bonne santé par ponction veineuse. Les érythrocytes du sang sont séparés des leucocytes sur gradients de Ficoll-Hipaque. La couenne inflammatoire (PBMC) est enlevée et lavée, et les cellules sont remises en suspension à raison de 1×10^5 cellules/ml dans du RPMI 1640 auquel on a ajouté 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de glutamine et 1% de sérum fœtal de veau inactivé par la chaleur (FCS, 56°C 30 min.).

PREPARATION DU FACTEUR DE CROISSANCE

Le PBMC à 1×10^5 cellules/ml dans 1% de FCS inactivé par la chaleur est mis à incuber avec ou sans Phytohémagglutinine (PHA) à une concentration de 0.75% (v/v). Le peptide à essayer est ajouté à la concentration de 1 µg/ml aux cultures appropriées. La période d'incubation est de 18 à 24 heures à 37°C en atmosphère humide. Les cultures sont ensuite filtrées sur des filtres de 0,22 µm et le produit surnageant est examiné pour détecter la présence de facteurs de croissance.

MESURE DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LES PRODUITS SURNAGEANTS

A. Cellules d'essais

Les cellules B utilisées pour détecter la présence du facteur de croissance des cellules B (BCGF) sont des lignées de cellules de culture à long terme maintenues sur BCGF et sont EBV négatives. Ces cellules sont cultivées dans un support exempt de sérum en utilisant du Nutridoma (Boehringer Mannheim Biochemicals), et ne répondent pas au IL-2.

Les cellules T utilisées pour l'essai de détection de la présence d'IL-2 sont fraîchement isolées. Elles ont été stimulées initialement avec du PHA (0,75%) et sont maintenues en culture pendant au moins 10 jours avant leur utilisation (afin de diminuer l'effet du milieu et d'établir leur dépendance par rapport à l'IL-2).

B. Préparation de cellules d'essai pour utiliser dans le contrôle.

1. Les cellules B sont généralement utilisées 4 jours après leur dernière alimentation avec BCGF. Elles sont lavées 4 fois dans RPMI 1640

pour éliminer toutes traces de BCGF et sont ajustées à 15×10^4 cellules/ml dans RPMI 1640 et Nutridoma (à la concentration finale de 1%).

2. Les cellules T sont utilisées 4 jours après la dernière alimentation avec IL-2. Elles sont lavées 4 fois et ajustées à 50×10^4 cellules/ml dans le RPMI 1640 avec 5% FCS.

C. Procédures de contrôle

1. Des cellules B cultivées à long terme sont mises à incuber avec différentes concentrations du produit surnageant provenant de cultures PBMC, dans 96 plaques de micro-titrage à fond plat. Chaque cuvette a un volume total de 200 μ l et comporte 100 μ l de cellules B (15×10^3 cellules) et 100 μ l de produit surnageant. Nous avons examiné l'efficacité de nos cellules B d'essai en les faisant incuber avec différentes concentrations de BCGF purifié (Cellular Products, Inc. Buffalo, N.Y.).

Les cultures sont mises à incuber pendant 24 heures, puis on ajoute 1 μ Ci de ^3H -Tdr/ et on effectue une incubation supplémentaire pendant 12 heures. Les cultures sont ensuite récoltées et soumises à comptage dans un compteur à scintillation.

2. Les cellules T sont mises à incuber dans des cuvettes à fond plat. Le volume total de chaque cuvette est de 200 μ l, ce qui comprend 50×10^3 cellules T par cuvette.

La période d'incubation est de 72 heures et comprend 12 heures de marquage avec ^3H -Tdr/.

RESULTATS

1) PRODUCTION DU FACTEUR DE CROISSANCE

EXPERIENCE 1

ACTIVITE BCGF (C.P.M.)

	% Produit surnageant				
Produit surnageant de	3,05	6,25	12,5	25	50
PBL + PHA	424	1026	1674	3172	8392
PBL + PHA + ELS2	2772	4616	6336	8166	9818
ACTIVITE TCGF (C.P.M.)					
PBL + PHA	542	192	224	564	1144
PBL + PHA + ELS2	384	718	1832	4028	8338

EXPERIENCE 2

ACTIVITE BCGF (C.P.M.)

Produit surnageant de	% de liquide surnageant				
	3,125	6,25	12,5	25	50
PBL + PHA	1369	2187	2894	4876	8104
PBL + PHA+ELS2	2690	4214	7442	8730	11754
ACTIVITE TCGF (C.P.M.)					
PBL + PHA	1482	3146	4322	7184	9012
PBL + PHA+ELS2	2968	6220	9354	12014	12984

3. EFFET SUR LA SYNTHÈSE DE L'ARN

EFFET DU ELS2 SUR LA SYNTHÈSE DE L'ARN DANS DES CELLULES T HUMAINES OBSERVE PAR INCORPORATION DE ^3H -URIDINE. COMPTAGE PAR MINUTE (CPM). RESULTATS OBTENUS APRES 24 HEURES D'INCUBATION.

T 3732
T + PHA 20752

	Concentration ELS2 $\mu\text{g/ml}$			
	0,1	1	10	20
T + ELS2	4741	4834	5086	5130
T + ELS2 + PHA	31000	31413	32706	31494

4. EFFET SUR LA SYNTHÈSE DE L'ADN

EFFET DU ELS2 SUR LA SYNTHÈSE DE L'ADN DANS DES CELLULES T HUMAINES, OBSERVE PAR INCORPORATION DE ^3H -THYMIDINE. COMPTAGE PAR MINUTE (CPM). RESULTATS OBTENUS APRES 3 JOURS D'INCUBATION

T 154
T + PHA 6076

	Concentration ELS2 $\mu\text{g/ml}$			
	0,01	0,1	1	10
T + ELS2	152	166	190	234
T + ELS2 + PHA	5758	6477	7548	12317

5. AUGMENTATION DU NOMBRE DE CELLULES IN VITRO

Le tripeptide, ajouté aux cultures soit de lymphocytes T soit de mélanges de lymphocytes T et B tous les quatre jours à une concentration de $5 \mu\text{g/ml}$ pendant une période de 30 jours, est en mesure d'augmenter le nombre de cellules, avec un maximum de + 50% par rapport aux cultures témoin, observé entre le 10ème et le 15ème jour de l'expérience.

