

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 18581

(54)

Procédé pour séparer la myelopéroxydase et composition pharmaceutique contenant de la myelopéroxydase.

(51)

Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 N 9/08; A 61 K 33/00, 37/50.

(22)

Date de dépôt..... 27 août 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : Japon, 28 décembre 1979, n° 172109/79, 22 février 1980, n° 22113/80.

(41)

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 27 du 3-7-1981.

(71)

Déposant : Société dite : THE GREEN CROSS CORPORATION, résidant au Japon.

(72)

Invention de : Eichi Hasegawa et Takashi Kobayashi.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Société de protection des inventions,
25, rue de Ponthieu, 75008 Paris.

La présente invention concerne un procédé pour séparer et récupérer la myéloperoxydase à partir de leucocytes myélogènes humains, et un médicament germi-
5 cide contenant de la myéloperoxydase comme principal constituant.

La myéloperoxydase est une enzyme qu'Agner fut le premier à découvrir en 1941 dans les leucocytes animaux (Agner, Acta Physiol. Scand., 2, Suppl., 8
10 (1941)). Elle est présente en grande quantité en même temps que le lysozyme dans les globules blancs myélogènes, en particulier dans les leucocytes polynucléaires neutrophiles et dans les monocytes, sa proportion étant de 5 % par rapport au poids des neutrophiles.

15 Cette enzyme est de caractère basique et présente une masse moléculaire de l'ordre de 120 000 à 150 000 Dalton. Sa molécule est constituée de deux sous-ensembles analogues et contient deux atomes de fer dont l'un se trouve sous forme hème et l'autre sous forme non
20 hème. Elle appartient à un groupe d'oxydoréductases.

Il semble que la fonction physiologique de la myéloperoxydase soit de produire, en présence de peroxyde d'hydrogène et d'ions halogènes, un ion hypo-halogénure qui possède un puissant pouvoir oxydant et un
25 fort caractère halogénant, ce qui a pour effet de produire des modifications irréversibles dans la partie de protéine ou d'acide nucléique des bactéries, des champignons, des virus, etc. Ce mécanisme est vraisemblablement à l'origine de l'effet pharmacologique de la myéloper-
30 oxydase, qui se traduit par exemple par la destruction de bactéries et de virus ou par leur inactivation.

Comme décrit ci-dessus, les propriétés de la myéloperoxydase montrent qu'il s'agit d'une substance pharmaceutiquement intéressante. Cependant, lorsque la
35 myéloperoxydase est isolée à partir d'espèces animales éloignées, elle présente des dangers biologiques car

elle provoque des effets secondaires dus à la réaction antigène-anticorps, ce qui rend difficile sont administration de façon régulière. En outre, la myéloperoxydase d'origine humaine est très difficile à obtenir en
5 grandes quantités en raison du nombre limité de sources. Pour les raisons indiquées ci-dessus, on considère généralement que la myéloperoxydase ne peut pas avoir d'applications cliniques, de sorte qu'elle n'a jamais été utilisée dans la pratique.

10 Dans ces circonstances, la demanderesse a entrepris des études approfondies pour isoler et purifier la myéloperoxydase d'origine humaine à l'échelle industrielle. A la suite de ces recherches, il a été découvert qu'en mélangeant une suspension aqueuse d'un
15 produit désintégré de leucocytes myélogènes humains à au moins une substance choisie parmi les sels de manganèse et le sulfate de protamine, la suspension se séparait en un liquide surnageant contenant la myéloperoxydase et en un précipité d'impuretés. On a en outre découvert que l'on pouvait séparer et récupérer une
20 myéloperoxydase humaine de haute pureté à l'échelle industrielle de ce liquide surnageant en récupérant tout d'abord une fraction contenant de la myéloperoxydase par centrifugation et en mettant en contact cette
25 fraction avec un échangeur de cations pour adsorber la myéloperoxydase que l'on peut ensuite éluer et récupérer.

