



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

① CH 658 458 A5

⑤ Int. Cl.4: C 07 K 15/14
C 07 H 15/04

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein

Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

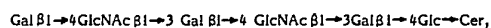
⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

<p>⑰ Numéro de la demande: 8056/81</p> <p>⑳ Date de dépôt: 17.12.1981</p> <p>㉔ Brevet délivré le: 14.11.1986</p> <p>④⑤ Fascicule du brevet publié le: 14.11.1986</p>	<p>⑦③ Titulaire(s): Laboratoire Lucchini S.A., Genève</p> <p>⑦② Inventeur(s): Martin, Michel, Genève</p> <p>⑦④ Mandataire: Pierre Ardin & Cie, Genève</p>
--	---

⑤④ **Procédé pour l'obtention du lacto-N-norhexaosyl céramide.**

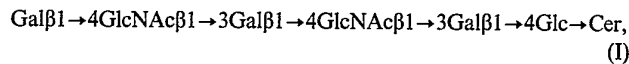
⑤⑦ A partir des gangliosides bruts isolés de tissu placentaire humain on extrait du lacto-N-norhexaosyl céramide de formule I.

Le lacto-N-norhexaosyl céramide est utilisé dans le diagnostic et le traitement de certaines tumeurs.



REVENDEICATIONS

1. Procédé pour l'obtention du lacto-N-norhexaosyl céramide, de formule:



à partir des gangliosides bruts isolés de tissu placentaire humain, repris dans un mélange de solvants comprenant deux parties de solvant polaire et une partie de solvant apolaire en volume, qu'on filtre, caractérisé en ce qu'on précipite les gangliosides par adjonction d'acétate d'éthyle, les impuretés restant dans le solvant, tandis que les gangliosides purifiés, contenant en proportions sensiblement égales des esters sialyliques de l'hématoside, du paragloboside et du lacto-N-norhexaosyl céramide, sont séparés par filtration ou essorage.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on purifie le mélange des esters sialyliques obtenus par filtration ou essorage par une hydrolyse ménagée dans le méthanol en présence d'eau, puis on ajoute du chloroforme à la solution hydrolysée afin d'amener les proportions des constituants du solvant sensiblement à 20 parties de chloroforme, 10 parties de méthanol et 6 parties d'eau, puis on sépare les deux couches ainsi formées, on procède à une seconde extraction et on réunit les phases aqueuses qu'on évapore pour obtenir le lacto-N-norhexaosyl céramide pratiquement pur.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on ajoute l'acétate d'éthyle à raison de sensiblement 8,5 fois le volume du mélange de solvants.

L'invention a pour objet un procédé pour l'obtention du lacto-N-norhexaosyl céramide par extraction à partir d'un tissu placentaire humain riche en ce ganglioside.

Par la publication de R. Riemschneider et M.Z. Abedin dans «Die Angewandte Makromolekulare Chemie» 82 (1979) 171-186 (N° 1276), on connaît déjà un procédé pour extraire de tissus placentaires des lipides ou phospholipides par prétraitement à l'éther suivi d'un lavage des résidus avec de l'hydroxyde ou de l'acétate de sodium.

On peut obtenir du lacto-N-norhexaosyl céramide par extraction à partir d'un tissu placentaire humain par un procédé qui consiste à extraire en un premier temps et de façon connue les gangliosides bruts au moyen d'un mélange de solvant polaire, tel que le chloroforme, le chlorure de méthylène, l'éther éthylique ou l'éther isopropylique, et de solvant apolaire, tel que le méthanol, l'éthanol ou l'isopropanol, en présence d'eau, à raison de 28,1% de solvant polaire, 56,3% de solvant apolaire et de 15,6% d'eau, en volume, à séparer les gangliosides bruts de la couche aqueuse par évaporation du solvant, à purifier les gangliosides bruts par saponification douce dans un solvant apolaire en présence d'eau, dialyse des gangliosides dans la solution restante et évaporation de cette dernière.

Toutefois, on ne connaît pas jusqu'à présent de procédé permettant de séparer industriellement, à partir des gangliosides bruts, des gangliosides purifiés, tels que les esters sialyliques de l'hématoside, du paragloboside et du lacto-N-norhexaosyl céramide.

Le procédé selon l'invention remédie à cet inconvénient et permet d'obtenir du lacto-N-norhexaosyl céramide à partir de gangliosides bruts isolés de tissus placentaires humains repris dans un mélange de solvants comprenant deux parties de solvant polaire pour une partie de solvant apolaire en volume qu'on filtre. Il est caractérisé en ce qu'on précipite les gangliosides par de l'acétate d'éthyle, les impuretés restant dans le solvant, tandis que les gangliosides purifiés, contenant en proportions sensiblement égales des esters sialyliques de l'hématoside, du paragloboside et du lacto-N-norhexaosyl céramide, sont séparés par filtration ou essorage.