ETUDES TOXICOLOGIQUES

TOXICITE AIGUE

Des études de toxicité aigue effectuées sur des souris et des rats ont montré que, jusqu'à des doses de 100 mg/kg/i.m., le tripeptide est totalement exempt d'effets toxiques.

TOLERABILITE

Des études sur des lapins et des souris ont montré que le produit, à la dose de 100 mg/kg respectivement i.v. et i.p. ne produit aucune modification hémodynamique, et n'a pas d'effet sur le comportement. En particulier le temps d'endormissement ne présente qu'une légère augmentation.

ACTIVITE ALLERGENE

A la dose de 100 mg/kg i.m., le produit ne provoque aucun phénomène de sensibilisation du cobaye.

SELS DU TRIPEPTIDE

Les recherches décrites ci-dessus ont été effectuées avec un acétate du tripeptide, quoique l'on sache bien, dans l'état actuel de la technique, que des résultats semblables peuvent être obtenus en utilisant d'autres sels, comme par exemple un trifluoracétate, un chlorhydrate, un sulfate.E

REVENDEICATIONS

1. Tripeptide constitué de L-Ala (alanine) et 2 L-Arg (arginine) et ayant la structure suivante:

Arg-Ala-Arg

2. Tripeptide selon la revendication 1 ayant une activité immunostimulante.

3. Tripeptide selon la revendication 1, ayant une utilisation thérapeutiques possibles comme médicament dans des pathologies caractérisées par une déficience primaire et secondaire du système immunitaire.

4. Tripeptide selon la revendication 1 capable d'exercer une activité immunostimulante après administration orale et parentérale.

5. Sels pharmaceutiquement acceptables du tripeptide ayant une utilisation possible comme médicament selon la revendication 3, par exemple un acétate, un trifluoroacétate, un chlorhydrate, un sulfate.

11.

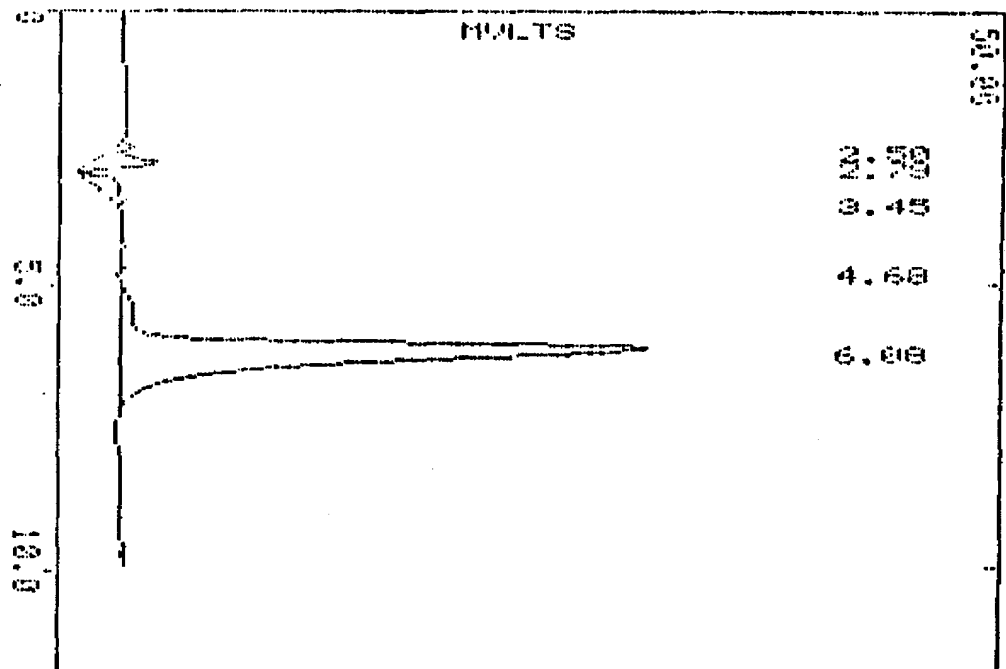


Figure 1



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8700377
BO 203

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, 1986, page 684, résumé no. 97924b, Columbus, Ohio, US; C. CONDE et al.: "Synthesis of mixed stereoregular arginine oligopeptides", & ZH. OBSHCH. KHIM. 1986, 56(3), 724-5 * Résumé *	1	C 07 K 5/08 A 61 K 37/02
A	EP-A-0 016 611 (ORTHO PHARM.) * En entier *	1-3	
A	FR-A-2 118 134 (V. ASSAD MAJJAR) * Page de garde; pages 1-4,30 *	1-3	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			C 07 K 5/00 A 61 K 37/00
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12-04-1988		RAJIC M.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8700377

BO 203

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 03/05/88

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0016611	01-10-80	US-A- 4215112	29-07-80
		AU-A- 5631280	18-09-80
		JP-A- 55143945	10-11-80
		CA-A- 1141375	15-02-83
		AT-T- 4452	15-09-83
		AU-B- 531556	25-08-83
FR-A- 2118134	28-07-72	DE-A, C 2124003	22-06-72
		US-A- 3778426	11-12-73
		GB-A- 1364497	21-08-74
		CA-A- 999851	16-11-76
		CH-A- 605672	13-10-78