La demanderesse a en outre entrepris des études sur la myéloperoxydase et elle a découvert qu'une composition comprenant de la myéloperoxydase et un halogénure
30 de métal alcalin dans des proportions bien définies, pouvait produire, en l'absence de peroxyde d'hydrogène, l'effet pharmacologique mentionné ci-dessus sur les micro-organismes, dont le système synthétiseur de catalase est déficient ou affaibli. On a découvert de plus
35 que cette composition pouvait être administrée en quantités importantes par injection, de sorte que l'on peut

s'attendre à un effet thérapeutique spectaculaire de la myéloperoxydase sur les maladies provoquées par une infection par les micro-organismes décrits ci-dessus. La présente invention a été réalisée sur la base de ces
5 découvertes.

L'invention a pour but de fournir un procédé pour récupérer la myéloperoxydase à partir de leucocytes myélogènes humains à l'échelle industrielle.

10 L'invention a également pour but de fournir une composition pharmaceutique contenant de la myéloperoxydase, agissant contre des micro-organismes dont le système synthétiseur de catalase est déficient ou affaibli.

15 D'autres buts et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après.

L'invention concerne un procédé pour la séparation et la récupération de myéloperoxydase, qui consiste à mélanger une dispersion aqueuse d'un produit
20 de désintégration de leucocytes myélogènes humains, à au moins une substance choisie parmi les sels de manganèse et le sulfate de protamine, et à séparer et récupérer la myéloperoxydase de la liqueur surnageante ; elle concerne en outre un procédé pour la séparation
25 et la récupération de myéloperoxydase par séparation par centrifugation d'une fraction de myéloperoxydase de cette liqueur surnageante, puis mise en contact de la fraction obtenue avec un échangeur de cations afin d'adsorber la myéloperoxydase sur celui-ci. Selon un
30 autre mode de réalisation de l'invention, un traitement thermique peut être effectué au cours de l'une des étapes du procédé ci-dessus, à une température de 50°C ou davantage, et de préférence, de 50°C à 80°C, pendant 8 à 36 heures.

De plus, l'invention concerne une composition pharmaceutique efficace contre les micro-organismes dont le système de synthèse de la catalase est déficient ou affaibli, qui comprend de 5 à 0,05 mmoles d'un halogénure de métal alcalin pour 100 à 0,05 unités de myéloperoxydase.

Le produit de départ servant à la récupération de la myéloperoxydase est un produit de désintégration de leucocytes myélogènes humains contenant la myéloperoxydase à séparer et à récupérer.

Chez l'homme, les leucocytes représentent généralement de 60 à 70 % des globules blancs considérés au sens large, ne contenant pas de pigment respiratoire présent dans le sang (ces globules blancs seront désignés ci-après sous le nom de "globules blancs au sens large"). Bien que l'on puisse utiliser le produit de désintégration de ces leucocytes comme produit de départ pour le présent procédé, on préfère néanmoins éliminer préalablement les constituants solides du sang tels que les érythrocytes et les plaquettes ainsi que le plasma sanguin. Actuellement, les globules blancs au sens large sont utilisés dans le but de se servir des lymphocytes qu'ils contiennent pour la production induite de l'interféron qui paraît intéressant comme agent antimicrobien à large spectre. Les leucocytes résiduels restant après séparation de l'interféron peuvent bien sûr être utilisés comme produit de départ.

On obtient le produit de désintégration de leucocytes myélogènes humains utilisé dans le présent procédé en désintégrant les substances brutes indiquées ci-dessus. La désintégration s'effectue ordinairement par traitement d'une suspension aqueuse de leucocytes dans un homogénéiseur à 0°C pendant 5 minutes.

Avant de la soumettre à l'étape suivante qui consiste à la mélanger à au moins une substance choisie parmi les sels de manganèse et le sulfate de protamine, la suspension aqueuse ci-dessus est de pré-
5 férence séparée par centrifugation (10 000 tours/mn) en un précipité et une couche surnageante. On recueille le liquide surnageant d'un vert jaunâtre, qui constitue la fraction contenant la myéloperoxydase et on le met en suspension dans cinquante à cent fois (en volume)
10 sa quantité d'une solution tampon (pH 6,0-8,0) contenant du sulfate de potassium ou du TRIS et 5 à 15 % (pds/vol) de sulfate d'ammonium. On homogénéise ensuite la suspension obtenue.

