

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 574 429

⑳ N° d'enregistrement national :

84 18627

⑤① Int Cl⁴ : C 12 P 19/04; A 61 K 35/74 // C 12 R 1:22.

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 6 décembre 1984.

⑳③ Priorité :

⑫④ Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 24 du 13 juin 1986.

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑫⑦ Demandeur(s) : ROUSSEL-UCLAF, société anonyme ré-
gie par les articles 118 à 150 de la loi sur les sociétés
commerciales. — FR.

⑫⑦② Inventeur(s) : Pierre Smets et René Zaliz.

⑫⑦③ Titulaire(s) :

⑫⑦④ Mandataire(s) : Jean-Claude Vieillefosse.

⑫⑤④ Acylglycannes extraits de *Klebsiella*, leur procédé d'obtention, leur application à titre de médicaments et les compositions les renfermant.

⑫⑤⑦ Acylglycannes extraits de *Klebsiella* caractérisés en ce
qu'ils sont essentiellement constitués d'environ 80 % d'oses
neutres et 20 % de lipides, renferment moins de 2 % de
protéines, et ont un poids moléculaire d'environ 12 500, leur
procédé d'obtention, leur application à titre de médicaments et
les compositions les renfermant.

FR 2 574 429 - A1

D

La présente invention concerne des acylglycannes extraits de Klebsiella, leur procédé d'obtention, leur application à titre de médicaments et les compositions les renfermant.

Un certain nombre de brevets français ont décrit des
5 glycoprotéines extraites de corps microbiens lysés de Klebsiella et/ou leur procédé de préparation. Il en est ainsi, par exemple, des brevets français 2.043.475, 2.088.112, 2.171.907, 2.462.477, 2.490.495, 2.490.496 et 2.540 136.

La présente demande concerne de nouveaux extraits bactériens,
10 et a ainsi pour objet des acylglycannes extraits de Klebsiella caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués d'environ 80 % d'oses neutres et 20 % de lipides, renferment moins de 2 % de protéines et ont un poids moléculaire d'environ 12 500.

On désigne par oses neutres des oses qui ne comportent pas de
15 reste basique ou acide, notamment des hexoses neutres tels que le glucose, le galactose ou le mannose.

Ils sont dosés par la méthode de Tillmans et Philippi (Biochem. Z., 1929, 215, 36) modifiée par Rimington (Biochem. J., 1931, 25, 1062).

Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry (J. Biol.
20 Chem, 1951, 193, 265-273).

Les lipides sont dosés par chromatographie en phase vapeur après méthanolyse.

Le poids moléculaire des acylglycannes de la présente demande a été estimé par filtration sur gel hydrophile et insoluble à base de
25 dextrane tel que le Séphadex^(R), de seuil de chromatographie égal à 50 000.

Des acylglycannes préférés sont ceux pour lesquels les oses sont présents dans les proportions relatives approximatives suivantes, pour 1 glucose : environ 4 galactoses, environ 1 mannose et environ 1
30 heptose. Cette détermination peut, par exemple, être effectuée par chromatographie en phase vapeur.

Des acylglycannes plus particulièrement préférés comportent un enchaînement de galactoses liés en β 1 \rightarrow 3 de poids moléculaire d'environ 9 000.

Les acylglycannes de l'invention peuvent être extraits de
35 différentes espèces de Klebsiella. On retient cependant plus particulièrement ceux qui proviennent de Klebsiella pneumoniae, et tout particulièrement ceux qui proviennent de la souche portant à l'Institut Pasteur ou Collection Nationale de Culture de
40 Microorganismes les numéros 52145 et I-163, et à la National Culture

Type Collection le n° 5 055. Cette souche est depuis longtemps commercialisée et librement disponible auprès du public, notamment auprès de l'Institut Pasteur à Paris sous la référence 52 145 ; cette souche a de plus été déposée par la demanderesse le 25 Juin 5 1981 sous le N° I-163 à l'Institut Pasteur (encore appelé Collection Nationale de Cultures de Microorganismes).

