

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑲

N° 79 19652

⑤4 Nouvelles glycoprotéines de *Klebsiella pneumoniae*, procédé d'obtention, application à titre de médicaments et compositions les renfermant.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 21/00; A 61 K 37/02.

②② Date de dépôt..... 31 juillet 1979.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 7 du 13-2-1981.

⑦① Déposant : LABORATOIRE CASSENNE, société anonyme, résidant en France.

⑦② Invention de : Bernard Fournet et René Zaliz.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Jean-Claude Vieillefosse, Roussel-Uclaf,
102, route de Noisy, 93230 Romainville.

La présente invention, à la réalisation de laquelle ont participé Messieurs Bernard FOURNET et René ZALISZ, concerne de nouvelles glycoprotéines extraites de Klebsiella Pneumoniae, leur procédé d'obtention, leur application
5 comme médicaments et les compositions les renfermant.

Un certain nombre de brevets français ont déjà décrit des glycoprotéines extraites de Klebsiella pneumoniae, il en est ainsi, par exemple, des brevets français n° 2.043.475, 2.088.112, et 2.171.907.

10 La présente demande concerne des glycoprotéines plus précisément définies et a ainsi pour objet de nouvelles glycoprotéines hydrosolubles extraites de Klebsiella Pneumoniae, caractérisées en ce qu'elles renferment de 10% à 20% de protéines, 50% à 70% d'oses neutres, 15% à 25% d'acide glucuronique, 1% à 2% d'osamines et ont un poids moléculaire
15 compris entre 80.000 et 350.000 daltons.

On désigne par oses neutres, notamment, des hexoses neutres tels que le glucose, le mannose ou le galactose.

On retient de préférence les glycoprotéines telles que
20 définies ci-dessus, caractérisées en ce que leur poids moléculaire estimé par ultra centrifugation est d'environ 100.000 daltons.

Les glycoprotéines de l'invention peuvent être extraites de différentes souches de Klebsiella pneumoniae; on
25 retient cependant tout particulièrement celles qui proviennent de la souche déposée à l'Institut PASTEUR sous le numéro 52.145.

L'étude de la structure de ces glycoprotéines à l'aide de différentes techniques chimiques, notamment, la réduction
30 des résidus acides uroniques par le carbodiimide, la perméthylation, la dégradation uronique, l'oxydation périodique ou l'oxydation par l'oxyde de chrome, a permis de préciser la composition et la structure des produits de la présente demande.

35 Les glycoprotéines selon l'invention sont formées d'une chaîne protéique sur laquelle est greffée la fraction polysaccharidique.

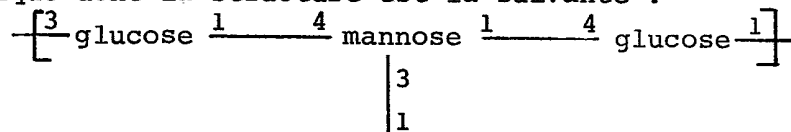
Les glycoprotéines préférées selon l'invention sont celles pour lesquelles la fraction protéique est composée

par environ 30% d'acides aminés acides. On entend par acides aminés acides des acides aminés tels que l'acide aspartique ou l'acide glutamique.

5 On retient aussi de préférence les glycoprotéines selon l'invention pour lesquelles l'acide aminé N-terminal de la fraction protéique est l'acide aspartique.

10 Les glycoprotéines préférées selon l'invention sont aussi celles pour lesquelles la fraction polysaccharidique renferme approximativement de 9,5 à 10,5 molécules de glucose, de 4 à 5 molécules de mannose et de 3 à 3,5 molécules d'acide glucuronique pour une molécule de galactose.

15 Parmi celles-ci, on retient tout particulièrement celles pour lesquelles la fraction polysaccharidique est essentiellement composée de la répétition de l'unité tétrasaccharidique dont la structure est la suivante :



acide glucuronique

20 Parmi les nouvelles glycoprotéines, objet de l'invention, on retient également tout particulièrement, celles dont la fraction polysaccharidique est formée de deux chaînes polysaccharidiques dont chacune de ces chaînes est liée à la fraction protéique par une liaison N-glycosidique entre une molécule de glucosamine d'une extrémité de la chaîne polysaccharidique et une molécule d'asparagine de la chaîne protéique.