Dans l'étape suivante, on mélange la suspension homogénéisée à au moins un composé choisi parmi les sels de manganèse et le sulfate de protamine. L'ad-
15 dition d'un sel de ce type a pour effet de retenir la myéloperoxydase dans la couche surnageante et de rendre très aisée sa séparation et sa récupération. Comme sels
20 de manganèse appropriés, on citera les composés du manganèse qui sont capables de produire des ions manganèse, tels que le sulfate de manganèse, le nitrate de manganèse ou le chlorure de manganèse. Parmi ceux-ci, on préfère le sulfate de manganèse. La quantité de sel
25 de ce type à ajouter est telle que la concentration finale atteigne généralement 5 à 20 mM, et de préférence, 8 à 10 mM pour les sels de manganèse et 0,1 à 0,02 % (pds/vol), et de préférence 0,2 à 0,01 (pds/vol) pour le
30 sulfate de protamine. Après addition du sel, la suspension est soumise à une centrifugation (à 10 000 tours/mn) pour récupérer la fraction de myéloperoxydase, c'est-à-dire le liquide surnageant, que l'on soumet
ensuite à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations pour séparer la myéloperoxydase. Avant de le
35 soumettre à la chromatographie sur colonne, il est préférable de dialyser et de centrifuger le liquide surnageant pour éliminer le précipité.

La myéloperoxydase, de préférence adsorbée sur l'échangeur de cations, est ensuite éluée et récupérée. On peut utiliser sans restrictions particulières des échangeurs de cations d'acidités diverses allant de pH
5 fortement acides à des pH faiblement acides. L'adsorption est sensiblement plus efficace à un pH de 5,5 à 8,0, en particulier de 7,0 à 7,5. Dans la pratique, il est préférable d'effectuer l'adsorption dans un tampon de faible concentration (par exemple dans un tampon de
10 10-80 mM de phosphate ou dans une solution de 50-80 mM de phosphate acide dipotassique) dont le pH est ajusté. L'éluution est effectuée tout d'abord par lavage avec une solution tampon équilibrée, puis par traitement par des solutions tampons de concentrations salines croissantes (dans un mode de réalisation préféré, la concentration en phosphate passe progressivement de 80 mM à
15 400 mM), ce qui permet de récupérer la fraction contenant de la myéloperoxydase.

L'effluent aqueux recueilli est de couleur
20 verte et le rendement en myéloperoxydase récupérée est d'environ 40 %. A titre d'exemple, on obtient au total 8 815 unités de myéloperoxydase (valeur déterminée selon le procédé de B. Chance et al., décrit dans "Methods in Enzymology", II, p. 764 (1955)) à partir de $1,47 \cdot 10^{11}$
25 leucocytes. La solution aqueuse de myéloperoxydase ainsi obtenue est soumise à une série de traitements courants dans la production des substances pharmaceutiques, comme la dialyse, la filtration aseptique, l'introduction dans des flacons et la lyophilisation, de façon à la
30 présenter sous forme d'un produit pharmaceutique.

Si nécessaire, on peut compléter le procédé de l'invention par une étape de traitement thermique à 50°C-70°C pendant 8 à 36 heures. Ce traitement est effectué dans une solution aqueuse ou dans une suspension aqueuse de pH 5 à 8 dans le but d'inactiver les
35

divers virus et bactéries susceptibles de contaminer la préparation de sang. Ceci-ci peut être réalisé à n'importe quel stade du procédé. Lorsque l'on chauffe les leucocytes myélogènes, c'est-à-dire le produit
5 brut, on obtient simultanément l'élimination de substances thermolabiles par précipitation, ce qui conduit à une augmentation du degré de purification. Il est clair que l'on peut également traiter thermiquement le produit final.