On peut préparer le lacto-N-norhexaosyl céramide à partir de ces gangliosides purifiés par une hydrolyse ménagée, par exemple, dans un mélange méthanol/eau (80:20, volume par volume). Dans ce cas, on ajoute du chloroforme et de l'eau afin d'amener les proportions de constituants du solvant à 20 parties de chloroforme, 10 parties de méthanol et 6 parties d'eau. La phase aqueuse est séparée par décantation ou centrifugation. Après une seconde extraction, on réunit les phases aqueuses et les évapore pour obtenir le lacto-N-norhexaosyl céramide pratiquement pur.

Du fait que, selon l'invention, il est possible d'extraire industriellement en quantités suffisantes à partir de tissu placentaire riche en sialyl-lacto-N-norhexaosyl céramide, dont la copule neutre (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc \rightarrow céramide) présente une forte activité antigénique i, du lacto-N-norhexaosyl céramide pratiquement pur, on peut l'utiliser dans le diagnostic et le traitement de certaines maladies auto-immunes ou dans certaines tumeurs, du fait de son accessibilité suffisante.

Ainsi il devient par exemple possible, par l'utilisation du lacto-N-norhexaosyl céramide, copule neutre, de diagnostiquer et de traiter le «cold agglutinine disease» (voir Watanabe K., Powell M.E., Hakomori S., Childs R.A., Feizi T., «Biochem. Biophys. Res. Comm.», 81, 1286-1293, 1978) ou certaines tumeurs (voir Surani M.A.H., «Cell», 18, 217-227, 1979). Comme matière première, dans le procédé selon l'invention, on peut utiliser des gangliosides d'origine placentaire, extraits de placenta frais ou de résidus résultant de la fabrication de γ -globulines, d'extraits ou d'enzymes placentaires.

Les gangliosides d'origine placentaire humaine (hématoside-GM3, sialyl-i) contiennent exclusivement de l'acide N-acétylneuraminique par opposition aux gangliosides provenant de tissus d'autres mammifères qui contiennent des quantités variables suivant l'espèce d'acide N-glycolylneuraminique. En outre, les lipides résiduels obtenus dans cette préparation peuvent constituer une source appréciable de phospholipides d'origine humaine, dont l'utilisation en thérapeutique est de plus en plus importante comme véhicule de médicaments spécifiques, ou de lipides utilisables en thérapeutique ou en cosmétique.

Préparation de la matière première:

1 kg de placenta ou de résidu de placenta est broyé dans 7,5 l de chloroforme/méthanol (2/1, v/v), le tout est laissé en contact 2 heures à la température ambiante, puis filtré. L'extrait est conservé et le résidu solide est repris dans 7,5 l du mélange chloroforme/méthanol (1/1, v/v), rebroyé et laissé 2 heures à la température ambiante, puis filtré. L'extrait obtenu, mélangé à l'extrait précédent, est évaporé sous vide, fournissant ainsi de 30 à 40 g de résidu sec. Ce résidu est redissous dans 2 l de chloroforme/méthanol (2/1, v/v) auquel on ajoute 400 ml d'eau bidistillée, on agite et l'on sépare les 2 phases formées par centrifugation ou décantation. La phase supérieure aqueuse (extrait A) est conservée. La phase inférieure (chloroformique) est additionnée de 650 ml de méthanol, ce qui donne après agitation une solution homogène à laquelle on ajoute 400 ml d'eau bidistillée. Après agitation, on sépare comme précédemment les 2 phases. La phase supérieure aqueuse est mélangée avec le premier extrait A et le tout est évaporé après addition de toluène ou de butanol comme antimosse. Le résidu obtenu de 10 à 20 g contient la majeure partie des gangliosides du placenta. La phase chloroformique, après évaporation, fournit de 20 à 30 g de lipides totaux contenant les lipides neutres, les phospholipides et les glycolipides neutres du placenta.

Variante de préparation:

1 kg de résidu de placenta est broyé avec 2 l d'eau distillée et 7,2 l de méthanol; on ajoute ensuite 3,6 l de chloroforme. On agite 30 minutes, puis on filtre. Le résidu est réextrait, après réhomogénéisation dans 1,3 l d'eau, par 5,3 l du mélange chloroforme/méthanol (1/2, v/v); on filtre et les 2 extraits sont mélangés. On y ajoute alors 3,5 l d'eau bidistillée, on agite et on sépare les 2 phases par centrifugation.

gation ou décantation. La phase supérieure aqueuse, contenant la majeure partie des gangliosides, est évaporée sous vide en présence de butanol comme antimousse. Le résidu sec obtenu de la phase chloroformique contient l'ensemble des autres lipides.