25 L'invention a également pour objet un procédé d'obtention des nouvelles glycoprotéines hydrosolubles telles que définies ci-dessus, ledit procédé est caractérisé en ce que l'on traite, à l'aide d'un ammonium quaternaire, une solution de glycoprotéines obtenue par diafiltration d'un extrait de lysat de cultures de *Klebsiella pneumoniae*, isole puis dissout le précipité obtenu à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure de sodium, traite à froid la solution saline de glycoprotéines ainsi obtenue à l'aide d'un alcool de faible poids moléculaire, obtient ainsi un nouveau précipité que l'on redissout dans l'eau, dialyse puis lyophilise.

30

35

On peut utiliser différentes solutions de glycoprotéines

au départ du procédé, ces solutions sont obtenues par diafiltration de lysats de cultures de *Klebsiella pneumoniae* sur des membranes poreuses calibrées, capables de retenir les molécules d'un poids moléculaire égal ou supérieur à un poids moléculaire donné, qui est une constante pour ces membranes.

Les membranes utilisées sont, par exemple, les membranes vendues sous les noms de marque AMICON XM50, PM30 et UM2, mais on préfère utiliser des membranes dont le seuil de rétention est de 100.000 daltons, telles que les membranes commercialisées sous la désignation XM 100 ou H1 P100, par la société AMICON; Les membranes tout particulièrement préférées permettent de retenir les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 300.000 daltons; celles-ci sont avantageusement constituées par les membranes commercialisées sous la désignation XM300 par les sociétés AMICON et ROMICON.

La diafiltration permet de sélectionner, en solution, des molécules dont le poids moléculaire est supérieur à un poids moléculaire donné, comme on l'a dit, par le choix de la membrane, en fonction du seuil de rétention désiré. Il est évident, pour l'homme de l'art, que l'utilisation d'autres solutions de mêmes caractéristiques, obtenues par d'autres moyens, comme par exemple par chromatographie sur gel polymérisé hydrophile, est tout à fait possible.

Préalablement à cette opération de sélection, le lysat peut, très avantageusement, être délipidé et débarrassé de ses acides nucléiques.

Dans des conditions de réalisation tout particulièrement préférées du procédé selon l'invention, la solution de glycoprotéines de départ est obtenue selon le procédé décrit dans le second certificat d'addition n° 2.171.907 au brevet français n° 2.043.475, dans ce certificat d'addition, le poids moléculaire des glycoprotéines a été estimé par la technique d'exclusion de gels.

L'ammonium quaternaire que l'on utilise pour traiter la solution de glycoprotéines de départ peut être, par exemple, le chlorure de pyridyl-cétyl-ammonium, mais tout particulièrement, le bromure de triméthyl cétyl ammonium ou Cétavlon.

Après traitement par l'ammonium quaternaire, le précipité obtenu peut être séparé du surnageant par des procédés classiques, tels que la décantation ou la filtration, mais on préfère le séparer par centrifugation.

5 Le précipité est alors avantageusement redissout à l'aide d'une solution de chlorure de sodium 0,2M.

La solution obtenue est alors traitée à froid, aux environs de +4°C, à l'aide d'un alcanol de faible poids moléculaire tel que le méthanol, l'éthanol, le n-propanol ou
10 l'isopropanol, mais on utilise de préférence l'éthanol. Les résultats les plus intéressants sont obtenus par l'utilisation de six volumes d'éthanol pour un volume de solution saline, pendant une nuit, à la température de +4°C.

Le précipité est redissout dans l'eau et dialysé pour
15 le purifier. La dialyse est effectuée à l'aide de cellules de type classique obturées par des membranes, par exemple, de collodion ou de cellulose. On retient, notamment, les cellules dont la membrane est en cellulose régénérée, à diamètre moyen des pores, égal à environ 24Å, retenant les substances
20 dont le poids moléculaire est supérieur à 12 à 14 000 daltons. Parmi les cellules à dialyse, on peut noter tout particulièrement les tubes VISKING.