10 Un mode de réalisation préféré de l'invention consiste en outre à affectuer une étape de filtration sur gel. Lors de cette étape, on utilise un support adapté à la séparation d'une substance ayant une masse
15 moléculaire d'environ 3 000 à 150 000 Dalton (comme des gels de polyacrylamide tels que le Sephadex G-200 et le Biogel P-300 ou des gels d'agarose tels que la Sepharose 6B). Il est préférable de soumettre le produit à une filtration sur gel après l'avoir traité par l'échangeur de cations. Le traitement de filtration sur
20 gel permet d'éliminer les impuretés de faibles masses moléculaires et d'obtenir un produit présentant une uniformité satisfaisante par analyse électrophorétique (avec un gel de pH 4,0 ; 1,5 heure d'électrophorèse à la température ambiante).

25 Le procédé de l'invention décrit ci-dessus permet de produire une myéloperoxydase humaine de haute pureté avec un rendement élevé et à l'échelle industrielle. Comme ce produit ne contient pratiquement pas d'impuretés et qu'il est d'origine humaine, il peut
30 être utilisé en tant que produit pharmaceutique sans danger et sans risques d'effets secondaires dus à la présence d'antigènes protéiniques hétérogènes.

Dans la composition pharmaceutique de l'invention, la myéloperoxydase purifiée par le présent procédé
35 est utilisée de façon préférentielle mais non exclusive,

et l'on peut utiliser toutes celles qui ont été produites par des procédés fournissant un degré de purification aussi élevé que celui obtenu par le présent procédé.

5 L'halogénure de métal alcalin utilisé dans l'invention peut être n'importe lequel des halogénures pharmacologiquement acceptables tels que des chlorures et des iodures de métaux alcalins (comme le potassium et le sodium).

10 La proportion d'halogénure de métal alcalin dans la composition est généralement de 5 à 0,05 mmoles, et de préférence de 1 à 0,1 mmole pour 100 à 0,5 unités de myéloperoxydase.

La composition pharmaceutique de l'invention
15 est préparée par l'un quelconque des procédés classiques, après addition d'un halogénure de métal alcalin à la myéloperoxydase purifiée. Si nécessaire, on peut incorporer à cette composition n'importe lequel des supports diluants, stabilisants, activateurs et conservateurs pharmaceutiques connus.
20

La composition pharmaceutique ainsi préparée présente in vivo une activité germicide prononcée contre des micro-organismes pathogènes dont l'activité de
25 synthèse de la catalase est déficiente ou affaiblie. La composition présente également un effet thérapeutique sur les maladies provoquées par l'infection par ces micro-organismes. Le terme de "micro-organismes pathogènes dont l'activité de synthèse de la catalase est déficiente ou affaiblie" tel qu'il est utilisé ici
30 désigne les micro-organismes pathogènes dont l'activité productrice de catalase est déficiente ou amoindrie chez un organisme vivant infecté par ces micro-organismes. Comme exemple typique de ces micro-organismes, on citera un myobacterium tuberculosis résistant à l'isoniazide
35 (INH). La composition pharmaceutique de l'invention est

donc utile pour traiter une maladie telle que la tuberculose réfractaire qui est résistante à la chimiothérapie et aux agents antibiotiques.

5 A titre d'exemple, dans le cas d'une injection, la présente composition est dissoute avant utilisation dans du sérum pour injection pour obtenir environ 100 à 1 000 unités/ml de solution de myéloperoxydase et administrée, de préférence localement, à un organisme vivant.

10 L'administration peut être effectuée par voie parentérale. Bien que l'administration locale soit préférable, la présente composition peut être appliquée de façon externe. Dans la pratique, on peut par exemple l'administrer par voie intraveineuse (dans le cas d'une
15 maladie intéressant l'organisme entier telle qu'une septicémie ou une tuberculose miliaire), intramusculaire, ou par pulvérisation dans les conduits aériens.

La dose de la présente composition à administrer à un organisme vivant dépend du mode d'administration, de la maladie à traiter et des symptômes. Dans
20 le cas d'une injection intraveineuse ou d'une administration locale, la dose quotidienne pour un adulte est comprise entre 100 et 1 unités/kg de poids corporel.

L'effet germicide déterminé à partir d'essais sur des animaux et la toxicité aiguë de la présente composition sont décrits ci-après. L'unité d'activité de la myéloperoxydase a été déterminée selon le procédé décrit par B. Chance et al. dans "Methods in Enzymology", II, 764 (1955).