En plus des oses et des lipides, les acylglycannes selon la présente invention sont caractérisés par la présence d'acide 2-céto-3-désoxy- octolosonique, de glucosamines et de phosphates.

10 Les acylglycannes selon la présente invention se présentent sous forme d'une poudre blanche inodore hydrosoluble.

Comme toutes les molécules d'origine biologiques, ils sont hydratés ou s'hydratent facilement ; leur spectre infrarouge n'est donc pas caractéristique, les nombreux pics étant fondus entre eux.

15 Leur point de fusion n'est pas non plus caractéristique, puisqu'il s'agit d'une carbonisation qui se fait sur une large plage de températures.

La présente demande a également pour objet un procédé d'obtention des acylglycannes tels que définis ci-dessus, ledit procédé étant 20 caractérisé en ce que l'on traite un extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella renfermant 30 % à 45 % de protéines, 30 % à 40 % d'oses neutres, une faible proportion d'acides uroniques, 2 % à 5 % d'osamines et ayant un poids moléculaire d'environ 350 000, à l'aide d'un détergent, chauffe à environ 80° C, chromatographie sur silice branchée 25 hydrophobe et récupère la fraction correspondant au pic d'élution repéré par spectrométrie à 200 nm, disparaissant à 280 nm, et apparaissant à 492 nm après coloration au phénol sulfurique.

Par faible proportion d'acides uroniques, on entend moins de 6 % d'acides uroniques et de préférence moins de 4 %.

30 Les extraits bactériens hydrosolubles de Klebsiella de départ du procédé peuvent être notamment obtenus par mise en culture de germes appartenant au genre Klebsiella, lyse des germes, séchage, délipidation par extraction à l'aide de solvants des lipides, ultrafiltration, traitement de la solution aqueuse ainsi obtenue à 35 l'aide d'un sel d'ammonium quaternaire, élimination du précipité, puis soit traitement à froid du surnageant à l'aide d'un alcool de faible poids moléculaire, isolation, puis dissolution dans l'eau, dialyse et séchage du produit obtenu, remise en solution, filtration sur gel puis isolation de la première fraction éluée et séchage,

soit concentration du surnageant par utilisation d'au moins un dispositif de sélection de molécules, traitement à froid du concentré à l'aide d'un alcool et isolation du précipité obtenu.

De telles préparations ont déjà été décrites notamment dans le
5 brevet français N° 2.490.496 et dans la demande de brevet européen
n° 0.049.182 publiée sous le n° 29.070 E par Derwent Publications
Farmdoc book n° 1.500 du 2 Juin 1980, ainsi que dans la demande de
brevet français n° 2.540.136.

C'est ainsi que la présente demande a aussi pour objet un procédé
10 d'obtention des acylglycannes tels que définis ci-dessus, ledit procédé
étant caractérisé en ce que l'on traite à l'aide d'un détergent,
un extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella, tel que préparé
ci-dessus, chauffe à environ 80° C, chromatographie sur silice branchée
hydrophobe et récupère la fraction correspondant au troisième pic
15 d'éluion repéré par spectrométrie à 200 nm disparaissant à 280 nm,
et apparaissant à 492 nm après coloration au phénol sulfurique.

D'autres extraits bactériens hydrosolubles de Klebsiella
de départ, convenables pour la mise en oeuvre du procédé sont, par
exemple, obtenus par mise en culture des germes, lyse des germes par
20 broyage, centrifugation fractionnée pour sédimenter les débris
cellulaires sous une accélération d'environ 8 000 g, puis les membranes
sous une accélération de 20 000 à 40 000 g, séparation de l'extrait
brut par centrifugation fractionnée en solution saline et dans l'eau,
traitement par une base ou un hypobromite, élimination de l'excès de
25 réactif et du résidu insoluble, traitement à l'aide d'une solution
aqueuse d'acide acétique à une température de 70° C à 100° C,
élimination de la fraction insoluble, délipidation par extraction à
l'aide de solvants des lipides, traitement à l'aide de lysozyme,
séparation de la fraction de poids moléculaire d'environ 350 000 et
30 séchage. Un exemple d'une telle préparation figure, par exemple, dans
la demande de brevet européen n° 0089266.