Cette dialyse permet d'éliminer de la solution de glycoprotéines, les impuretés de faible poids moléculaire res-
25 tantes, comme les traces d'alcanol.

On peut évidemment obtenir les glycoprotéines de l'invention, un peu moins pures, en n'effectuant pas l'étape de dialyse.

Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre,
30 le procédé ci-dessus décrit est caractérisé en ce que :

- l'ammonium quaternaire utilisé est le bromure de cétyltriméthyl-ammonium;
- l'on isole par centrifugation le premier précipité;
- l'alcanol de faible poids moléculaire est l'éthanol.

35 La présente demande a également pour objet les glycoprotéines telles qu'obtenues par le procédé selon l'invention.

Les produits, objet de la présente invention, possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques;

ils sont doués, notamment, de remarquables propriétés antibactériennes, immunostimulantes ainsi que d'une très bonne tolérance.

5 Ces propriétés sont illustrées plus loin dans la partie expérimentale.

Ces propriétés justifient l'utilisation des glycoprotéines de la présente demande, à titre de médicaments. La présente demande a ainsi également pour objet l'application, à titre de médicaments, des glycoprotéines telles que définies ci-dessus.

10 Parmi les médicaments de l'invention, on retient également ceux caractérisés en ce qu'ils sont constitués par les glycoprotéines telles qu'obtenues par le procédé de l'invention.

15 Ces médicaments trouvent, par exemple, leur emploi dans le traitement ou la prévention, chez l'homme et l'animal, des maladies infectieuses causées par les bactéries ou les virus, dans le traitement des maladies à parasites, des toxoinfections, dans le traitement des infections posthospitalières et postchirurgicales.

20 La dose usuelle, variable selon le produit utilisé, le sujet traité et l'affection en cause, peut être, par exemple de 0,5 mg à 10 mg par jour, par voie orale, chez l'homme, de 2 à 10 mg par jour, par voie rectale, de 0,25 à 25 5 mg par jour, par voie parentérale.

L'invention a enfin pour objet les compositions pharmaceutiques qui renferment les glycoprotéines de la présente demande, à titre de principe actif.

30 A titre de médicaments, les glycoprotéines de la présente demande peuvent être administrées par les voies digestive ou parentérale ou locale.

35 Les compositions pharmaceutiques correspondantes peuvent être, par exemple, solides ou liquides et se présenter sous les formes pharmaceutiques couramment utilisées en médecine humaine, comme par exemple, les comprimés, simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les solutions, les sirops, les suppositoires, les préparations injectables, les ovules, les crèmes, les pommades, les lotions, les gouttes, les collyres; elles sont préparées selon les méthodes

usuelles. Le ou les principes actifs peuvent y être incorporés à des excipients habituellement employés dans ces compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

Il va être donné, maintenant, à titre non limitatif, des exemples de mise en oeuvre de l'invention.

EXEMPLE 1 :

20 g de produit tel qu'obtenu à l'exemple n°1 du brevet français n° 2.171.907, sont dissous dans deux litres d'eau permutée.

On ajoute, lentement, environ 1,6 l de Cetavlon à 3%, l'ensemble est agité pendant une heure, puis centrifugé à 10.000 t/mn, pendant 15 minutes.

Le précipité est repris par 0,5 l d'une solution 0,2M de chlorure de sodium. On ajoute ensuite 3 l d'éthanol à 95°, en 15 minutes. Après une heure d'agitation on centrifuge à 10.000 t/mn, pendant 15 minutes, le surnageant ainsi obtenu est éliminé et le précipité est redissout dans 1 l d'eau puis dialysé pendant 48 heures dans des tubes Visking contre de l'eau permutée à +4°C. Au terme de cette dialyse, la solution est lyophilisée. On obtient 8,16 g des glycoprotéines cherchées.