30 1 - Effet germicide :

Pour évaluer l'effet germicide de la présente composition pharmaceutique, diverses compositions comprenant de la myéloperoxydase et un halogénure ont été préparées. L'effet de la présence de peroxyde d'hydrogène
35 a été étudié à titre de comparaison. L'essai a été réalisé en dissolvant chaque constituant dans un tampon de

phosphate de sodium 0,1 M (pH 7,0) pour préparer un mélange d'essai comprenant 1 ml d'une solution aqueuse de myéloperoxydase, 1 ml d'une solution d'iodure de potassium (la teneur en KI est indiquée dans le

5 Tableau 1), 1 ml d'une solution de peroxyde d'hydrogène (la teneur en H_2O_2 est indiquée dans le Tableau 1) et 1 ml d'une suspension bactérienne, puis en faisant incuber chaque mélange à 37°C pendant 60 mn, et en comptant le nombre de bactéries ayant survécu. Les

10 résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 1.

TABLEAU 1

| Constituant | | Nombre de bactéries survivantes | | | | | |
|---------------------------------|---------------|---|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|---|---|
| Myéloper- oxidase, unités | KI, mmoles | H ₂ O ₂ , mmoles | Staphylo- coccus aureus | Pseudomonas aeruginosa | Candida albicans | Myco- bacterium tubercu- losis | Myco- bacterium tubercu- losis résistante au INH |
| 100 | 5,0 | 2,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | " | " | " | " | " | " | " |
| 1 | " | " | " | " | " | " | " |
| 0,1 | " | " | 3,2 × 10 | 2,9 × 10 | 2,8 × 10 | 3,1 × 10 | 1,8 × 10 |
| 0,01 | " | " | 2,5 × 10 ³ | 3,1 × 10 ³ | 3,1 × 10 ² | 2,8 × 10 ² | 1,3 × 10 ³ |
| 0 | " | " | 3,8 × 10 ⁵ | 2,0 × 10 ⁷ | 1,3 × 10 ⁶ | 1,1 × 10 ⁶ | 1,2 × 10 ⁶ |
| 100 | 1,0 | " | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | " | " | " | " | " | " | " |
| 1 | " | " | " | " | " | " | " |
| 0,1 | " | " | 4,5 × 10 | 3,3 × 10 | 2,3 × 10 | 2,1 × 10 | 2,4 × 10 |
| 0,01 | " | " | 3,1 × 10 ³ | 4,2 × 10 ² | 2,1 × 10 ² | 1,8 × 10 ² | 1,9 × 10 ² |
| 0 | " | " | 2,2 × 10 ⁶ | 1,4 × 10 ⁷ | 1,3 × 10 ⁶ | 1,6 × 10 ⁶ | 1,3 × 10 ⁶ |
| | | | | | | | ... |

TABLEAU 1 (suite)