Les produits doués de propriétés détergentes sont bien
connus. Il s'agit, par exemple, de sels d'ammonium quaternaires,
notamment des halogénures d'ammonium quaternaires tels que l'iodure de
35 tétraéthylammonium, le chlorure de N-hexadécyl-N,N-diméthylbenzène
méthanaminium, le bromure de N-hexadécyl-2-hydroxy-N,N,N-triméthyl-1-
hexadécanaminium, les halogénures de N,N,N-triméthyl-1-hexadécanaminium
ou de cétylpyridinium.

Il s'agit aussi de sulfates ou sulfonates alcalins de type ester
40 alkyl ou alkylarylique tels que le sodium dioctyl sulfosuccinate, le
sodium dodécylbenzène sulfonate, le sodium dodécyl sulfate, le sodium

tétradécyl sulfate, le lithium dodécylsulfate, des polyéthylène-glycols monos (nonylphényl) éthers comme les Triton N^(R), des polyéthylènes glycols p-isooctyl phényléthers comme les Triton X^(R) ou des polymères de 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl) phénol avec le formaldéhyde et
5 l'oxirane comme le Triton^(R) A20.

Il s'agit de préférence d'un sulfate alcalin de type ester alkyl, tel que le sodium dodécyl sulfate.

Le détergent est utilisé en solution dans un solvant pharmaceutiquement acceptable conservant au détergent ses propriétés
10 détersives, de préférence en solution dans l'eau. Selon le pouvoir détergent, il est utilisé à la concentration d'environ 1 % dans le cas de produits très détergents tels que le sodium dodécyl sulfate, ou plus concentré, par exemple 2 % à 10 % dans le cas des sels d'ammoniums quaternaires.

15 La température d'environ 80° C est conservée quelques minutes, de préférence environ 5 minutes.

Le gel de silice utilisé pour la chromatographie est constitué de silice sur laquelle sont branchés des groupements hydrophobes, de préférence des acides gras. Les acides gras peuvent, par exemple,
20 être des acides gras en C₃ à C₃₀, notamment en C₃ à C₂₀. On utilise de préférence le gel C₈ commercialisé sous le nom Aquapore^(R) RP300.

Le repérage de la fraction intéressante de nature glucidique et substantiellement dépourvue de protéines est réalisé, par exemple,
25 par spectrophotométrie à 200 nm (détection des glucides et des protéines), 280 nm (détection des protéines seules), 492 nm après coloration par le phénol sulfurique (détection des sucres seuls).

L'élution est de préférence réalisée à l'aide d'un mélange acétonitrile-solution aqueuse d'acide trifluoroacétique 0,1 % pH 1,8
30 utilisé en gradient. Le gradient est avantageusement constitué successivement d'un mélange acétonitrile - solution d'acide trifluoroacétique 20-80, puis 50-50. Dans ces conditions, les acylglycannes recherchés correspondent au troisième pic repéré à 200 nm lorsqu'on utilise un gel en C₈. Ce pic disparaît à 280 nm et apparaît à 492 nm
35 après coloration au phénol sulfurique.

L'isolation des acylglycannes est faite de manière classique pour des macromolécules mélangées à des petites molécules, c'est-à-dire par exemple par ultrafiltration à l'aide de membranes de seuil de rétention 5 000 par exemple, par dialyse, ou par chromatographie sur gel.

40 Les acylglycannes peuvent ensuite être séchés, par exemple, par

lyophilisation, évaporation ou atomisation.

La présente invention a également pour objet les acylglycannes tels qu'obtenus par les procédés ci-dessus décrits, c'est-à-dire lorsqu'ils sont obtenus par la mise en oeuvre de ces procédés ou 5 lorsqu'ils présentent des caractéristiques physiochimiques analogues à celles des acylglycannes obtenus par la mise en oeuvre de ces procédés.