EXEMPLE 2 :

20 g de produit tel qu'obtenu à l'exemple 1 du brevet français N° 2.171.907, sont dissous dans 1 l d'eau permutée. On ajoute sous agitation 0,800 l de Cétavlon à 3%. Après une heure d'agitation, on centrifuge à 10.000 t/mn, pendant 15 minutes.

Le précipité ainsi obtenu est redissout dans 0,250 l d'une solution 0,2M de chlorure de sodium. Sous agitation, on ajoute 1,5 l d'éthanol à 95°. Après une heure d'agitation, on centrifuge pendant 15 minutes à 10.000 t/mn. Le surnageant est éliminé et le précipité repris dans 0,500 l d'eau et dialysé pendant 48 heures dans des tubes Visking contre de l'eau permutée à +4°C.

Au terme de cette dialyse, on lyophilise la solution et on obtient 9,4 g des glycoprotéines cherchées.

EXEMPLE 3 :

5 On a préparé des comprimés répondant à la formule :
 - glycoprotéines obtenues à l'exemple 1..... 5 mg
 - excipient q.s.pour un comprimé terminé à.... 100 mg
 (Détail de l'excipient: lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium).

EXEMPLE 4 :

10 On a préparé une pommade répondant à la formule :
 - glycoprotéines obtenues à l'exemple 2 200 mg
 - excipient q.s.p. 100 g

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

15 A - Activité antibactérienne des glycoprotéines obtenues selon le mode d'exécution de la présente demande.

Les glycoprotéines de l'invention déclenchent une protection antibactérienne intense et durable à des doses très faibles. Cette action est polyvalente et s'exerce aussi bien sur les germes Gram + que sur les germes Gram -.

20 L'action est plus préventive que curative.

Le produit est administré à des souris avant l'injection des germes.

25 A la dose de 10 γ /kg, les "glycoprotéines" des exemples 1 et 2 assurent un pourcentage de protection de 100% contre une infection correspondant à 500 DL 50 de Klebsiella pneumoniae. A la même dose et pour les mêmes produits, la protection est de 85% contre une infection correspondant à 12 500 DL 50 de Klebsiella pneumoniae. A la dose de 100 γ /kg elle est de 100% contre 12 500 DL 50 de ce même micro-organisme.

30 L'activité antibactérienne vis à vis de Klebsiella pneumoniae varie en fonction du moment de l'administration des glycoprotéines, selon qu'elles sont administrées quarante-huit ou quatre-vingt-seize heures avant l'infection, les pourcentages de protection sont respectivement de 30% et 35 100%; les glycoprotéines selon l'invention possèdent donc une action antibactérienne à titre préventif très nette.

B - Stimulation des défenses non spécifiques :

Cette stimulation a été étudiée sur le test de la "clearance" au carbone chez la souris en s'inspirant de la technique mise au point par HALPERN, qui consiste à injecter dans le sinus oculaire une suspension de carbone colloïdal à l'animal et à apprécier en fonction du temps, la cinétique de la disparition du carbone dans le sang, en effectuant des mesures de densité optique.

Les produits sont administrés à l'animal par voie intrapéritonéale, vingt-quatre et quarante-huit heures avant le test et les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport à des témoins ayant reçu, uniquement, l'injection de carbone colloïdal.

PRODUIT de l'exemple :	DOSES	% d'activité	
		8 minutes après l'injection	Témoins 30 minutes après l'inject.
1	0,25 mg/kg	42%	65%
2	0,25 mg/kg	43%	65%

L'examen de ces résultats nous permet de noter l'intense stimulation provoquée par ces deux produits, sur les défenses de l'organisme.

C - Toxicité aigüe

La dose létale 50 (DL 50) par voie intrapéritonéale, chez la souris, a été déterminée par la méthode de BEHRENS et KÄRBER.

Elle est de 100 mg/kg pour les glycoprotéines des exemples 1 et 2.

D - Tolérance

L'injection sous cutanée de 0,2 ml de glycoprotéines des exemples 1 et 2, à la dose de 1000 γ /kg, chez la souris, ne provoque aucune intolérance locale ou générale.