| 100 | 0,1 | 2,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
|------|-------|-----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 20 | " | " | " | " | " | " | " | " | " |
| 1 | " | " | " | " | " | " | " | " | " |
| 0,1 | " | " | 3,8 × 10 ² | 4,4 × 10 ² | 1,8 × 10 ³ | 1,9 × 10 ² | 1,8 × 10 ³ | 1,9 × 10 ² | 1,8 × 10 ³ |
| 0,01 | " | " | 4,1 × 10 ³ | 4,6 × 10 ² | 4,8 × 10 ³ | 2,1 × 10 ³ | 2,9 × 10 ³ | 2,1 × 10 ³ | 2,9 × 10 ³ |
| 0 | " | " | 3,4 × 10 ⁶ | 1,1 × 10 ⁷ | 1,3 × 10 ⁷ | 1,1 × 10 ⁷ | 1,0 × 10 ⁷ | 1,1 × 10 ⁷ | 1,0 × 10 ⁷ |
| 100 | 0,01 | 2,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | " | " | 3,1 × 10 | 2,8 × 10 | 2,1 × 10 | 1,9 × 10 | 1,3 × 10 | 1,9 × 10 | 1,3 × 10 |
| 1 | " | " | 1,3 × 10 ² | 1,9 × 10 ² | 2,5 × 10 ² | 2,1 × 10 ² | 5,1 × 10 | 2,1 × 10 ² | 5,1 × 10 |
| 0,1 | " | " | 1,5 × 10 ³ | 2,3 × 10 ⁴ | 1,8 × 10 ³ | 2,3 × 10 ³ | 1,3 × 10 ² | 2,3 × 10 ³ | 1,3 × 10 ² |
| 0,01 | " | " | 5,4 × 10 ⁵ | 4,8 × 10 ⁵ | 2,1 × 10 ⁵ | 1,8 × 10 ⁴ | 1,9 × 10 ³ | 1,8 × 10 ⁴ | 1,9 × 10 ³ |
| 0 | " | " | 3,3 × 10 ⁶ | 1,9 × 10 ⁷ | 1,1 × 10 ⁷ | 1,4 × 10 ⁶ | 1,1 × 10 ⁷ | 1,4 × 10 ⁶ | 1,1 × 10 ⁷ |
| 100 | 0,001 | " | 1,5 × 10 ⁵ | 4,8 × 10 ⁴ | 1,8 × 10 ⁴ | 1,3 × 10 ⁴ | 1,5 × 10 ⁴ | 1,3 × 10 ⁴ | 1,5 × 10 ⁴ |
| 20 | " | " | 1,8 × 10 ⁵ | 5,3 × 10 ⁴ | 2,3 × 10 ⁴ | 1,9 × 10 ⁵ | 2,5 × 10 ⁴ | 1,9 × 10 ⁵ | 2,5 × 10 ⁴ |
| 1 | " | " | 1,4 × 10 ⁶ | 1,1 × 10 ⁵ | 3,1 × 10 ⁵ | 3,1 × 10 ⁵ | 3,1 × 10 ⁵ | 3,1 × 10 ⁵ | 3,1 × 10 ⁵ |
| 0,1 | " | " | 1,8 × 10 ⁶ | 1,3 × 10 ⁶ | 3,9 × 10 ⁵ | 2,8 × 10 ⁶ | 3,9 × 10 ⁵ | 2,8 × 10 ⁶ | 3,9 × 10 ⁵ |

TABLEAU 1 (suite)

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|-------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0,01 | 0,001 | 2,0 | $2,1 \times 10^6$ | $4,8 \times 10^6$ | $2,1 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^6$ |
| 0 | " | " | $2,9 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^7$ | $2,1 \times 10^7$ | $2,1 \times 10^7$ |
| 20 | 1,0 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 1,0 | 0 | $3,4 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^6$ | $1,2 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^6$ |
| 20 | 0 | 0 | $1,1 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^6$ | $1,9 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^6$ |
| 0 | 2,0 | 0 | $2,2 \times 10^7$ | $7,1 \times 10^6$ | $3,1 \times 10^6$ | $4,1 \times 10^6$ | $5,1 \times 10^6$ |
| Nombre initial de bactéries dans 1 ml | | | $3,7 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^7$ | $2,9 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ |

2 - Expérience sur les animaux :

1) L'effet de la présente composition pharmaceutique (50 unités de myéloperoxydase et 2 mmoles d'iodure de sodium par ml) sur la maladie infectieuse

- 5 expérimentale provoquée par le myobacterium tuberculosis a été évalué en utilisant trois groupes de rats de souche Wistar d'un poids corporel de 200 à 250 g, chaque groupe comprenant cinq rats.

- Des myobacteria tuberculosis au nombre de
10 $3,7 \times 10^8$ résistantes à l'INH ont été mises en suspension dans 1 ml d'une solution aqueuse et 0,05 ml de la suspension ainsi obtenue a été injecté dans la cavité nasale de chaque rat.

- Le premier groupe de rats a été utilisé comme
15 groupe témoin et n'a pas reçu de composition pharmaceutique. Le second groupe a été soumis à une pulvérisation de la présente composition quatre fois en 8 heures, deux semaines après l'inoculation du bacille, en utilisant
20 chaque fois 2 ml de la composition et en pulvérisant pendant 15 minutes. Le troisième groupe a été soumis à une pulvérisation de la composition pendant 15 minutes avant l'inoculation de l'injection de bacilles et a été soumis à quatre pulvérisations après l'injection des
25 bacilles. La pulvérisation a été effectuée en plaçant le rat dans un dessiccateur de 35 cm de diamètre muni d'un double fond et un brouillard de la composition pharmaceutique produit au moyen d'un vaporisateur a été introduit sous le double fond et libéré depuis la partie supérieure du dessiccateur.