Les acylglycannes, objet de la présente invention, possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques ; ils sont doués 10 notamment de remarquables propriétés antiallergiques et immunomodulatrices. Ils stimulent, en particulier, l'immunité à médiation cellulaire.

Ces propriétés sont illustrées plus loin dans la partie expérimentale.

15 Ces propriétés justifient l'utilisation des acylglycannes selon l'invention à titre de médicaments.

La présente demande a ainsi également pour objet l'application, à titre de médicaments, des acylglycannes tels que définis ci-dessus, pour leur utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique - 20 curatif ou préventif - du corps humain ou animal.

Parmi les acylglycannes, objet de l'invention, on retient, tout particulièrement, les acylglycannes caractérisés en ce qu'ils sont constitués par les acylglycannes tels qu'obtenus par les procédés de l'invention, pour leur utilisation dans une méthode de traitement 25 thérapeutique - curatif ou préventif - du corps humain ou animal.

Les médicaments selon l'invention trouvent leur emploi, par exemple, 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 toxi-infections, dans le 30 traitement des infections posthospitalières et postchirurgicales, et des allergies de toutes origines.

A titre préventif, les acylglycannes, selon la présente invention peuvent être utilisés seuls ; ils peuvent également être utilisés à titre d'adjuvant dans des vaccins.

35 La dose usuelle, variable selon le dérivé utilisé, le sujet et l'affection en cause peut être, par exemple, de 1 mg à 15 mg par jour. Par voie orale, chez l'homme, le dérivé de l'exemple 1 peut être administré à la dose quotidienne de 2 mg à 10 mg, par exemple pour le traitement de la bronchite chronique, soit environ de 0,03 mg à 0,15 mg 40 par kilogramme de poids corporel.

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

A titre de médicaments, les acylglycannes de la présente demande 5 peuvent être administrés par les voies digestive, parentérale ou locale.

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 10 exemple, les comprimés, simples ou dragéifiés, les gélules, les granulés, les solutions, les sirops, les suppositoires, les préparations injectables lyophilisées ou non, les ovules, les crèmes, les pommades, les lotions, les gouttes, les collyres, les aérosols ; elles sont préparées selon les méthodes usuelles. Le ou les principes 15 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 20 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 n° 1

On ajoute 7,83 ml d'une solution aqueuse à 1 % de sodium 25 dodécyl sulfate à 235 mg d'extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella préparé comme indiqué ci-après selon l'option b, et chauffe pendant 5 minutes à 80° C. Après refroidissement, on chromatographie par fractions de 0,5 ml, sur une colonne pour chromatographie liquide haute performance (HPLC) de silice greffée 30 par des acides gras en C₈ (Aquapore^R RP300 de 4,6 x 25 cm), en éluant à l'aide d'un gradient acétonitrile - solution aqueuse à 0,1 % pH 1,8 d'acide trifluoracétique sous un débit de 2 ml/mn, dans les conditions suivantes (cf. tableau ci-après) :

	Temps	Acétonitrile	eau
	0	0	100
5	10	0	100
	20	20	80
	35	20	80
	45	50	50
	60	50	50
10	80	100	0

On isole les fractions correspondant au troisième pic repéré par spectrométrie à 200 mn, élimine les petites molécules par dialyse et amène à sec. On obtient 67,85 mg des acylglycannes 15 attendus.

Analyse :

C% : 42 H% : 7,8 N% : 0,3

Protéines 0,8 %, sucres 80 %, lipides 24,5%.

Préparation de l'extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella de 20 départ :

Stade A : culture

On prépare un milieu de culture répondant à la formule suivante :

	- extrait de viande.....	690 g
	- chlorure de sodium.....	690 g
25	- peptone de caséine.....	690 g
	- autolysat de levure.....	690 g
	- phosphate bipotassique.....	483 g
	- phosphate monopotassique.....	207 g
	- glucose.....	4104 g
30	- peptone papaïnique de soja.....	2760 g
	- eau distillée q.s.p.....	138 litres.

