

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 81 01698**

(54) Procédés d'obtention de relaxine humaine à partir de membranes fœtales et relaxine ainsi obtenue.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). C 07 G 15/00; A 61 K 37/24.

(22) Date de dépôt..... 29 janvier 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : EUA, 1<sup>er</sup> février 1980, n° 117.444.

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 32 du 7-8-1981.

(71) Déposant : Société dite : HYPOLAB SA, résidant en Suisse.

(72) Invention de : Mario Bigazzi.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet L. A. de Boisse,  
37, av. Franklin-Roosevelt, 75008 Paris.

La relaxine est une hormone du type polypeptide qui facilite la relaxation du ligament pelvien des mammifères. Hisaw (Proc. Soc. Exp. Biol. 23, 661, 1926) a observé le premier l'existence de la relaxine en 1926. Malgré les nombreuses années qui se sont écoulées depuis la première découverte de cette hormone, on dispose de peu d'information sur celle-ci, spécialement dans l'espèce humaine.

Chez les animaux, on a trouvé de la relaxine dans divers tissus de mammifères et de non-mammifères. Jusqu'ici, la seule source riche et abondante de relaxine est l'ovaire de la truie gravis, dont on tire la relaxine pour l'usage commercial et expérimental.

Dans l'espèce humaine, on sait très peu de chose de l'origine, du rôle physiologique ou pathologique et de la structure de la relaxine.

Il semble que l'ovaire gravis, chez la femme aussi, soit riche en activité similaire à celle de la relaxine. Toutefois, la possibilité de tirer de la relaxine humaine de cette source est très faible, puisqu'il est, en pratique, impossible d'avoir des quantités suffisantes d'ovaires humains gravis pour le processus d'extraction.

L'invention est basée sur la découverte qu'une source nouvelle et facilement accessible de relaxine humaine est le complexe de membranes fœtales que l'on obtient facilement lors de l'accouchement en même temps que le placenta.

Plus précisément, on a trouvé que la membrane caduque est particulièrement riche en relaxine.

Les "membranes fœtales" sont un complexe des trois couches : amnios, chorion et caduque.

L'amnios est facile à séparer, par décollement, des membranes associées, chorion et caduque. Au contraire, le chorion et la caduque sont difficiles à séparer complètement l'un de l'autre.

L'objet principal de l'invention est un procédé d'obtention de relaxine utilisant les membranes foetales comme source. De préférence, on utilise comme source le chorion et la caduque associée  
5 ou, de préférence encore, la caduque elle-même.

On peut tirer directement la relaxine humaine de la ou des sources ci-dessus, par extraction, ou indirectement du milieu d'incubation de cultures in vitro des tissus ou cellules en question.

10 Le titrage biologique de préparations contenant de la relaxine est généralement basé sur les méthodes suivantes :

- 1) l'inhibition de la contraction spontanée de l'utérus, aussi bien in vivo qu'in vitro ; et
- 15 2) la relaxation de la symphyse pubienne que l'on peut déterminer :

- a) par palpation de la symphyse pubienne du cobaye,
- b) aux rayons X sur la symphyse pubienne  
20 de la souris, ou
- c) par mesure directe de la symphyse pubienne de la souris.

On a mesuré par la méthode 2c ci-dessus l'activité biologique des compositions contenant de la relaxine, obtenues selon l'invention et elle est  
25 exprimée en U.C. (unités cobaye) en agrément avec la préparation de relaxine porcine utilisée comme étalon (NIH).

On a trouvé aussi que les compositions de l'invention sont actives dans l'essai d'inhibition  
30 de la contraction utérine (voir 1 plus haut).

On peut utiliser la relaxine en thérapeutique dans divers états pathologiques gravidiques (accouchement prématuré, menace de fausse couche) et  
35 des tissus conjonctifs (sclérodermie et ulcère trophique). En outre, la relaxine humaine a une importance extrême pour la préparation d'un nécessaire de

dosage radioimmunologique homologue permettant de doser la relaxine dans les humeurs et tissus humains.

Les exemples non limitatifs ci-après illustrent l'invention.