- 30 L'effet pharmaceutique a été évalué sur la base de la mortalité des rats au bout de six mois. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau 2.

TABLEAU 2

Nombre de rats survivants

| | | |
|---|-------------|-----|
| | 1er groupe | 0/5 |
| | 2ème groupe | 5/5 |
| 5 | 3ème groupe | 5/5 |

Comme il ressort du Tableau 2, tous les rats du groupe n'ayant pas reçu de composition pharmaceutique meurent, alors que tous les rats des groupes traités sont vivants.

10 2) Un essai de toxicité aiguë a été effectué par administration de 2 130 unités/kg de myéloperoxydase et de 210 mg/kg d'iodure de sodium à un groupe de quatre souris mâles de souche dd pesant 16,5-20,0 g.

15 La composition pharmaceutique a été administrée dans la veine coccygienne. Soixante douze heures et sept jours après l'administration, toutes les souris étaient vivantes et en bonne condition physique. Lors de l'autopsie pratiquée au bout de sept jours, aucune anomalie n'a été observée dans les organes internes

20 de toutes les souris.

Sur la base des résultats obtenus ci-dessus, on peut estimer que l'effet thérapeutique se manifestera chez l'homme par administration de 100 à 0,05 unités totales de myéloperoxydase et de 5 à 0,05 mmoles d'un

25 halogénure.

La présente invention permet pour la première fois d'utiliser de la myéloperoxydase sous forme d'un produit pharmaceutique et de disposer d'une excellente composition pharmaceutique ayant un effet thérapeutique

30 prometteur et sans précédent.

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

Exemple 1

On traite environ 1 litre d'une suspension de
5 $1,47 \times 10^{11}$ globules blancs (globules blancs au sens large) à 0°C pendant 5 mn dans un homogénéiseur fonctionnant à 30 000 tours/mn pour les désintégrer. On soumet la suspension ainsi obtenue à une centrifugation à 0°-10°C pendant 20 mn, ce qui donne un liquide
10 surnageant d'un vert jaunâtre (activité totale de 22 493 unités). On ajoute du sulfate de manganèse au liquide surnageant jusqu'à une concentration finale de 5 à 10 mM. On élimine le précipité par centrifugation. On dessale le liquide surnageant par dialyse contre une
15 solution aqueuse de 80 mM de phosphate acide dipotassique en utilisant un tube de cellophane comme membrane semiperméable. On introduit la solution dessalée dans une colonne garnie d'environ 60 ml de CM-Sephadex C-50 (Pharmacia Co., Suède) préalablement équilibrée par un
20 solution aqueuse de 80 mM de phosphate acide disodique. On lave la colonne avec la même solution aqueuse que celle utilisée pour l'équilibrage, puis on l'élue par la méthode du gradient de concentration linéaire en utilisant des solutions aqueuses de phosphate acide
25 dipotassique 80 mM et 400 mM. On récupère la fraction souhaitée de l'éluat en mesurant les absorbances à 280 nm et à 430 nm, cette dernière longueur d'onde étant caractéristique de la myéloperoxydase.

Exemple 2

30 On répète le mode opératoire de l'exemple 1, excepté que l'on utilise du sulfate de protamine (concentration finale : 0,1 à 0,02 %) au lieu de sulfate de manganèse ; que l'on utilise du SP-Sephadex C-50 (Pharmacia Co.) équilibré par une solution tampon de
35 phosphate 50 mM (pH 7,5) au lieu du CM-Sephadex C-50 ;

et qu'après lavage de la colonne par du phosphate
acide dipotassique 50 mM, on élue la colonne par la
méthode du gradient de concentration linéaire en uti-
lisant des solutions de phosphate acide dipotassique
5 50 mM et 200 mM. Les résultats obtenus sont semblables
à ceux de l'exemple 1.