On prépare le milieu de culture en mélangeant successivement l'extrait de viande, le chlorure de sodium, la peptone de caséine, l'autolysat de levure, le phosphate bipotassique et le phosphate 35 monopotassique dans environ 20 litres d'eau distillée. On ajuste le pH aux environs de 7.

On stérilise le milieu à 120° C pendant 40 minutes. Les solutions de glucose et de peptone papaïnique de soja sont introduites dans le milieu de culture au moment de l'ensemencement après avoir été 40 stérilisées au préalable.

La souche de Klebsiella (Institut Pasteur n° I-163) est ensemencée dans 50 cm³ de milieu de culture. Cette solution, servant d'inoculum est introduite dans le reste du bouillon de culture. On ajuste le volume total du milieu de culture à 138 litres par addition d'eau distillée stérile.

Le milieu de culture est maintenu à 37° C et le pH est ajusté automatiquement à 7 environ (par addition d'une solution d'ammoniaque ou par addition d'une solution d'acide chlorhydrique).

La croissance des germes est appréciée au photomètre.

10 Stade B : lyse

A 138 litres de bouillon de culture à complet développement obtenu au stade A ci-dessus, on ajoute une solution aqueuse de chlorhydrate de lysozyme, (stérilisée par filtration sur membrane), afin d'avoir une concentration finale de 160 de chlorhydrate de lysozyme par cm³ de milieu de culture.

On laisse en contact une heure à 56° C en présence de 0,25 g d'Edta par litre de bouillon, de 862,5 mg de mercurothiolate sodique et de 80 g de polysorbate (commercialisé sous le nom de Tween 80), par litre de bouillon de culture.

20 On poursuit la lyse pendant environ 10 jours à 37° C dans des conditions stériles.

On recueille le lysat, homogénéise par agitation puis lyophilise.

Stade C : traitement

a) Par l'acétone :

25 On met en suspension dans 138 litres d'acétone la poudre obtenue au stade B ci-dessus, puis agite vigoureusement pendant environ 3 heures.

La suspension est alors centrifugée et on recueille une poudre que l'on essore.

30 b) Par le méthanol :

La poudre obtenue précédemment est mise en suspension dans 138 litres de méthanol et agitée vigoureusement pendant environ 3 heures.

La suspension obtenue est alors centrifugée.

35 La poudre essorée est séchée à température ambiante sous pression réduite.

Stade D : Ultrafiltration

On met en solution dans 6 fois 10 litres d'eau distillée contenant 1 g/l de merthiolate, six parties égales de poudre obtenue au stade C 40 ci-dessus.

On maintient la solution sous agitation à +4° C pendant 24 heures, centrifuge pendant environ 2 heures à 20 000 g, puis à 60 000 g.

On récupère la solution que l'on complète à 10 litres avec l'eau distillée filtrée (sur membrane stérilisante). On introduit la solution 5 obtenue dans un appareil à diafiltrer équipé de membranes poreuses pour ultrafiltration dont le seuil de rétention est de 300 000 et de diamètre apparent des pores d'approximativement 2 A (membranes commercialisées par la Société AMICON ou par la Société ROMICON sous la désignation XM 300).

10 On fait circuler dans l'appareil 50 volumes d'eau distillée, soit un volume de 500 litres.

La solution diafiltrée est récupérée puis centrifugée à 60 000 g et la solution obtenue lyophilisée

Stade E :

15 Option a :

20 g de produit tel qu'obtenu au stade D ci-dessus sont dissous dans deux litres d'eau permutée.