5

Exemple 1

- Relaxine humaine tirée d'un homogénéisat tissulaire

10

On recueille lors de l'accouchement le placenta humain et les membranes foetales associées et on les lave dans de la solution de Hank ou du soluté physiologique tamponné, pH 7,4. On conserve la matière à -30°C jusqu'au traitement (on peut séparer le placenta des membranes foetales associées, avant ou après le stockage).

15

On peut alors traiter les membranes foetales dans leur ensemble ou de préférence on sépare l'amnios de la caduque et du chorion par décollement et on le jette. Si on le désire, on peut séparer la caduque du chorion par raclage et la traiter séparément. Toutefois, cette dernière opération n'est pas facile à exécuter et ne semble pas se justifier pour les opérations d'extraction courantes.

20

On traite à la fois environ 500 g de matière membraneuse provenant de 15 à 20 accouchements.

25

On émince le tissu et on l'homogénéise dans 200 cm<sup>3</sup> d'eau distillée.

30

On traite alors l'homogénéisat tissulaire obtenu, selon l'un des procédés suivants :

a) selon Schwabe et Braddon, Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1126, 1976 : après avoir ajouté 30 cm<sup>3</sup> de HCl concentré, on maintient le mélange à 4°C pendant 24 heures, puis on ajoute 160 cm<sup>3</sup> d'acétone froide et on maintient le mélange pendant une nuit à 4°C. On sépare le précipité par centrifugation à 2000 tours/mn pendant 15 minutes et on le jette. On traite le surnageant limpide par 5 volumes d'acétone froide pendant 24 heures, puis on le centrifuge à

35

27.000 tours/mn pendant 30 minutes ;

- b) selon Sherwood, Endocrinology 104, 886, 1979 : on commence par extraire le mélange par un tampon phosphate puis, par centrifugation à 27.000 tours/mn pendant 30 minutes, on sépare les résidus tissulaires et les organites cellulaires les plus lourds et on les jette.

Dans les deux cas, on obtient la relaxine sous forme d'un extrait brut. On peut encore purifier l'extrait brut par chromatographie en série sur carboxyméthylcellulose, "Sephadex G-50" superfine et "Sephadex G-15" par les méthodes proposées par les auteurs cités, pour obtenir une matière purifiée ayant une activité totale de relaxine de 1500 à 2500 U.C. et une activité spécifique de 150 à 1500 U.C./mg de protéines, selon le nombre d'étapes chromatographiques.

#### Exemple 2

- Relaxine humaine tirée d'une culture in vitro de caduque humaine

On racle la caduque de la surface des membranes associées caduque et chorion et on l'émince.

- On place 1 à 2 g du tissu émincé dans des flacons Erlenmeyer contenant chacun 40 cm<sup>3</sup> de solution de Gey oxygénée modifiée par addition de 20 millimoles d'Hepes, de 50 U/ml de pénicilline et de 10 % de sérum de veau.

- On fait incuber les cultures dans un incubateur métabolique à 37°C pendant 48 heures. On recueille les milieux, on les traite par 5 volumes d'acétone froide et on maintient à 4°C pendant 24 heures. On centrifuge alors le mélange à 27.000 tours/mn pendant 30 minutes pour obtenir une boulette contenant un extrait brut de relaxine qui a une activité spécifique de 500 à 2000 U.C./mg de protéines.

On peut encore purifier l'extrait brut selon les procédés connus mentionnés à l'exemple 1.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention de relaxine humaine tirée d'une source humaine, caractérisé en ce que l'on utilise comme source des membranes foetales.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise comme membranes foetales le chorion et la caduque.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que a) on émince et on homogénéise des membranes foetales humaines, b) on précipite les résidus tissulaires et les organites cellulaires les plus lourds et on les jette pour obtenir un extrait brut de relaxine.
- 10 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on sépare l'amnios des membranes associées que sont le chorion et la caduque et on le jette ; et on utilise le chorion et la caduque comme source.
- 15 5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que l'on sépare la caduque du chorion associé, en la raclant ; et on l'utilise comme source.
- 20 6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait incubé du tissu ou des cellules de caduque humaine et on purifie, par des procédés classiques, la relaxine tirée du milieu d'incubation.
- 25 7. La relaxine obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.