Exemple 3

Des résultats semblables à ceux de l'exemple 1
sont obtenus en répétant le mode opératoire de l'exemple
10 1, excepté que l'on ajuste le pH de la fraction de
myéloperoxydase recueillie à 5-7, et qu'on la traite
thermiquement à 60°C pendant une heure.

Exemple 4

Après l'étape finale de l'exemple 1, on soumet
15 le produit à une filtration sur gel en utilisant du
Sephadex G-200 (colonne de 2,5 x 16 cm ; après avoir été
équilibrée par une solution tampon de phosphate 0,1 M
de pH 7,0, la colonne a été développée avec le même
tampon que celui utilisé lors de l'équilibrage). On
20 obtient ainsi un produit de haute pureté. Les augmen-
tations de la pureté et du rendement sont indiquées
dans le Tableau 3.

TABLEAU 3

| Moyen de purification | Volume total (ml) | Absorbance | | | Activité totale (unités) | Rendement (%) |
|-------------------------------------|-------------------|------------|---------|---------------|--------------------------|---------------|
| | | (280 nm) | (430nm) | (430nm/280nm) | | |
| Solution de l'extrait | 1.059 | 15,18 | - | - | 22.493 | 100 |
| Solution dialysée | 1.170 | 5,53 | 0,281 | 0,05 | 12.747 | 56,7 |
| Après traitement par du CM-Sephadex | 282 | 0,305 | 0,204 | 0,67 | 8.815 | 39,2 |
| Après filtration sur gel | 47 | 1,170 | 0,974 | 0,83 | 5.182 | 23,0 |

Exemple de préparation pharmaceutique 1 (injection
et pulvérisation)

5 On introduit de façon aseptique des solu-
tions pharmaceutiques dans des flacons bruns de telle
façon que chaque flacon contienne 100 unités de myélo-
peroxydase et 3 mmoles d'iodure de sodium, puis on les
lyophilise et on les scelle. Immédiatement avant l'uti-
lisation, on ajoute à chaque flacon 5 ml de sérum phy-
siologique pour injection pour dissoudre le contenu
10 et obtenir une préparation pour injection.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour séparer la myéloperoxydase, caractérisé en ce qu'il consiste à mélanger une suspension aqueuse d'un produit de désintégration de leucocytes myélogènes humains à au moins une substance choisie parmi les sels de manganèse et le sulfate de protamine, puis à séparer et récupérer la myéloperoxydase de la liqueur surnageante.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séparation et la récupération de la myéloperoxydase sont effectuées par récupération par centrifugation d'une fraction contenant la myéloperoxydase à partir de la liqueur surnageante et par mise en contact de la fraction récupérée avec un échangeur de cations pour adsorber la myéloperoxydase sur celui-ci.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue un traitement thermique à 50°-70°C pendant huit à trente-six heures à n'importe quel stade de la séparation de la myéloperoxydase.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le sel de manganèse est le sulfate de manganèse, le nitrate de manganèse ou le chlorure de manganèse.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la quantité de sel de manganèse à ajouter correspond à une concentration finale de 5 à 20 mM et en ce que la quantité de sulfate de protamine à ajouter correspond à une concentration finale de 0,1 à 0,02 % (pds/vol.).

6. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la mise en contact avec l'échangeur de cations est effectuée à pH 5,5 - 8,0.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le produit récupéré est en outre soumis à une filtration sur gel.

5 8. Composition pharmaceutique agissant contre des micro-organismes dont l'activité de synthèse de la catalase est déficiente ou affaiblie, caractérisée en ce qu'elle comprend de 5 à 0,05 mmoles d'un halogénure de métal alcalin pour 100 à 0,05 unités de myéloperoxydase obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10 9. Composition pharmaceutique selon la revendication 8, caractérisée en ce que les micro-organismes dont l'activité de synthèse de la catalase est déficiente ou affaiblie sont des myobacteria tuberculosis résistantes à l'isoniazide.

15 10. Composition pharmaceutique selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'halogénure de métal alcalin est un chlorure ou un iodure de potassium ou de sodium.