REVENDICATIONS

1.- Nouvelles glycoprotéines hydrosolubles extraites de *Klebsiella pneumoniae*, caractérisées en ce qu'elles renferment de 10% à 20% de protéines, 50% à 70% d'oses neutres, 5 15% à 25% d'acide glucuronique, 1% à 2% d'osamines et ont un poids moléculaire compris entre 80.000 et 350.000 daltons.

2.- Nouvelles glycoprotéines selon la revendication 1, caractérisées en ce que leur poids moléculaire est d'environ 100.000 daltons.

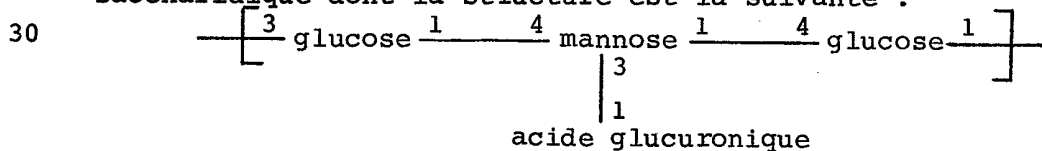
10 3.- Nouvelles glycoprotéines selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles sont extraites de la souche déposée à l'Institut PASTEUR, sous le n° 52.145.

4.- Nouvelles glycoprotéines, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que la fraction 15 protéique est composée par environ 30% d'acides aminés acides.

5.- Nouvelles glycoprotéines selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que l'acide aminé N-terminal de la fraction protéique est l'acide aspartique.

20 6.- Nouvelles glycoprotéines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que la fraction polysaccharidique renferme, approximativement, de 9,5 à 10,5 molécules de glucose, de 4 à 5 molécules de mannose et de 3 à 3,5 molécules d'acide glucuronique, pour une molécule 25 de galactose.

7.- Nouvelles glycoprotéines, selon la revendication 6, caractérisées en ce que la fraction polysaccharidique est essentiellement composée de la répétition de l'unité tétrasaccharidique dont la structure est la suivante :



8.- Nouvelles glycoprotéines, selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que la fraction polysaccharidique est formée de deux chaînes polysaccharidiques dont chacune de ces chaînes est liée à la fraction 35 protéique par une liaison N-glycosidique entre une molécule

de glucosamine d'une extrémité de la chaîne polysaccharidique et une molécule d'asparagine de la chaîne protéique.

5 9.- Procédé d'obtention de nouvelles glycoprotéines telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on traite, à l'aide d'un ammonium quaternaire, une solution de glycoprotéines obtenue par dia-
10 filtration d'un extrait de lysat de cultures de Klebsiella pneumoniae, isole puis dissout le précipité obtenu à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure de sodium, traite à froid la solution saline de glycoprotéines ainsi obtenue, à l'aide
15 d'un alcool de faible poids moléculaire, obtient ainsi un nouveau précipité que l'on redissout dans l'eau, dialyse puis lyophilise.

10.- Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que
15 - l'ammonium quaternaire utilisé est le bromure de cétyl-triméthyl-ammonium;
- l'on isole par centrifugation le premier précipité;
- l'alcool de faible poids moléculaire est l'éthanol.

11.- Les nouvelles glycoprotéines telles qu'obtenues par le
20 procédé selon la revendication 9 ou 10.

12.- Médicaments, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par les nouvelles glycoprotéines hydrosolubles telles que définies à la revendication 1 ou 2.

13.- Médicaments, caractérisés en ce qu'ils sont constitués
25 par les nouvelles glycoprotéines hydrosolubles telles que définies à l'une quelconque des revendications 3 à 8.

14.- Médicaments, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par les glycoprotéines telles que définies à la revendication 11, .

30 15.- Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment, à titre de principe actif, l'un au moins des médicaments tels que définis à l'une des revendications 12 ou 13.

35 16.- Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment, à titre de principe actif, l'un au moins des médicaments tels que définis à la revendication 14.