On ajoute, lentement, environ 1,6 litre de bromure de cetyltriméthylammonium à 3 %, agite l'ensemble pendant une heure, 20 puis centrifuge à 10 000 t/mn pendant 15 minutes. On élimine le précipité, ajoute ensuite au surnageant isolé 3 litres 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 redissous dans 1 litre d'eau, puis dialysé pendant 25 heures dans des tubes Visking^(R) contre de l'eau permutée à +4° C. Au terme de cette dialyse, la solution est lyophilisée. On obtient 6,2 g de glycoprotéines dont on dissout 1 g dans 19 ml de carbonate d'ammonium 0,1M. La solution est passée sur une colonne de 2,5 cm de diamètre renfermant 1 litre d'Ultragel^(R)ACA34 (éluant : solution de carbonate 30 d'ammonium 0,1M) ; les fractions correspondant au premier pic d'élution (détection aux U.V. à 280 nm) sont rassemblées et lyophilisées, et on obtient 0,51 g d'extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella.

Option b :

On met en solution aqueuse à 10 g/litre, 1 kg de produit tel 35 qu'obtenu au stade D ci-dessus.

On ajoute 0,8 volume de solution à 3 % de bromure de cetyltriméthylammonium à raison de 1 litre/minute environ et agite modérément pendant 1 heure. On élimine le précipité formé par centrifugation en continu à débit de 5 litres/heure environ, à 40 62 000 g.

Le surnageant est concentré par ultrafiltration sur fibres creuses à seuil de rétention fixé à 5 000 (Hollow Fibers H10P5 commercialisées par AMICON et ROMICON) en 2 cycles de traitement dans les proportions 5/1. On ajoute, à la vitesse de 3 litres par minute, 6 volumes d'éthanol 5 à 96 % et agite modérément pendant 15 minutes. On laisse décanter, essore et rince le précipité, sèche à moins de 40° C en présence de déshydratant, homogénéise par broyage mécanique et obtient 200 g d'extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella.

Exemple 2 :

10 On a préparé des comprimés répondant à la formule :

- Produit de l'exemple 1..... 1 mg
 - Excipient q.s. pour un comprimé terminé à..... 100 mg.
- (Détail de l'excipient : lactose, amidon, talc, stéarate de magnésium).

Exemple 3 :

15 On a préparé des aérosols délivrant des doses contenant chacune :

- Produit de l'exemple 1..... 0,5 mg
- Emulsifiant..... 0,15mg
- Propulseur.....50 mg

Exemple 4 :

20 On a préparé une crème répondant à la formule :

- Produit de l'exemple 1..... 1 mg
- Excipient : alcool 2-octyl-dodécaneol, alcool cétostéarylique, cétostéaryl sulfate de sodium, parahydroxybenzoate de méthyle et de propyle, eau purifiée.....10 mg

25 **ANNEXE PHARMACOLOGIQUE :**

1/. Test de réponse d'hypersensibilité retardée (HSR) au globule rouge de mouton (GRM)

METHODE

L'expérience est réalisée sur des lots de 10 souris femelles âgées de 9 à 10 semaines pesant environ 20 g.

Le traitement est réalisé 3 heures avant l'immunisation par les GRM par une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de NaCl 9 % contenant le produit testé. Les doses testées sont de 10 ; 100 et 1000 x 10⁻⁶ g par Kg.

35 L'immunisation est réalisée 3 heures après le traitement par l'injection intraveineuse de GRM. (10⁸ GRM/souris).

La révélation de l'HSR est réalisée 4 jours plus tard par injection intraplantaire dans la patte arrière gauche de 40 x 10⁻⁶ l d'une suspension de GRM.

40 La lecture est réalisée 24 heures après la révélation, par la

mesure de l'épaisseur des pattes arrières gauches et droites.

Les résultats sont exprimés par la différence entre les épaisseurs des pattes arrières gauche et droite de chaque souris.

RESULTATS

5 Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

	TRAITEMENT 10 ⁻⁶ g/kg	DIFFERENCE nm
10 Lot témoin	0	3,23 + 0,76
Lots traités	10	4,74 + 0,95
	100	6,33 + 0,93
15	1 000	9,00 + 1,80

Toute augmentation des différences patte gauche-patte droite par rapport au lot témoin traduit une augmentation des réponses d'hypersensibilité retardée. On s'aperçoit que pour toutes les doses étudiées (10; 100; 1000 10⁻⁶g/Kg), les acylglycannes de la présente invention augmentent de manière importante les réponses d'HSR.