Autre variante de préparation:

1 kg de résidu de placenta broyé est extrait 2 fois à froid par 5 volumes d'acétone pour éliminer les lipides neutres. Le tissu dégraissé est alors extrait à reflux par de l'éthanol. L'extrait éthanolique est soit concentré et les glycolipides mis à précipiter par refroidissement à -4°C pendant 24 heures, soit évaporé à sec, puis redissous dans le mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v) et les gangliosides extraits par addition de 0,2 volume d'eau, comme décrit à l'exemple 1.

Afin d'être purifié, l'extrait sec de ganglioside brut est dissous dans 200 ml de NaOH méthanolique 0,2M et laissé 2 h à 37°C . Après neutralisation, la solution est évaporée à sec et le résidu repris dans 100 ml d'eau bidistillée et dialysée pendant 48 heures.

Exemple de procédé selon l'invention:

La solution de la variante précédente est évaporée à sec et le résidu est redissous dans 20 ml de chloroforme/méthanol (2/1, v/v); on filtre pour éliminer l'insoluble et les gangliosides sont précipités par addition de 170 ml d'acétate d'éthyle. Le précipité d'environ 0,6 à 1 g contient la majeure partie des gangliosides.

La phase de saponification peut toutefois être abandonnée et la dialyse de l'extrait brut dissous dans l'eau peut être effectuée immédiatement. La précipitation par l'acétate d'éthyle de cet extrait entraîne une plus forte proportion de sphingomyéline dans le précipité.

Les gangliosides peuvent être purifiés à partir de ce précipité par dissolution dans 100 ml de mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v) et extraction à l'eau, comme précédemment décrit. On obtient ainsi un extrait aqueux de 0,1 à 0,2 g de gangliosides purifiés constitués principalement de GM_3 (Hématoside), de Sialyl-paragloboside et de Sialyl-lacto-N-norhexaosyl céramide, en proportions à peu près équilibrées.

On peut aussi, à partir du précipité de gangliosides bruts ou à partir des gangliosides purifiés, préparer le lacto-N-norhexaosyl céramide par hydrolyse ménagée.

Les gangliosides purifiés sont dissous dans 20 ml d'HCl 0,2N dans le mélange méthanol/eau (80/20, v/v) et laissés 1 heure à 80°C . On ajoute du chloroforme et de l'eau pour obtenir un mélange chloroforme/méthanol/eau 20/10/6 (v/v). La phase aqueuse est séparée par décantation ou par centrifugation. Une deuxième extraction est effectuée et les phases aqueuses réunies sont évaporées et fournissent de 50 à 150 mg de lacto-N-norhexaosyl céramide contenant des traces de paragloboside.

Cette hydrolyse peut être obtenue par chauffage à 100°C pendant 1 heure des gangliosides dissous dans de l'eau bidistillée additionnée de 1 % d'acide acétique. La purification se fait aussi par partage entre une phase chloroformique et une phase aqueuse, comme précédemment décrit.

La pureté des composés obtenus peut être vérifiée par chromatographie sur plaque de gel de silice H dans le solvant chloroforme/méthanol/eau (60/35/8, v/v) et révélation à l'orcinol-acide sulfurique. Le glycolipide i présente un R_f caractéristique. D'autre part, son activité antigénique i peut être mesurée par inhibition de l'hémagglutination en utilisant des sérums standards anti-i.

Les gangliosides présentent aussi un comportement chromatographique spécifique. Leur identité peut être confirmée par hydrolyse à la neuraminidase. Dans le cas du Sialyl-lacto-N-norhexaosyl céramide, l'apparition de l'activité antigénique i peut être mise en évidence après action de la neuraminidase.

De préférence, les gangliosides sont chromatographiés en bande sur une plaque préparative de gel de silice H, puis on révèle sur une partie de la plaque et on élue chacune des fractions de gangliosides au mélange chloroforme/méthanol/eau (1/2/1,4 v/v). On évapore et on reprend au tampon acétate pH 5,8 contenant 25 U de neuraminidase et 0,1 % de CaCl_2 . On laisse 24 h à 37°C ; on évapore après addition de méthanol, reprend le résidu par un mélange de chloroforme/méthanol/eau (60/30/4,5) et on élimine les sels minéraux par chromatographie sur Séphadex G. 25. La chromatographie de l'éluat sur plaque de gel de silice comme précédemment montre la présence de CDH provenant du GM_3 de paragloboside (PG) provenant du Sialyl-paragloboside (SPG) et du glycolipide i provenant de l'hydrolyse du Sialyl-i.

Les phases chloroformiques provenant de l'extraction des gangliosides contiennent une forte proportion de sphingomyéline (SPH) et de phosphatidylcholine (PC) qu'il est possible de purifier.