2/ Toxicité aiguë

La dose létale 50 (DL 50) par voie intrapéritonéale, chez la 25 souris a été déterminée par la méthode BEHRENS et KARBEN.

Elle est d'environ 20 mg/Kg pour les acylglycannes de l'exemple 1.

REVENDEICATIONS

- 1/. Les acylglycannes extraits de Klebsiella, caractérisés en ce qu'ils sont essentiellement constitués d'environ 80 % d'oses neutres et 20 % de lipides, renferment moins de 2 % de protéines et ont un poids moléculaire d'environ 12 500.
- 2/. Les acylglycannes selon la revendication 1, caractérisés en ce que les oses sont présents dans les proportions relatives approximatives suivantes, pour 1 glucose : environ 4 galactoses, environ 1 mannose et 10 environ 1 heptose.
- 3/. Les acylglycannes selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils comprennent un enchaînement de galactoses liés en β 1 \rightarrow 3 de poids moléculaire d'environ 9 000.
- 4/. Les acylglycannes selon la revendication 1,2 ou 3, caractérisés en ce qu'ils proviennent de Klebsiella pneumoniae.
- 5/. Les acylglycannes selon la revendication 4, caractérisés en ce qu'ils proviennent de la souche portant à l'Institut Pasteur ou Collection Nationale de Culture de Microorganismes les numéros 52 145 et I-163, et à la National Culture Type Collection le N° 5 055.
- 20 6/. Procédé d'obtention des acylglycannes tels que définis à l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on traite un extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella renfermant 30 % à 45 % de protéines, 30 % à 40 % d'oses neutres, une faible proportion d'acides uroniques, 2 % à 5 % d'osamines et ayant un poids moléculaire d'environ 25 350 000, à l'aide d'un détergent, chauffe à environ 80° C, chromatographie sur silice branchée hydrophobe, et récupère la fraction correspondant au troisième pic d'éluion repéré par spectrométrie à 200 nm et disparaissant à 280 nm.
- 7/. Procédé d'obtention des acylglycannes tels que définis à l'une des 30 revendications 1 à 5, dans lequel l'on prépare un extrait bactérien hydrosoluble de Klebsiella tel que celui obtenu par mise en culture de germes appartenant au genre Klebsiella, lyse des germes, séchage, délipidation par extraction à l'aide de solvants des lipides, ultrafiltration, traitement de la solution aqueuse ainsi obtenue à 35 l'aide d'un sel d'ammonium quaternaire, élimination du précipité, puis soit traitement à froid du surnageant à l'aide d'un alcool de faible poids moléculaire, isolation, puis dissolution dans l'eau, dialyse et séchage du produit obtenu, remise en solution, filtration sur gel puis isolation de la première fraction éluee et séchage, soit concentration

- du surnageant par utilisation d'au moins un dispositif de sélection de molécules, traitement à froid du concentré à l'aide d'un alcool et isolation du précipité obtenu caractérisé en ce que l'on traite à l'aide d'un détergent, ledit extrait bactérien hydrosoluble de
- 5 *Klebsiella*, chauffe à environ 80° C, chromatographie sur silice branchée hydrophobe et récupère la fraction correspondant au pic d'éluion repéré par spectrométrie à 200 nm, disparaissant à 280 nm et apparaissant à 492 nm après coloration au phénol sulfurique.
- 8/. Procédé selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que :
- 10 - le détergent est un sulfate alcalin de type ester alkyl,
- l'éluion est effectuée à l'aide d'un gradient acétonitrile - solution aqueuse à 0,1 % pH 1,8 d'acide trifluoroacétique.
- 9/. Les acylglycannes tels qu'obtenus par le procédé selon l'une des revendications 6, 7 ou 8.
- 1510/. Les acylglycannes tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou 9, pour leur utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique - préventif ou curatif - du corps humain ou animal.
- 11/. Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles
- 20 renferment, comme principe actif, les acylglycannes tels que définis à la revendication 10.